

ペリオスチンは腹部大動脈瘤において
メカニカルストレスを炎症へと結びつける

Periostin Links Mechanical Strain to Inflammation
in Abdominal Aortic Aneurysm

山口大学大学院医学系研究科 応用医工学系専攻

器官制御医科学講座 博士後期課程

器官病態外科学 (外科学第一)

山下 修

平成 25 年 11 月

目次

第 1 章 緒言-----	3
1.1 背景-----	3
1.2 目的-----	3
第 2 章 方法-----	4
2.1 ヒト大動脈壁の採取-----	4
2.2 ウェスタンブロットによる蛋白定量-----	4
2.3 病理組織学的及び免疫組織化学的分析-----	4
2.4 ゼラチンザイモグラフィによる MMP の定量-----	5
2.5 ELISA による蛋白定量-----	5
2.6 血管平滑筋細胞培養とメカニカルストレス曝露-----	5
2.7 ヒト大動脈瘤壁培養-----	5
2.8 動物大動脈瘤モデル実験-----	6
2.9 統計学的分析-----	6
第 3 章 結果-----	7
3.1 ヒト大動脈瘤壁におけるペリオスチンの発現-----	7
3.2 マウス大動脈瘤モデルにおけるペリオスチン発現の経時的変化	9
3.3 血管平滑筋細胞におけるメカニカルストレス曝露の評価-----	11
3.4 血管平滑筋細胞におけるペリオスチン/FAK を介した メカノトランスダクションの評価-----	13
3.5 ヒト大動脈瘤におけるペリオスチン/FAK 経路の評価-----	15
3.6 動物モデルにおけるペリオスチン/FAK 経路の評価-----	16
第 4 章 考察-----	18
第 5 章 結語-----	20
第 6 章 謝辞-----	21
第 7 章 参考文献-----	22

第1章 緒言

1.1 背景

腹部大動脈瘤（AAA）は、大動脈の部分的な拡張と破裂を引き起こす、死亡率の高い疾患である^(1,2)。現在、破裂を予防するためのAAAの治療選択肢は、開腹人工血管置換術またはステントグラフト内挿術に限られている⁽³⁾。非外科的治療、特に薬物療法のニーズは高いが、まだ実用化されていないのが現状である^(2,4)。また臨床で役立つ薬物療法を作り出すにはAAAの活動性を示すバイオマーカーの開発も欠かせない^(2,5)。AAAは慢性炎症ならびにマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）のようなタンパク質分解酵素によって引き起こされる細胞外マトリックス分解を特徴とする^(6,7)。また、ステントグラフト内挿術に成功すると、AAAのサイズおよび血漿中MMP濃度が低下することが報告されている⁽⁸⁾。このことから、メカニカルストレスがAAAの疾患活動性の維持に重要であることと、メカニカルストレスによって刺激されたシグナル伝達経路が治療標的となることが示唆された。しかし、AAAにおけるメカノトランスダクションを調節する分子機序はほとんど不明のままである。

ペリオスチンは細胞外マトリックスタンパクであり、ファシクリンファミリーに属している。ペリオスチンは、細胞表面の $\alpha\beta3$ および $\alpha\beta5$ などのインテグリン分子と相互作用し、組織の発生とリモデリングのためのシグナルを発生させる⁽⁹⁾。これまでの研究で、ペリオスチンは培養細胞においてメカニカルストレスによって発現が増加することに加え^(10,11)、ペリオスチンは心臓細胞からのMMP分泌を促進することも示されている⁽¹²⁾。以上の知見から、ペリオスチンがAAAの発症機序に関与するメカノトランスダクションにおいて重要な役割を果たしているのではないかという仮説が導かれた。

1.2 目的

本研究では、ペリオスチンがヒトAAA組織標本、培養血管平滑筋細胞（VSMC）、およびin vivoマウスモデルにおいてメカニカルストレスに対する炎症応答を仲介することを証明することである。

第2章 方法

2.1 ヒト大動脈壁の採取

開腹手術を受けた AAA 患者 42 名から腹部大動脈壁標本を採取した。対照として、大動脈手術を受けた患者 5 名から動脈瘤のない腹部大動脈壁標本を採取した。AAA 群と非 AAA 群の年齢 (74 ± 1 歳および 68 ± 5 歳、 $p=0.27$)、男性比 (76%および 60%、 $p=0.43$)、喫煙率 (71%および 60%、 $p=0.60$) に有意差は認められなかった。また、AAA 患者および非 AAA 患者の高血圧 (73%および 60%、 $p=0.56$)、糖尿病 (23%および 20%、 $p=0.90$)、高脂血症 (23%および 20%、 $p=0.72$) の有病率にも有意差は認められなかった。これまでに報告した方法で、大動脈組織標本をウェスタンブロット法、免疫組織化学法、および生体外大動脈培養によるタンパク質分析を行った^(13,14)。ヘルシンキ宣言の原則に従って、すべての患者から文書による同意を取得した。ヒト標本を用いた実験手順はすべて、山口大学医学部附属病院医薬品等治験・臨床研究等審査委員会から承認を受けた (#H24-26)。

2.2 ウェスタンブロットによる蛋白定量

これまでに報告した方法で、タンパク質抽出およびウェスタンブロット法を実施した^(3,14)。ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲルの個々のレーンに等量のタンパク質サンプルを乗せ、電気泳動で分離させ、ニフツ化ポリビニルデン膜に転写した。ペリオスチン (BioVendor, Brno, Czech Republic)、単球走化性タンパク質-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase, FAK) (Cell Signaling Technology)、リン酸化 FAK (Tyr397) (Abcam, Cambridge, UK)、細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、リン酸化 ERK (Promega, Madison, WI, USA)、c-Jun N 末端キナーゼ (c-Jun N-terminal kinase, JNK) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、リン酸化 JNK (Promega)、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Millipore, Billerica, MA, USA) に対する抗体を用いて膜をプローブした。

2.3 病理組織学的及び免疫組織化学的分析

組織学的分析のために、ヘマトキシリン/エオジン (HE) 染色、マッソントリクロム (MT) 染料、およびエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色を用いてパラフィン包埋切片を染色した。また、免疫組織化学のために、既報の方法に従って、各抗原に対する抗体を用いて切

片をプローブした^(13,14)。抗 Periostin 抗体 (BioVendor)、抗平滑筋 α -アクチン抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、抗 MCP-1 抗体 (R&D Systems)、および抗 pFAK 抗体 (Abcam) を用いて切片をプローブする方法で、それぞれペリオスチン、 α -平滑筋アクチン (α -SMA)、MCP-1、およびリン酸化 FAK (pFAK) の検出を行った。

2.4 ゼラチンゼイモグラフィーによる MMP の定量

既報の方法に従って、ゼラチンゼイモグラフィーを行った^(13,14)。対応するサイズのバンドを定量する方法で MMP-2 および MMP-9 のタンパク質を測定した。

2.5 ELISA による蛋白定量

ラット MCP-1 ELISA キット (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) およびヒト MCP-1 ELISA キット (R&D Systems) を用いてサンドイッチ酵素免疫測定法により MCP-1 を定量化した。

2.6 血管平滑筋細胞培養とメカニカルストレス曝露

ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) は、Cell Applications, Inc (San Diego, CA, USA) から購入した。10%ウシ胎児血清入りダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で VSMC を培養した。実験前に、VSMC をラミニンで被覆したシリコンチャンバーに播種し、24 時間血清飢餓状態で培養した。次に、培養細胞伸展システム (STB-140-10) (ストレックス株式会社、大阪) を用いて VSMC に水平方向の周期的伸展刺激を負荷した。異なる程度の伸展刺激を検討するために、VSMC を 3 つの群に分けた。各群の細胞を長軸 (伸長) 方向に 30 サイクル/分の頻度で 48 時間、2%、5%、または 20%で伸展させた。阻害実験では、伸展の 2 時間前に、1 μ g/mL の periostin 中和抗体 (R&D Systems) または 10 μ M の FAK 阻害剤 (FAK-I) (PF573228) (Tocris Bioscience, Bristol, UK) を培地に添加した。またペリオスチン添加の実験では、1 μ g/mL の組換え型マウスペリオスチン (PN-nAb) (R&D Systems) を用いて VSMC を 48 時間刺激した。

2.7 ヒト大動脈瘤壁培養

既報の方法に従って、生体外大動脈培養を行った^(13,14)。AAA 壁標本を約 1 mm の厚さに細切り、等質重量の組織を 12 ウェルプレートの各ウェルに入れ、無血清 DMEM で培養した。阻害実験のために、10 μ M の FAK 阻害剤 (PF573228) (Tocris Bioscience) を培地に

添加して 48 時間培養した。

2.8 動物大動脈瘤モデル実験

AAA 発生過程の Periostin 発現変化の観察研究のために、既報の方法に従って、マウスの大動脈周囲を 0.5 M CaCl_2 で処理して AAA を作成した^(13,15)。ペリオスチン添加実験では、15 μg の組換え型マウスペリオスチン (R&D Systems) を含有する Gelfoam (ゼルフォーム) パッチ (3.5×2×2 mm) (Pfizer, New York, NY, USA) をマウスの大動脈周囲腔に 7 日間留置した。リン酸緩衝食塩水 (PBS) を含有するゼルフォームパッチを対照とした。いずれの実験の場合も、7 週齢の C57BL/6 雄マウスを用い、開腹前に、麻酔のためにペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg) を腹腔内注射した。呼吸および疼痛反応を定期的に観察して、麻酔深度をモニターした。所定の時点で、過剰なペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg、腹腔内注射) を投与して実験マウスを安楽死させた。組織学的分析のために、生理的血压で 4%パラホルムアルデヒド-PBS を全身灌流させて固定してからすぐに、腹部大動脈を採取した。すべての実験は米国国立衛生研究所発行の実験動物の管理と使用に関する指針に準拠して実施し、プロトコールは山口大学医学部動物使用委員会による承認を受けた (#31-068、#31-088)。

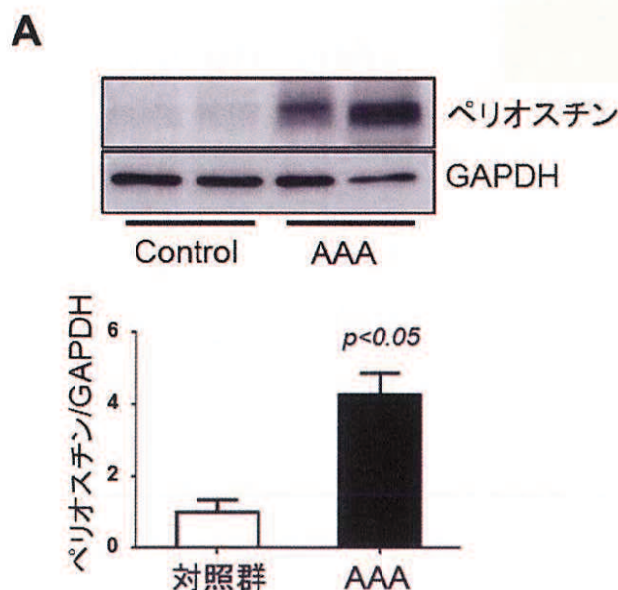
2.9 統計学的分析

データはすべて、平均値±標準誤差 (SE) で表した。統計解析には、必要に応じて、スチューデントの t-検定、マン・ホイットニーの U 検定、または分散分析 (ANOVA) を用いた。検定後比較には、ボンフェローニ法を用いた。

第3章 結果

3.1 ヒト大動脈瘤壁におけるペリオスチンの発現

まず、ウェスタンブロット法を用いて、ヒト AAA 標本中のペリオスチンタンパク質を定量測定した。正常径の大動脈壁（対照群）と比較すると、ペリオスチン発現は AAA 壁で有意に増加した（図 1A）。しかし、ペリオスチン発現と AAA の径との間に有意な相関は認められなかった（データ未掲載）。相関が認められなかったのは、恐らく AAA 組織の不均一な病態に原因があったためと推測される。また、AAA においてペリオスチン発現増加と関連すると考えられる病理学的変化を検討するために、組織内のペリオスチンの局在を分析した。AAA の典型的な病理学的所見を有する、正常径部から瘤移行部、そして瘤拡張部を含んだ AAA 標本の長軸方向の切片を用いて評価した。正常径部は、弾性線維層は残存しており、炎症性細胞浸潤はわずかであった。瘤移行部は、弾性線維の断片化および高度の細胞浸潤を示した。瘤拡張部は、弾性層板の著明な欠損およびコラーゲン線維の増加を示した。ペリオスチン発現は、弾性線維の減少が進み、著明な炎症性細胞浸潤が認められる瘤移行部で最も高かった（図 1B）。また、ヒト AAA 壁標本においてペリオスチンおよび α -SMA（VSMC のマーカー）の局在はほぼ同様であった（図 1C）。以上の所見より、ヒト AAA 壁標本において、特に炎症が高度な部位でペリオスチンの発現が増加することが示された。



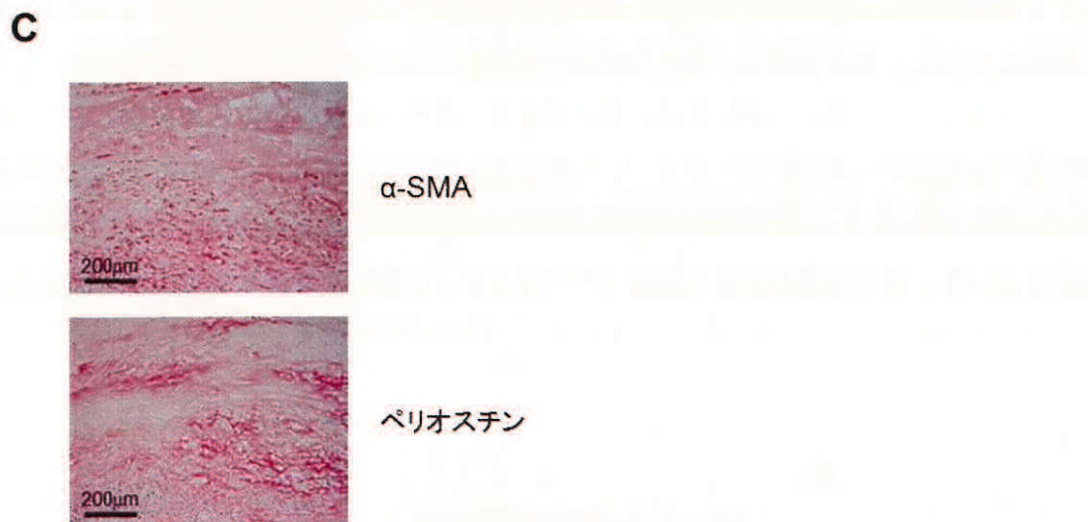
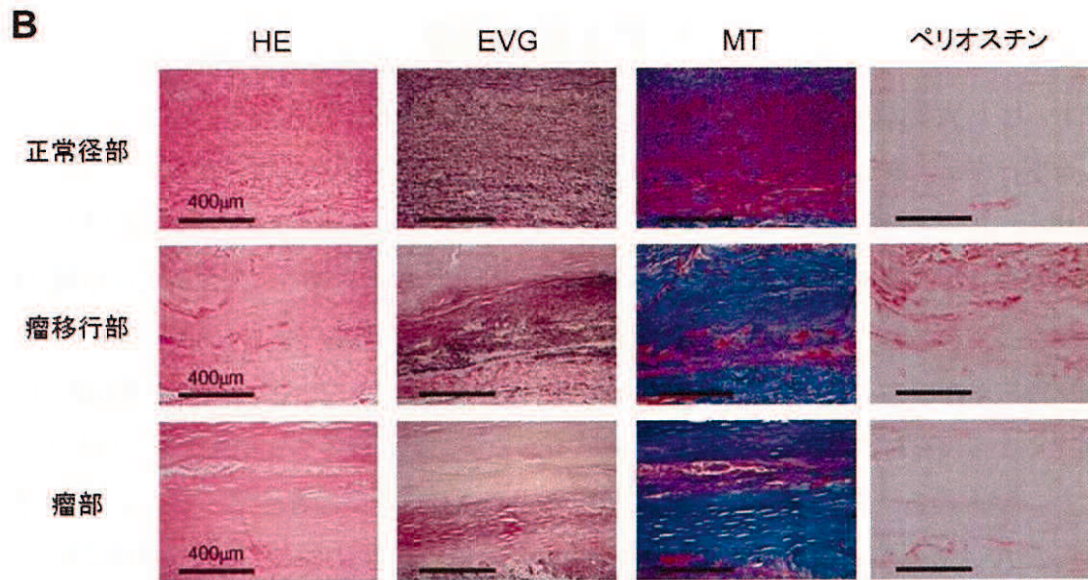


図 1. ヒト大動脈瘤壁におけるペリオスチンの発現

- A. ヒト腹部大動脈瘤 (AAA) の動脈壁では正常径大動脈 (対照群) に比べてペリオスチンの発現が上昇していた。
- B. ヒト AAA の動脈壁では、多数の炎症細胞浸潤と弾性繊維の破壊が進んでいる瘤移行部で、ペリオスチンの発現が高度であった。
- C. ヒト AAA の動脈壁では、α-SMA とペリオスチンの局在が類似していた。

3.2 マウス大動脈瘤モデルにおけるペリオスチン発現の経時的変化

次に、AAA の発症および大動脈瘤発生過程でのペリオスチン発現を評価するために、マウス大動脈瘤モデルを分析した。腎動脈下大動脈の周囲を CaCl_2 で処理してマウス大動脈瘤モデルを作成したところ、大動脈壁の慢性炎症が生じ、その結果、大動脈が紡錘型に拡張した (図 2A)。28 日後および 42 日後、腎動脈下大動脈の最大径は対照群に比べ有意に増加した (図 2B)。最初の 7 日間では、大動脈のペリオスチン発現は対照群でも AAA モデルマウスでも増加し、14 日目にペリオスチンはほぼ基底レベルまで回復した。以上のデータから、ペリオスチンは外科手技および/または CaCl_2 処理後に一過性に誘発されることが示された。興味深いことに大動脈瘤群にのみ、28 日目および 42 日目に、ペリオスチン発現が再び増加した。この時期には大動脈瘤群では、著明な大動脈径・炎症性細胞浸潤の増加や、弾性線維層の破壊が認められた (図 2C)。以上の結果から、ペリオスチンは大動脈瘤発生過程において、特に著明な炎症によって細胞外マトリックスの破壊が引き起こされている時に発現が増加することが示された。

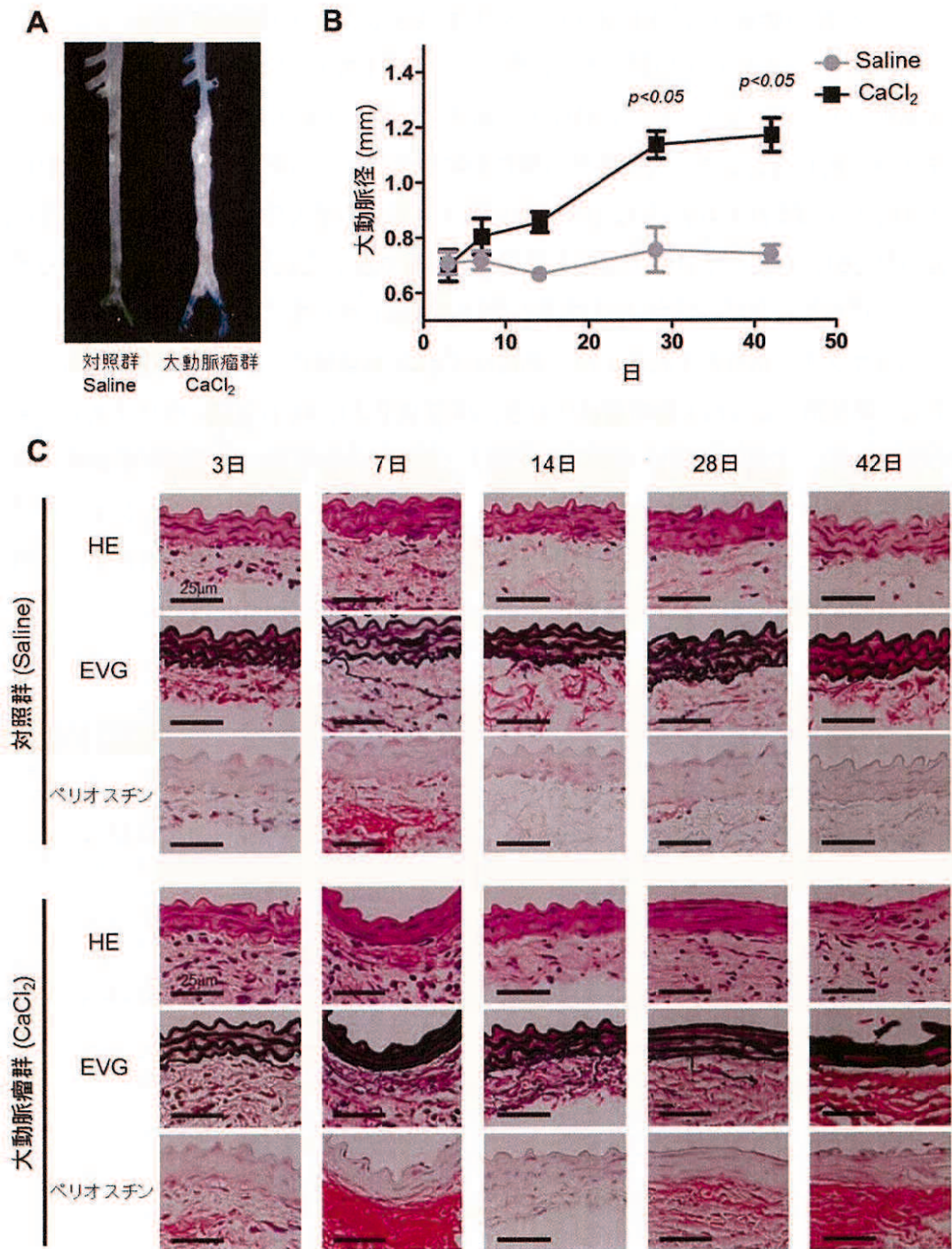


図 2. マウス大動脈瘤モデルにおけるペリオスチン発現の経時的変化

A. CaCl₂ 処理を行った大動脈瘤群では、大動脈が紡錘型に拡張した。

B. 大動脈瘤群では 14 日目、28 日目に瘤径の拡大を認めた。

C. 大動脈瘤群では対照群と比べて、瘤径が拡大した 14 日目、28 日目でペリオスチンの発現が高度であった。

3.3 血管平滑筋細胞におけるメカニカルストレス曝露の評価

メカノトランスダクションにおけるペリオスチンの役割を検討するために、実験系として VSMC を用いた。VSMC を選択したのは、ペリオスチン発現がヒト AAA 標本において主に α -SMA と共存することが理由であった。シリコンラバーチャンバーで培養した VSMC に 30 サイクル/分で水平方向の周期的伸展刺激を負荷した。その結果、20% 周期的伸展刺激では VSMC におけるペリオスチン発現は著しく増加したが (図 3A)、2% や 5% では増加は見られなかった (データ未掲載)。さらに 20% 伸展刺激では、MCP-1 タンパク質発現も有意に増加し (図 3B)、また活性型 MMP-2 の分泌も増加した (図 3C)。興味深いことに、このような伸展刺激によって誘発された MCP-1 および活性型 MMP-2 の増加はいずれも、細胞をペリオスチン中和抗体で前処理すると完全に抑制された (図 3B-C)。以上のデータから、ペリオスチンは VSMC においてメカニカルストレスを受けて MCP-1 および活性型 MMP-2 の増加を引き起こす重要な役割を果たしていることが示された。また、VSMC に組換え型ペリオスチン (rPeriostin) を負荷すると、MCP-1 の分泌が著明に誘発された (図 3J)。以上の結果をまとめると、メカニカルストレスに反応したペリオスチンの増加は、VSMC からの MCP-1 分泌に必要かつ十分であることが示された。この作用は炎症細胞浸潤を引き起しうると考えられる。

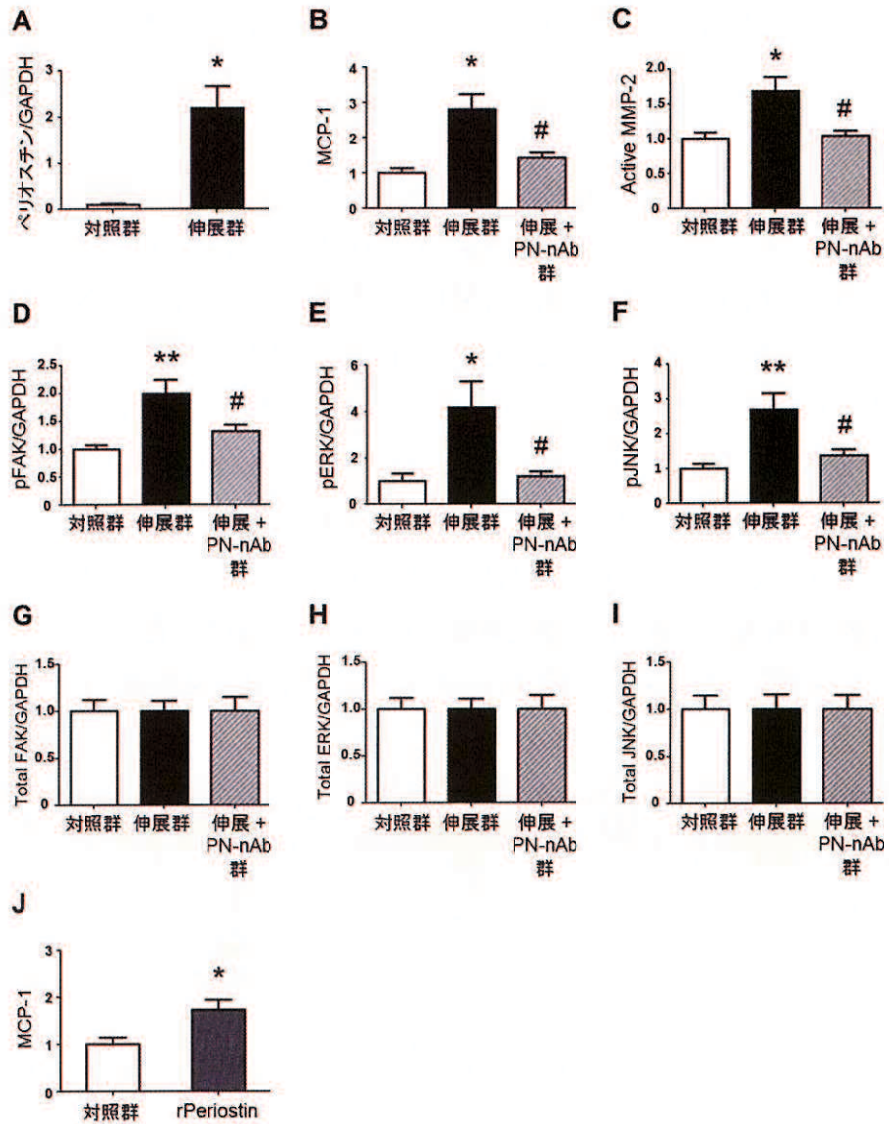


図 3. VSMC のメカニカルストレス応答におけるペリオスチンの役割

PN-nAb : periostin-neutralizing antibody (ペリオスチン中和抗体)

rPeriostin : recombinant Periostin (リコンビナントペリオスチン)

*: $p < 0.05$ vs 対照群, **: $p < 0.05$ vs 対照群, #: $p < 0.05$ vs 伸展群

3.4 血管平滑筋細胞におけるペリオスチン/FAK を介したメカノトランスダクションの評価

ペリオスチンが炎症を引き起こす分子機序を理解するために、われわれは FAK に注目した。FAK はペリオスチンによって活性化されることと[16,17]、MCP-1 を介して炎症細胞浸潤を促進すること[18]が報告されている。VSMC に周期的伸展刺激を加えると、総 FAK 量は変化することなく、FAK の活性化が有意に誘発されたが、これはペリオスチン中和抗体で前処理することによって抑制された (図 3D、G)。以上の結果から、ペリオスチンはメカニカルストレスによって誘発される FAK 活性化に欠かせないことが示された。同様に VSMC では、メカニカルストレスによって、炎症関連遺伝子発現を制御する 2 つの主要なシグナル伝達分子である ERK および JNK の有意な活性化も誘発されたが、この作用もペリオスチン中和抗体で前処理することによって抑制された (図 3E-F、H-I)。

次に、メカニカルストレスとペリオスチン経由の炎症シグナル伝達とを結びつけるネットワークにおける分子階層を解明するために、FAK 阻害剤である PF573228 を用いた。既報の通り、PF573228 は総 FAK 量を変化させることなく著明に FAK のリン酸化を抑制した (図 4A-B)。また PF573228 は、VSMC に負荷されたメカニカルストレスによって上昇する ERK および JNK の活性化を有意に抑制し (図 4A、C-D)、そしてさらに MCP-1 分泌および MMP-2 活性化いずれの増加も抑制した (図 4A、E-F)。以上の所見をまとめると、ペリオスチン/FAK 経路は ERK および JNK の活性化に加え、メカニカルストレスに反応した MCP-1 および活性型 MMP-2 分泌の増加にも重要であることが示された。重要なのは、PF573228 を用いて FAK を阻害すると、メカニカルストレスによって誘発されるペリオスチンの発現が抑制されることと (図 4A、G)、中和抗体を用いてペリオスチンを阻害すると、FAK の活性化が抑制されること (図 3D) であった。以上の所見から、ペリオスチンと FAK との間には炎症を惹起する悪循環があることがわかり、これがメカニカルストレスに対する炎症反応を増強していると考えられた。

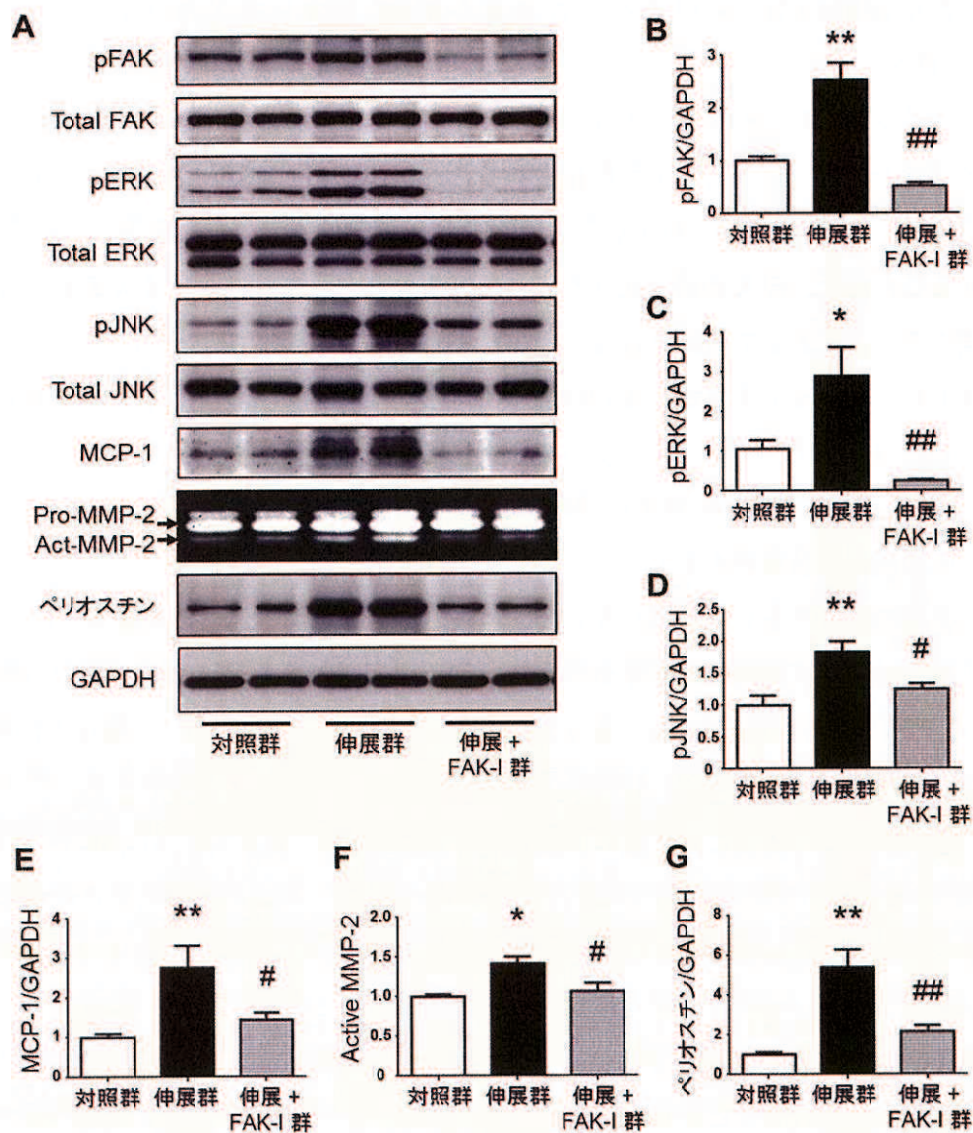


図 4. VSMC のメカノトランスダクションにおけるペリオスチン/FAK 経路の役割

FAK-I : FAK-Inhibitor (FAK 阻害剤; PF573228)

rPeriostin : recombinant periostin (リコンビナントペリオスチン)

*: $p < 0.05$ vs 对照群, **: $p < 0.01$ vs 对照群, #: $p < 0.05$ vs 伸展群, ##: $p < 0.01$ vs 伸展群

3.5 ヒト大動脈瘤における Periostin/FAK 経路の評価

ヒトと動物モデルでは、疾患の病態生理が少なからず異なると考えられる。そのため薬剤で直接処理したときの反応を分析するには、ヒト AAA 組織の生体外培養は有効な手段の一つである^(13,19,20)。ヒト AAA 組織の生体外培養では、FAK、ERK および JNK の活性化と MCP-1 および MMP の分泌のレベルが相当程度に維持されることを突き止めた(図 5A-F)。ヒト AAA 組織におけるペリオスチン/FAK 経路を阻害するために、PF573228 で処理したところ、PF573228 は AAA 組織中に浸透して FAK のリン酸化を抑制することがわかった(図 5A)。また、PF573228 はヒト AAA 組織における ERK および JNK の活性化を有意に低下させ(図 5B-C)、MCP-1 および MMP-9 の分泌を低下させた(図 5D-E)。しかし、PF573228 は MMP-2 の総分泌量に影響を及ぼさなかったことから(図 5F)、PF573228 処理後もヒト AAA 組織中の細胞生存に影響しないことが示唆された。以上の結果から、ヒト AAA 組織においても炎症反応持続におけるペリオスチン/FAK 経路の重要な役割が示された。

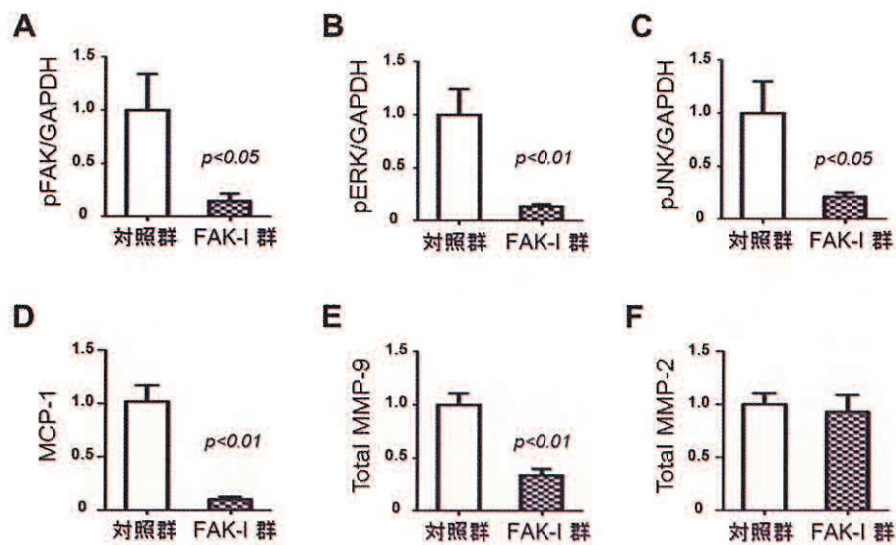


図 5. ヒト腹部大動脈瘤壁生体外培養

FAK-I : FAK-Inhibitor (FAK 阻害剤; PF573228)

3.6 動物モデルにおける Periostin/FAK 経路の評価

これまでの *in vitro* および *ex vivo* から得られた所見に基づいて、ペリオスチンがマウス大動脈の炎症反応を *in vivo* で十分に誘発できるかどうかを検討した。そのために、rPeriostin をゼルフォーム（生体分解性細胞外マトリックス製剤）に含有させた。その結果、既報の通り、rPeriostin の局所送達を得られた⁽²¹⁾。rPeriostin または緩衝液のみ（対照）を含有させたゼルフォームパッチをマウスの大動脈周囲腔に留置して、炎症反応を7日後に観察した。免疫組織化学分析の結果、ペリオスチンの発現は rPeriostin 処理大動脈で有意に高かったことから、抗体は内因性および外因性ペリオスチンいずれとも反応した可能性がある。対照大動脈と比較すると、rPeriostin 処理大動脈では FAK 活性化および MCP-1 発現のレベルは、大動脈壁の細胞および大動脈周囲腔の細胞いずれにおいても著明に高かった（図 6A）。また、rPeriostin 処理大動脈への著明な細胞浸潤も観察された（図 6A-B）。以上の結果から、ペリオスチンは *in vivo* において、FAK 活性化および MCP-1 の発現を介して炎症反応を十分に誘発できることが確認された。

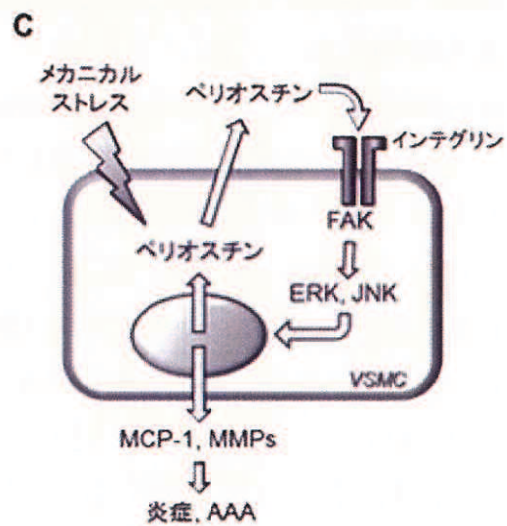
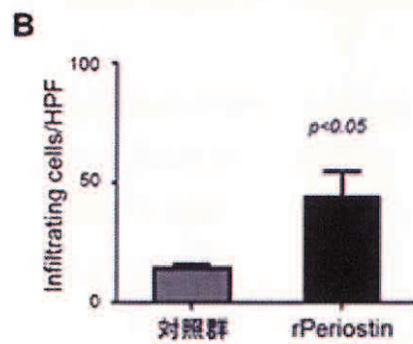
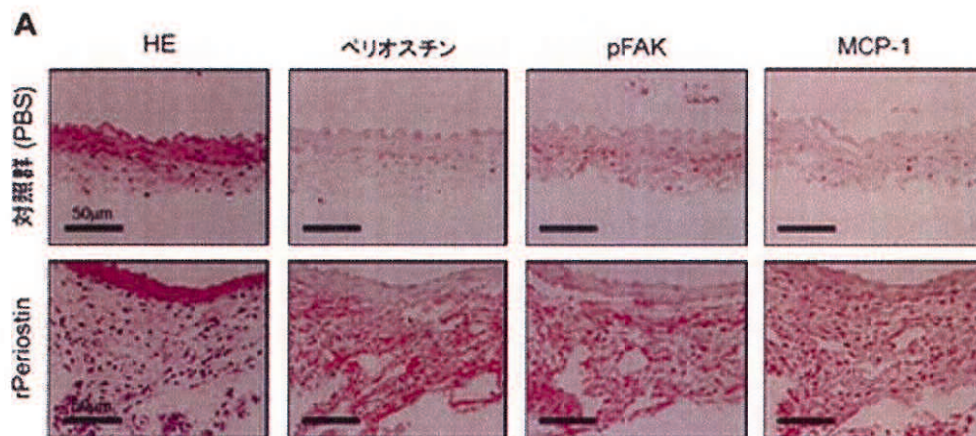


図 6. 動物モデルへのペリオスチンの投与

rPeriostin : recombinant Periostin (ペリオスチン組み換え蛋白)

第4章 考察

本研究では、ペリオスチンはヒト AAA の、特に細胞浸潤やエラスチン分解が高度な領域に多く発現することが示された。またペリオスチンはマウスの大動脈瘤発生過程に多く発現し、時期的には持続する炎症が大動脈径の拡大に寄与する段階で顕著であった。そのため大動脈瘤壁のペリオスチン発現には明瞭な空間的および時間的パターンがあることがわかった。ペリオスチンは大動脈壁の炎症領域に局所的に発現し、循環血液中にも放出されるため、腹部大動脈瘤のバイオマーカーとしての有用な特性を持っている。またペリオスチンの血清中濃度は非小細胞肺癌患者⁽²²⁾および喘息患者⁽²³⁾における有望なバイオマーカーとして認識されているため、活動期の AAA 進行を検出するための有用なマーカーとしても機能する可能性がある。

Laplace の法則によると AAA の血管壁は理論的に異常に高い周期的伸展刺激にさらされている。われわれは、ペリオスチンの発現は VSMC に 20% 周期的伸展刺激を加えることによって増加し、さらに AAA モデルマウスにおいては大動脈径の拡大後に持続的に増加することを示した。以上のデータから、大動脈が拡大するにつれて、大動脈は病的な周期的伸展刺激にさらされ、この刺激がペリオスチン発現を持続的にアップレギュレートし、AAA の病態進行が加速することが考えられる。そのため、ペリオスチンは AAA 発生ではなく AAA の病態進行に寄与していることがわれわれの結果から示唆された。また rPeriostin をゼルフォームに含有させてマウスに 42 日間留置しても、弾性層板の破壊も AAA の発生も起きなかった（未公表データ）。以上の結果から、ペリオスチンが一過性に増加するだけでは AAA を発生させるには不十分であることが示唆され、ペリオスチンが AAA の発生には関与していないのではないかという知見を裏付けた。

重要なのはわれわれが、ペリオスチンがメカニカルストレスを生化学的シグナルに変換し、これが AAA における炎症反応を引き起こすことを解明したことであった。これまでメカニカルストレスが AAA における炎症および病態進行に重要であることが報告されてきた。例えば、臨床コホート研究から高血圧は AAA の危険因子であることがわかっている⁽²⁴⁾。またステントグラフト内挿術を行い、動脈瘤内の圧を減少させることによって、AAA の瘤径が低下することが知られている^(25,26)。さらには、ステントグラフト内挿術が成功すると、血清中インターロイキン-1 α ⁽²⁷⁾および血漿中 MMP-9^(8,28)が低下することも報告されている。以上の知見を合わせて考慮すると、血行力学的ストレスが、直接の物理的な力および分子生物学的プロセスの両面で動脈瘤進行に寄与し得ることが示唆された。しかし、これらの作用の分子学的メカニズムはこれまで確認されてこなかった。この難題を解決するために、

われわれはメカニカルストレスに反応する VSMC の分子現象を検討した。VSMC は大動脈壁のメカニカルストレス環境をモニタリングする際の主要な細胞である⁽²⁹⁾。血行力学的な力には主に周期応力とずり応力がある。周期的円周方向刺激は、大動脈壁に対し直角に作用し、VSMC を外側へ伸展させる。血流ずり応力は、血液が大動脈壁の血管内皮細胞に抵抗して引きずられるために生じる摩擦力である⁽³⁰⁾。特に Laplace の法則によると、同じ血圧の場合、AAA のために拡張した血管は正常サイズの大動脈血管より大きな周期的刺激を受ける。そのため、本研究では生理学的レベルを超えた周期的伸展刺激を VSMC に負荷した。15%~20%の伸展刺激が病理学的に高い伸展であると考えられることを示した既報の研究に従って、われわれは 20%の周期的伸展刺激を選択した⁽³¹⁻³³⁾。これに対し、生理学的相当の伸展状況を表しているとして 5%~10%の周期的伸展刺激を使用している研究も数多くある⁽³³⁻³⁷⁾。このような低刺激レベルの根拠としては、ヒト大動脈における最大伸展が正常血圧条件下には約 10%であったという観察結果にあったものと思われる⁽³⁸⁾。これまでの観察実験における大動脈の周期的伸展範囲は大きく異なり、およそ 2%~20%の範囲にあることが報告されている⁽³⁹⁻⁴¹⁾が、この変動は恐らく、測定方法、被験者の年齢、および病的変化の有無の差によるものが考えられた。これまでに報告されているように、病的な周期的伸展刺激（15%を超える）は VSMC の高度な増殖および分泌などの変化を引き起こすが、生理学的レベルの周期的伸展刺激では VSMC に著明な活動の変化は見られない^(34,37,42)。以上の知見は、われわれが本研究において病的な周期的伸展刺激として 20%周期的刺激を使用したことを支持するものである。

もう一つの重要な点は、ペリオスチン/FAK 経路が AAA においてメカニカルストレスに対する炎症反応の維持と増強に重要な役割を果たしていることを、われわれが初めて示したことである（図 6C）。ルイス肺癌細胞⁽¹⁰⁾および歯根膜線維芽細胞⁽¹¹⁾においてメカニカルストレスがペリオスチン mRNA の増加を引き起こすことはこれまでに報告されており、そして VSMC⁽¹⁶⁾および心臓細胞⁽¹⁷⁾ではペリオスチンが FAK 活性化に欠かせないことも示されていた。最近になって皮膚線維症の病理学的メカニズムに関して、メカニカルストレス（周期的刺激ではない）が FAK 活性化を引き起こし、FAK/ERK 経路を介して MCP-1 分泌を促進することが報告された⁽¹⁸⁾。また心臓細胞において MMP-2 および MMP-9 はペリオスチンによって分泌が増加すること⁽¹²⁾、線維芽細胞株ではペリオスチンによって FAK が活性化することが証明されている⁽⁴³⁾。本研究では以上の知見を統合し、今回 VSMC におけるメカノトランスダクションにペリオスチン/FAK 経路が関与することを証明することができた。さらには、ペリオスチンまたは FAK いずれかを阻害すると、両タンパク質が抑制されること

が示され、VSMCにおけるペリオスチン産生と FAK 活性化には悪循環が存在することも発見できた。ヒト AAA 組織では、ペリオスチンの高度発現および FAK の有意な活性化が観察された。また FAK を阻害すると JNK の活性化が有意に低下することが示された。われわれはこれまでにヒト AAA 生体外組織培養においてペリオスチン分泌が JNK 阻害剤である SP600125 によって有意に減弱することを発見した（未公表データ）。これらの所見を合わせて考慮すると、ペリオスチン、FAK および JNK の間の悪循環は、ヒト AAA におけるメカニカルストレスに対する炎症反応を増強しうるということが強く示唆された。そのため、われわれの結果からは、AAA 壁に病的なメカニカルストレスが加わることでペリオスチン/FAK 経路の持続的な活性化が起こり、その結果、MCP-1 および MMP の分泌が持続的に増加し、最終的に AAA の病態が進行することが示唆された。実際に、マウス大動脈壁をペリオスチンで処理すると、FAK の活性化と MCP-1 の増加が起こり、その結果、細胞浸潤を来すことがわれわれの結果から示された。この MCP-1 および MMP はヒト AAA 標本の血管壁で高度に発現していることに加え^(13,44)、これらの分子はマウスにおける AAA 形成過程の、炎症性細胞浸潤および細胞外マトリックス分解に重要な役割を果たしていることはこれまでも知られている^(45,46)。われわれは、JNK が AAA において異常な細胞外マトリックス代謝及び疾患進行に重要な役割を果たしていることをこれまでに報告している。また、マウスにおいて JNK を阻害すると AAA の発症が予防され、さらには形成された AAA が退縮することも示した⁽¹³⁾。そのため、JNK は AAA の発症機序における重要な分子と考えられる。本研究では、AAA 形成過程において、JNK が、メカニカルストレスによって誘発されるペリオスチンが引き起こす、炎症の悪循環に関与することも示された。

第 5 章 結語

本研究では、AAA の病態進行において、ペリオスチンがメカニカルストレスと炎症を結びつける分子機序に関する新たな見解を示した。メカニカルストレスによって誘発された炎症は、ペリオスチン/FAK 経路によって増強および維持される悪循環があった。そのため、ペリオスチンは AAA の疾患活動性の臨床的バイオマーカーとなるだけでなく、AAA 患者のための新しい治療標的となる可能性がある。

第6章 謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜った山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）、濱野公一教授に感謝致します。また、実験のご指導を頂きました山口大学大学院器官病態外科学講座（第一外科）の吉村耕一先生に感謝申し上げます。

第 7 章 参考文献

1. Sakalihan N, Limet R, Defawe OD (2005) Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 365: 1577-1589.
2. Yoshimura K, Aoki H (2012) Recent advances in pharmacotherapy development for abdominal aortic aneurysm. *Int J Vasc Med* 2012: 648167.
3. Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, et al. (2011) 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of patients with peripheral artery disease (Updating the 2005 Guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 124: 2020-2045.
4. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P (2006) Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2605-2613.
5. Golledge J, Powell JT (2007) Medical management of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 34: 267-273.
6. Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK (2002) Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg* 39: 110-230.
7. Tedesco MM, Dalman RL (2010) Arterial Aneurysms. In: Cronenwett JL, Johnston KW, editors. *Vascular Surgery*. Philadelphia: Saunders. 117-130.
8. Sangiorgi G, D'Averio R, Mauriello A, Bondio M, Pontillo M, et al. (2001) Plasma Levels of Metalloproteinases-3 and -9 as Markers of Successful Abdominal Aortic Aneurysm Exclusion After Endovascular Graft Treatment. *Circulation* 104: I288-I295.
9. Kudo A (2011) Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cell Mol Life Sci* 68: 3201-3207.
10. Ma D, Lu H, Xu L, Xu X, Xiao W (2009) Mechanical loading promotes Lewis lung cancer cell growth through periostin. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45: 467-472.
11. Wen W, Chau E, Jackson-Boeters L, Elliott C, Daley TD, et al. (2010) TGF-beta1 and FAK regulate periostin expression in PDL fibroblasts. *J Dent Res* 89: 1439-1443.
12. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, et al. (2010) Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and

MMP production in humans and rodents. *J Clin Invest* 120: 2292-2306.

13. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, et al. (2005) Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med* 11: 1330-1338.

14. Nagasawa A, Yoshimura K, Suzuki R, Mikamo A, Yamashita O, et al. (2013) Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. *J Surg Res.* 183: 472-477

15. Kimura T, Yoshimura K, Aoki H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, et al. (2011) Tenascin-C is expressed in abdominal aortic aneurysm tissue with an active degradation process. *Pathology International* 61: 559-564.

16. Li G, Jin R, Norris RA, Zhang L, Yu S, et al. (2010) Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins α v β 3 and α v β 5 and focal adhesion kinase (FAK) pathway. *Atherosclerosis* 208: 358-365.

17. Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, et al. (2008) Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med* 205: 295-303.

18. Wong VW, Rustad KC, Akaishi S, Sorkin M, Glotzbach JP, et al. (2012) Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nat Med* 18: 148-152.

19. Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Furutani A, Hamano K, et al. (2008) Development of pharmacological therapy for abdominal aortic aneurysms based on animal studies. In: Sakalihasan N, editor. *Aortic Aneurysms, New insights into an old problem*. Liège: Édition de l'Université de Liège. 453-476

20. Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, et al. (1999) Inhibition of prostaglandin E2 synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 100: 48-54.

21. Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, et al. (2007) Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 13: 962-969.

22. Sasaki H, Dai M, Auclair D, Fukai I, Kiriya M, et al. (2001) Serum level of the periostin, a homologue of an insect cell adhesion molecule, as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 92: 843-848.

23. Jia G, Erickson RW, Choy DF, Mosesova S, Wu LC, et al. (2012) Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 130: 647-654
24. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, Makaroun MS, Illig KA, et al. (2009) The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: the Society for Vascular Surgery practice guidelines. *J Vasc Surg* 50: S2-49.
25. Ellozy SH, Carroccio A, Lookstein RA, Jacobs TS, Addis MD, et al. (2006) Abdominal aortic aneurysm sac shrinkage after endovascular aneurysm repair: correlation with chronic sac pressure measurement. *J Vasc Surg* 43: 2-7.
26. Kwon ST, Rectenwald JE, Baek S (2011) Intrasc sac pressure changes and vascular remodeling after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: review and biomechanical model simulation. *J Biomech Eng* 133: 011011.
27. Yates CM, Abdelhamid M, Adam DJ, Nash GB, Bradbury AW, et al. (2011) Endovascular aneurysm repair reverses the increased titer and the inflammatory activity of interleukin-1alpha in the serum of patients with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 54: 497-503.
28. Hellenthal FA, Ten Bosch JA, Pulinx B, Wodzig WK, de Haan MW, et al. (2012) Plasma levels of matrix metalloproteinase-9: a possible diagnostic marker of successful endovascular aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 43: 171-172.
29. Feng Y, Yang JH, Huang H, Kennedy SP, Turi TG, et al. (1999) Transcriptional profile of mechanically induced genes in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85: 1118-1123.
30. Cummins PM, von Offenberg Sweeney N, Killeen MT, Birney YA, Redmond EM, et al. (2007) Cyclic strain-mediated matrix metalloproteinase regulation within the vascular endothelium: a force to be reckoned with. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H28-42.
31. Cattaruzza M, Dimigen C, Ehrenreich H, Hecker M (2000) Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 14: 991-998.
32. Nguyen KT, Frye SR, Eskin SG, Patterson C, Runge MS, et al. (2001) Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 38: 1038-1043.
33. Qi YX, Qu MJ, Yan ZQ, Zhao D, Jiang XH, et al. (2010) Cyclic strain modulates

- migration and proliferation of vascular smooth muscle cells via Rho-GDIalpha, Rac1, and p38 pathway. *J Cell Biochem* 109: 906-914.
34. Chapman GB, Durante W, Hellums JD, Schafer AI (2000) Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H748-754.
35. Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS (2003) Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1778-1784.
36. Morrow D, Sweeney C, Birney YA, Cummins PM, Walls D, et al. (2005) Cyclic strain inhibits Notch receptor signaling in vascular smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 96: 567-575.
37. Kona S, Chellamuthu P, Xu H, Hills SR, Nguyen KT (2009) Effects of cyclic strain and growth factors on vascular smooth muscle cell responses. *Open Biomed Eng J* 3: 28-38.
38. Dobrin PB (1978) Mechanical properties of arterises. *Physiol Rev* 58: 397-460.
39. Faries PL, Agarwal G, Lookstein R, Bernheim JW, Cayne NS, et al. (2003) Use of cine magnetic resonance angiography in quantifying aneurysm pulsatility associated with endoleak. *J Vasc Surg* 38: 652-656.
40. van Keulen JW, van Prehn J, Prokop M, Moll FL, van Herwaarden JA (2009) Dynamics of the aorta before and after endovascular aneurysm repair: a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 38: 586-596.
41. Goergen CJ, Barr KN, Huynh DT, Eastham-Anderson JR, Choi G, et al. (2010) In vivo quantification of murine aortic cyclic strain, motion, and curvature: implications for abdominal aortic aneurysm growth. *J Magn Reson Imaging* 32: 847-858.
42. Williams B (1998) Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J Hypertens* 16: 1921-1929.
43. Sein TT, Thant AA, Hiraiwa Y, Amin AR, Sohara Y, et al. (2000) A role for FAK in the Concanavalin A-dependent secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Oncogene* 19: 5539-5542.
44. Kudo J, Yoshimura K, Hamano K (2007) Simvastatin reduces secretion of monocyte chemoattractant proteins and matrix metalloproteinase-9 in human abdominal aortic aneurysms. *Bull Yamaguchi Med School* 54: 47-56.

45. Ishibashi M (2004) Bone Marrow-Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor CCR2 Is Critical in Angiotensin II-Induced Acceleration of Atherosclerosis and Aneurysm Formation in Hypercholesterolemic Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: e174-178.
46. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, et al. (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 110: 625-632.