

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文(要約)

表 題 MYH11 遺伝子変異マウスを用いた大動脈解離の病態生理の解明

申請者氏名 根岸 経太

担当指導教員氏名 苅尾 七臣 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
循環器・呼吸器疾患学 分野  
心血管病学

使用文字数 3,091 字

## 論 文 要 旨

氏名 根岸 経太

### 表題

#### MYH11 遺伝子変異マウスを用いた大動脈解離の病態生理の解明

### 1 研究目的

遺伝性大動脈疾患のうち、特徴的な全身症状を伴わない家族性大動脈瘤/解離 familial thoracic aortic disease (FTAAD)は致命的でありながら発症前診断が極めて困難な疾患で、その予防・先制治療のために病態解明や新規診断指標の開発が強く望まれている。近年の遺伝性大動脈疾患に関する研究から、大動脈瘤/解離の病態として動脈硬化に伴う炎症系経路の亢進や transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )と angiotensin II (AngII)のシグナル経路の異常、elastin-contractile unitsを介した mechanotransduction の異常の関与が提唱されている。しかし FTAAD の病態生理に関しては適切な動物モデルが少なく、不明な点が多い。本研究では、本邦の FTAAD 家系から同定した変異 *MYH11* K1256del を導入した疾患モデルマウスを作成し、この変異マウスの表現型を、特に大動脈の組織病理を中心に解析して FTAAD の病態生理を解明することを目的とした。

### 2 研究方法

マウスとヒトにおいて *MYH11* K1256 付近にコードされるアミノ酸配列は種を越えて保存されており、*Myh11* K1256del を CRISPER-Cas9 系で C57BL/6 マウスに導入した。この遺伝子改変マウスに遺伝子型間 [野生型、ヘテロ型 (*Myh11*<sup>AK/+</sup>)、ホモ型 (*Myh11*<sup>AK/AK</sup>)] での表現型解析 (組織学的解析、生理学的解析、大動脈の遺伝子・蛋白発現解析) と AngII 持続投与による大動脈解離モデルの解析を行い、FTAAD の病態機序を検討した。また、*MYH11* 変異のミオシンタンパクへの影響を構造生物学的にシミュレーション解析し、FTAAD の分子病態も検討した。

### 3 研究成果

構造生物学的なシミュレーション解析では、*MYH11* K1256del はミオシン重鎖のロッド部の heptad repeat 配列を乱し、coiled-coil 構造を保持するアミノ酸残基の疎水性結合を弱め、ミオシンのフィラメント重合を障害することが予想された。

*MYH11* K1256del が生体内にもたらす影響を解析するため、本遺伝子変異を CRISPER-Cas9 系で導入した遺伝子改変マウスを作成した。*Myh11*<sup>AK/AK</sup> マウスは全例で動脈管開存を合併し、膀胱拡大や子宮低形成が認められ平滑筋収縮異常の存在が示唆されたが、大動脈瘤や大動脈解離は自然発生しなかった。繁殖については *Myh11*<sup>AK/AK</sup> 雌マウスは自然交配で正常に妊娠するものの、出産時に仔や母体の死亡が頻発し、子宮筋の形成・収縮不全の関与が推定された。

大動脈の組織学的な所見は、*Myh11*<sup>AK/AK</sup> マウスで弾性板の断裂と大動脈中層・外膜の肥厚を認めたが、大動脈疾患の血管病理である medial degeneration に特徴的な proteoglycan の集積や平滑筋細胞 smooth muscle cell (SMC) の局所的な喪失は認められなかった。*Myh11*<sup>AK/+</sup> マウスの大動脈は軽度ではあるがホモ体と類似した組織所見を示した。さらに大動脈組織の微細構造を観察するため、胸部下行大動脈の横断切片を広域電子顕微鏡で網羅的に観察した。その結果、*Myh11*<sup>AK/AK</sup> マウス

では野生型と比較し、細胞小器官の増加や細胞内外の myelin figure の出現などを認め、細胞ストレスの増大が示唆された。得られた電顕画像を元に形態学的なパラメータの定量解析を行ったところ、血管断面に対する弾性板の面積比率の低下や SMC 間の接着面の短縮が示された。それらの所見と一致して、western blot によるタンパク発現解析で *Myh11*<sup>ΔK/ΔK</sup> 大動脈のエラスチンと focal adhesion kinase (FAK) の発現が低下していた。一方で、平滑筋特異ミオシンや  $\alpha$  平滑筋アクチンなどの収縮タンパクの発現は変異体と野生型で変化は認められなかった。フェニレフリンを使用した大動脈の収縮特性の解析では、*Myh11*<sup>ΔK/ΔK</sup> 大動脈の収縮反応が有意に低下した。

2 週間の AngII 持続投与による大動脈解離誘発モデルを作成したが、*Myh11*<sup>ΔK/ΔK</sup> マウスのはほぼ全てが大動脈瘤破裂で死亡したため、解析は野生型と *Myh11*<sup>ΔK/+</sup> マウスのみで行った。AngII 負荷では野生型マウスの大動脈に病変は発生しなかったのに対して、*Myh11*<sup>ΔK/+</sup> 大動脈に多数の壁在血栓を認め、約 40% (15 匹中 6 匹) に大動脈解離が発生した。*Myh11*<sup>ΔK/+</sup> マウスに発生した解離病変は比較的小さい瘤径で胸部大動脈にも発生し、非解離部位では中膜のマクロファージ浸潤を認めないという、従来のモデルとは大きく異なる所見を示した。マクロファージは外膜に集簇しており、その程度は野生型より *Myh11*<sup>ΔK/+</sup> 大動脈で高度であった。

#### 4 考察

大動脈瘤/解離の分子病態の解析には高コレステロール血症マウスへの AngII 持続投与が疾患モデルとして広く行われてきた。その病理は中膜のマクロファージ集簇による大動脈壁のリモデリングを特徴とし、腹部大動脈に局限した大動脈瘤/解離を誘発する。一方で *Myh11*<sup>ΔK/+</sup> マウスへの AngII 負荷では、比較的小さな径の解離病変や壁在血栓が部位によらず発生し、マクロファージの集簇は外膜に局限していた。AngII 処理を受けていない変異大動脈では fibroblast の増殖と思われる外膜肥厚が認められることから、AngII 刺激に対する外膜の炎症反応の亢進が *Myh11* K1256del 変異大動脈における大動脈解離発症の病態に含まれると考えられた。

広域電子顕微鏡で示された変異大動脈での細胞接着と弾性板の変化は western blot によるタンパク質発現解析の結果と一致していた。弾性板の減少は、機械的ストレスに応じて大動脈組織の EMC 構成を調整する elastin-contractile units の機能不全を示唆しており、本変異によるミオシンフィラメントの重合低下が mechanotransduction に影響し、大動脈壁を構造的に脆弱化させられると思われた。

本変異はミオシンモーター部に位置せず、大動脈組織の収縮タンパクの発現も低下させなかったが、SMC の収縮特性を減弱化させた。平滑筋の効率的な力の発生には SMC の膜下の細胞骨格の安定性が重要であり、ミオシンフィラメントの重合障害が *Myh11*<sup>ΔK/ΔK</sup> 型 SMC の細胞骨格を障害し、収縮機能に影響すると思われた。この収縮特性の減弱は変異大動脈の内腔拡大はもたらさなかったが膀胱と子宮で特徴的な病理所見を示し、FTAAD 患者での泌尿器/女性器に関連した合併症の潜在的なリスクを示唆している。また、動脈管が開存しながら長期生存するマウスは報告されておらず、本変異マウスは動脈管開存症の疾患モデルとしても有用である。

#### 5 結論

本研究では *Myh11* K1256del がエラスチン発現の低下による大動脈の構造的脆弱性と SMC 収縮特性が低下することによる機械的ストレスに対する適応性低下をもたらすことが示された。この構造的脆弱性と機械的適応性の障害は大動脈の組織ストレスを増加させ、大動脈解離発症のリスクを上昇させられると思われた。今後このマウスを用いて大動脈解離・瘤に有効な治療薬の探索などに活用することで FTAAD の治療法確立に寄与することが可能である。