

c-Jun N-terminal kinase抑制による大動脈瘤薬物治療

吉村 耕一¹ 青木 浩樹¹ 秋山 紀雄² 古谷 彰²
濱野 公一² 松崎 益徳¹

要 旨：大動脈瘤の治療は外科的治療に限られているが、より低侵襲な治療法が望まれている。われわれは、JNK活性化により細胞外基質の分解亢進と合成阻害が同時に生じるという動脈瘤の病態機序を発見した。さらに、JNK阻害剤を動脈瘤モデルマウスに投与し、瘤の形成阻止が確認されたのみならず、一旦形成された瘤に対する瘤退縮治療効果を実証した。薬物的JNK抑制は動脈瘤を退縮しうる根治的治療であり、新たな治療選択肢となりうる。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 637–641)

Key words: aortic aneurysm, JNK, pharmacologic therapy

はじめに

大動脈瘤は、破裂により死に至る临床上重要な疾患である。現在、外科的治療以外に有効な治療法はないため、高齢者や手術困難なハイリスク患者に対する新規治療法の開発は急務である。大動脈瘤は、細胞外基質分解酵素の異常な活性亢進に伴う不可逆的な壁構造の破壊変化と認識されており¹⁻³⁾、薬物的に退縮治療させることはこれまで非現実的と思われていた。細胞外基質分解酵素に対する阻害剤によって動脈瘤の形成が予防できることは動物実験で証明されていたが⁴⁾、すでにでき上がった瘤を退縮治療した報告はなかった。一方で、壁構造の分解亢進のみならず破壊された壁の修復能低下も大動脈瘤の病態に関わっている可能性が示唆されていた⁵⁾。最近われわれは、細胞内情報伝達分子であるc-Jun N-terminal kinase (JNK)^{6,7)}を治療標とすることにより、壁構造の分解を抑制すると同時に修復を促し、その結果マウス動脈瘤を退縮治療させることに成功した⁸⁾。本稿では、JNK抑制により動脈瘤の病態が改善される分子メカニズムを概説し、さらに本研究の臨床的意義について考察する。

ヒト大動脈瘤壁におけるJNK活性

手術時に採取した腹部大動脈瘤の瘤壁では、対照大

動脈壁に比しJNK活性が著しく亢進していた(Fig. 1A)。瘤壁におけるJNK活性レベルは、主な壁構成成分であるコラーゲンとエラスチンを基質とする分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinase: MMP-9)の発現とよく相関していた。さらにJNK活性は、瘤壁のマクロファージと平滑筋細胞において亢進していた⁹⁾。マクロファージは瘤壁における主なMMP-9分泌細胞であり、平滑筋細胞はコラーゲンとエラスチンを生合成する。以上から、動脈瘤におけるJNK活性化は、MMP-9を介して基質分解系に関わると同時に基質の合成系にも関与する可能性が推察された。

ヒト瘤壁に対するJNK抑制の効果

ヒト動脈瘤におけるJNK活性の役割を明らかにするために、培養系でJNK抑制実験を行った。ヒト腹部大動脈瘤壁を培養すると、無処置(control)でもMMP-9の分泌が検出される。このMMP-9分泌は、特異的JNK阻害剤SP600125⁹⁾で顕著に抑制された。また、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF- α)添加によりMMP-9分泌は増加するが、このサイトカイン反応性MMP-9分泌もJNK阻害剤により有意に抑制された(Fig. 1B)。したがって、ヒト瘤壁に対するJNK抑制は、MMP-9を強力に抑える有用な方法であり、動脈瘤の形成予防に有用である可能性が考えられた。

¹山口大学医学部分子脈管病態学講座

²山口大学医学部器官制御医科学(第1外科)

2006年4月3日受付 2006年6月9日受理

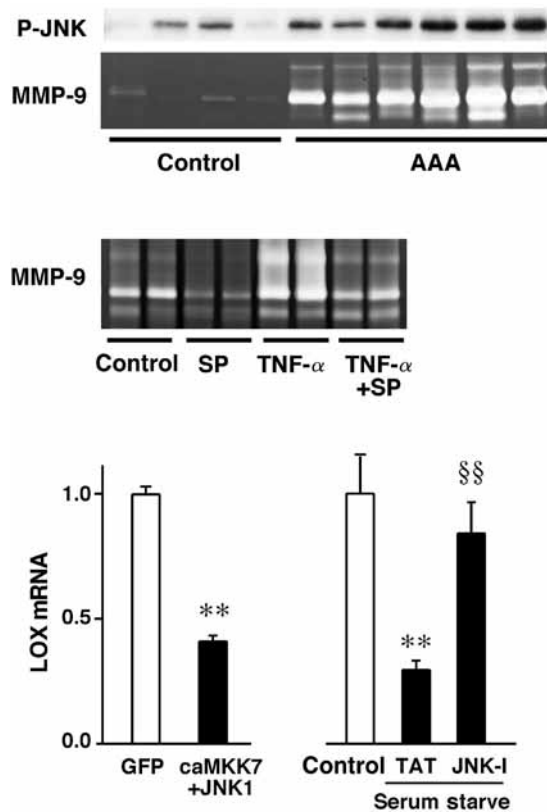


Figure 1 Role of JNK on pathogenesis of AAA. A: Protein expression of phosphorylated JNK (P-JNK) and MMP-9 in human control aorta and AAA, determined by western blotting and gelatin zymography, respectively. B: Effect of SP600125 (SP), a specific JNK inhibitor, on secretion of MMP-9 from human AAA *ex vivo* culture, determined by gelatin zymography. C: Role of JNK on mRNA expression of LOX in vascular smooth muscle cells. JNK was either activated by over-expression of constitutively active MKK7 and JNK1, or inhibited by a peptide inhibitor (JNK-I). Data are means $\pm$ SE (n = 6) as shown by fold change compared with GFP or control. **: p < 0.01 compared with GFP or control, §§: p < 0.01 compared with a control peptide (TAT). JNK: c-Jun N-terminal kinase, MMP: matrix metalloproteinase, AAA: abdominal aortic aneurysm, TNF: tumor necrosis factor, LOX: lysyl oxidase, GFP: green fluorescent protein. Based on reference 8.

JNK抑制による動脈瘤形成の予防

生体でのJNK抑制効果を検討するため、塩化カルシウム刺激によりマウス腹部大動脈に徐々に拡大する動脈瘤モデル¹⁰⁾を作製した。生理食塩水処置に比し、カ

ルシウム処置した動脈壁ではJNK活性とMMP-9の増加が確認され、著しい大動脈径の拡大が認められた。この実験モデルにおいてカルシウム処置直後からJNK阻害剤を全身投与するとJNK活性とMMP-9の両方が抑制されるとともに動脈瘤の形成が、ほぼ完全に阻止された。すなわち、JNK抑制によって動脈瘤の形成を予防できることがマウス動脈瘤モデルにおいて検証された。

JNK活性と基質合成酵素

動脈壁の主たる構成基質はコラーゲンとエラスチンであり、これらによって壁の強度と弾性が保たれている。活性化型MKK7の遺伝子導入により培養血管平滑筋細胞のJNKを特異的に活性化させると、コラーゲンやエラスチンの生合成に必須なプロリン水酸化酵素 (prolyl 4-hydroxylase: P4H) とリジン酸化酵素 (lysyl oxidase: LOX) のmRNA発現はいずれも有意に低下した。さらに、炎症性サイトカインTNF- α による刺激でP4H発現は低下するが、JNK阻害剤により顕著に回復した。無血清培養による飢餓刺激ではLOX発現が低下するが、JNK抑制によりこのLOX低下は阻止された (Fig. 1C)。したがって、動脈瘤壁におけるJNK活性化は平滑筋細胞のP4HとLOX発現の低下をもたらし、瘤壁の修復治癒に必要な基質合成を妨げている可能性が考えられた。

さらに、JNK抑制はMMP-9による基質分解系を阻害するのみならず、P4HとLOXを介して基質合成系を回復しうることが培養実験で明らかにされた。また、マウス動脈瘤予防実験において、瘤壁のJNK活性亢進は薬物的に抑制可能であった。これらの結果から、一旦でき上がったマウス動脈瘤をJNK阻害剤によって退縮治癒に向かわせる可能性を見出すことができた。

JNK抑制による動脈瘤の退縮治癒

予防実験と同様、塩化カルシウム刺激によるマウス腹部大動脈瘤モデルを用いた。この実験モデルでは、カルシウム処置後6週目に有意な大動脈径拡大が認められる。瘤壁ではJNK活性とMMP-9の増加を伴っており、組織学的にはエラスチン線維の断列、菲薄化、減少が観察され、ヒトの大動脈瘤の特徴を備えている。無治療ではさらに6週間観察しても径の自然な縮小は認めない。以上から、動脈瘤モデルが確立するカルシ

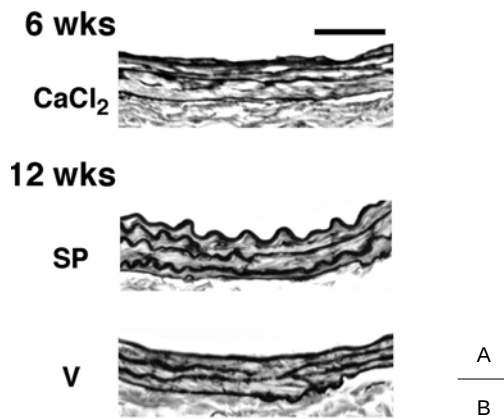
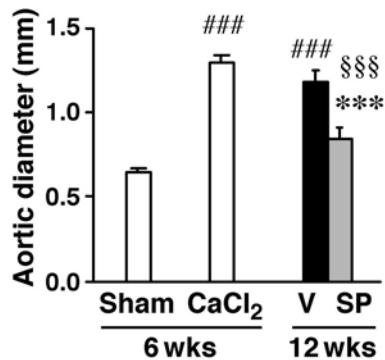


Figure 2 Regression of AAA by JNK inhibition.
A: Effect of JNK inhibitor on the size of AAA. Aortic diameters were determined 6 weeks after the CaCl₂ treatment or sham operation, and after an additional 6 weeks of vehicle (V) or SP600125 (SP) treatment. Data are means $\pm$ SE (n = 9).
 ***: p < 0.001 compared with those at 6 weeks after the CaCl₂ treatment, §§§: p < 0.001 compared with vehicle treatment, ###: p < 0.001 compared with sham operation
B: Effect of JNK inhibitor on the tissue architecture. Morphology of elastic lamella is shown by elastica van Gieson staining. Bars indicate 40 μ m.
 AAA: abdominal aortic aneurysm, JNK: c-Jun N-terminal kinase
 Based on reference 8.

ウム処置後 6 週目に JNK 阻害剤の投与を開始し, JNK 抑制治療による動脈瘤の退縮効果を検証した。その結果, JNK 阻害剤の投与開始後 6 週目のマウス大動脈径は, 治療開始前(すなわちカルシウム処置後 6 週目)および無治療で同時期が経過したもの(vehicle)に比べ著しく縮小していた(Fig. 2A)。さらにこの退縮変化は, 組織構築の修復を伴ったものであった。すなわち, 無

治療ではエラスチン線維の構築破壊が持続し, 修復傾向は認めないが, JNK 抑制治療後のマウス大動脈では, エラスチン線維の断列, 菲薄化像が減少し, 特有の波状構造が回復していた(Fig. 2B)。

以上から, すでに拡大し確立したマウス動脈瘤に対する JNK 抑制治療は, 瘤径を縮小させるとともに組織構築も回復させ, 瘤を退縮治癒することが明らかとなった。同様に, ヒトの大動脈瘤に対しても薬物的 JNK 抑制治療により退縮治癒効果がもたらされる可能性が十分に期待される。

トランスレーショナルリサーチとしての 本研究の臨床的意義

大動脈瘤に対する治療法は, 現在のところ従来の人工血管置換術またはステントグラフト内挿術の 2 種類の外科的治療に限られている。大動脈瘤治療の目的は破裂死の予防・阻止であり, 破裂率と最も相関の高い瘤径によって治療の適応が決定されている¹¹⁾。例えば腹部大動脈瘤の場合, 瘤径 4cm 未満のものはほとんど破裂の危険性がなく, 経過観察することが推奨される^{12, 13)}。

腹部大動脈瘤の瘤径が 5cm あるいは 5.5cm 以上では破裂の危険性が少なくないため, 速やかな外科的根治治療が必要である。この場合, 耐術可能で解剖学的な適応があれば従来手術とステントグラフト治療の治療成績はほぼ同等と報告されており^{14, 15)}, 患者ごとにいずれかの外科的治療を選択すべきであって, 薬物治療を悠長に選択する余地はほとんどないと考える。一方, 全身状態不良で従来手術に耐術不能な症例に対してステントグラフト治療の有用性が期待されていたが, 最近の大規模臨床試験で否定的な結果が報告された¹⁶⁾。したがって, 耐術不能例に対しては JNK 阻害薬による動脈瘤薬物療法が最も有効な治療法になりうる可能性がある。

また, 瘤径 4cm から 5.5cm 程度の小径腹部大動脈瘤では, すぐに破裂する危険性は高くないが, やがて拡大し破裂の危険性が高まる。欧州¹⁷⁾と米国¹⁸⁾における二つの大規模臨床試験の結果, 発見次第速やかに手術を実施する治療方針は必ずしも生命予後を改善せず, 経過観察の後, 瘤径拡大により破裂の危険性が高まった場合に手術を行う治療方針と同程度の成績であった。この結果を踏まえると, 薬物的 JNK 抑制療法は, 小径大動脈瘤に対する治療の第一選択としてたいへん魅力

的である¹⁹⁾。

JNK抑制による動脈瘤薬物治療は，マウスモデルにおける効果を実証したばかりであり，トランスレーショナルリサーチとして臨床応用を目指すにはさらに多くの研究成果が求められる²⁰⁾。本研究成果がこの分野の研究発展に少なからず貢献し，臨床の場で役立つような研究の進展に繋がっていくことを期待したい。

文 献

- 1) Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK: Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl Surg*, 2002, **39**: 110–230.
- 2) Baxter BT: Could medical intervention work for aortic aneurysms? *Am J Surg*, 2004, **188**: 628–632.
- 3) Pyo R, Lee JK, Shipley JM et al: Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 2000, **105**: 1641–1649.
- 4) Petrincic D, Liao S, Holmes DR et al: Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg*, 1996, **23**: 336–346.
- 5) Huffman MD, Curci JA, Moore G et al: Functional importance of connective tissue repair during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Surgery*, 2000, **128**: 429–438.
- 6) Davis RJ: Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 2000, **103**: 239–252.
- 7) Manning AM, Davis RJ: Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**: 554–565.
- 8) Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y et al: Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med*, 2005, **11**: 1330–1338.
- 9) Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW et al: SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, **98**: 13681–13686.
- 10) Longo GM, Xiong W, Greiner TC et al: Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*, 2002, **110**: 625–632.
- 11) Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW Jr et al: Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg*, 2003, **37**: 1106–1117.
- 12) Kent KC, Zwolak RM, Jaff MR et al: Screening for abdominal aortic aneurysm: a consensus statement. *J Vasc Surg*, 2004, **39**: 267–269.
- 13) Brady AR, Thompson SG, Fowkes FG et al: Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation*, 2004, **110**: 16–21.
- 14) Blankensteijn JD, de Jong SE, Prinssen M et al: Two-year outcomes after conventional or endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*, 2005, **352**: 2398–2405.
- 15) EVAR trial participants: Endovascular aneurysm repair versus open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1): randomised controlled trial. *Lancet*, 2005, **365**: 2179–2186.
- 16) EVAR trial participants: Endovascular aneurysm repair and outcome in patients unfit for open repair of abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 2): randomised controlled trial. *Lancet*, 2005, **365**: 2187–2192.
- 17) United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants: Long-term outcomes of immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*, 2002, **346**: 1445–1452.
- 18) Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR et al: Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*, 2002, **346**: 1437–1444.
- 19) Thompson RW: Aneurysm treatments expand. *Nat Med*, 2005, **11**: 1279–1281.
- 20) Waetzig V, Herdegen T: Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, **26**: 455–461.

Pharmacological Regression of Established Abdominal Aortic Aneurysm by Inhibition of c-Jun N-terminal Kinase

Koichi Yoshimura,¹ Hiroki Aoki,¹ Norio Akiyama,² Akira Furutani,² Kimikazu Hamano,² and Masunori Matsuzaki¹

¹Department of Molecular Cardiovascular Biology and ²First Department of Surgery,
Yamaguchi University School of Medicine, Yamaguchi, Japan

Key words: aortic aneurysm, JNK, pharmacologic therapy

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is characterized by chronic inflammation and proteolytic degradation of extracellular matrix (ECM). Recently, we have identified c-Jun N-terminal kinase (JNK) as a proximal signaling molecule in the pathogenesis of AAA. With human AAA tissue showing a high level of active JNK, we succeeded in demonstrating that JNK not only activates the expression of ECM degrading enzymes, but also suppresses the expression of ECM biosynthetic enzymes. Furthermore, specific inhibition of JNK *in vivo* not only prevented the development of AAA but also caused the regression of established AAA in our mouse models. Thus, JNK appear to represent a promising therapeutic target to achieve regression of human AAA. (J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 637–641)