

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09688

研究課題名(和文)炎症関連因子 血管平滑筋脱分化を標的とした肺動脈性肺高血圧の新規治療法の開発

研究課題名(英文) New treatment for pulmonary arterial hypertension targeting on inflammation-dedifferentiation pathway

研究代表者

三谷 義英 (Mitani, Yoshihide)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60273380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧(PAH)は、特発性ないし先天性心疾患、膠原病などに二次性に発症する難治性疾患で、新たな治療法開発には更なる病態解明が重要である。最近、ヒトPAH類似の特徴的な組織病変を有する動物モデルが開発され、病変の進展と退縮における血管平滑筋の形質転換と炎症細胞の関連を報告してきた。そこで本モデルの網羅的遺伝子発現プロファイルからの炎症関連因子の同定、局在性の評価と培養平滑筋細胞の形質転換モデルでの細胞生物学的評価を行い、in vivoでの病変の進展と退縮効果と分子細胞機序を解明し、肺高血圧の新たな治療標的を見いだす事が本研究の全体構想である。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an intractable disorder, which is idiopathic or occurs secondarily to congenital heart diseases, collagen diseases or other conditions. Development of new therapies on the basis of the well-defined therapeutic targets is essential for overcoming this condition. We recently uncovered the role of dedifferentiated smooth muscle cells and inflammatory cells in the development of a human PAH-like rat models. We therefore searched therapeutic targets on the basis of the differentially expressed genes related to dedifferentiation and inflammation in such models operating under the endothelin receptor blockade. We found that endothelin receptor blockade reversed pulmonary vascular diseases in the early treatment, which was associated with two differentially-expressed genes. We abrogated one unverified target in this model by receptor antagonists. We could found one of the compound ameliorated pulmonary vascular diseases in this condition.

研究分野：小児科学

キーワード：肺高血圧 肺動脈性肺高血圧 治療 病態 炎症 血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧における肺血管病変の組織病変の進行過程、治療による退縮過程とその分子機序を解明する事は、本症の新たな治療法を開発上で重要である。我々はこれまで、内皮機能低下、下流の cGMP、内皮活性化と macrophage の浸潤、平滑筋の形質転換、血管収縮亢進、プロテアーゼの PAH への関与を動物モデル、培養血管平滑筋系、患者検体 (Mitani Y. Circulation 1997, Mitani Y. Thorax 1999, Mitani Y. FASEB J 2000, Mitani Y. Eur Respir J. 2000, Mitani Y. Eur Respir J 2001, Mitani Y. J Appl Physiol 2002, Sawada H, Mitani Y. Chest 2007, Mitani Y. J Thorac Cardiovasc Surg 2008, Mitani Y. Int J Cardiol 2011, Sawada H, Mitani Y. J Exp Med 2014)を用いて報告してきた。しかし、従来の動物モデルにおいて、Grade 1 の病変が認められるのみで、上記の Grade 2-4 の閉塞性内膜病変は再現できない事が問題であった。

最近、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体チロシンリン酸化酵素阻害剤投与下に3週間の0.5気圧の慢性低酸素暴露によるヒトPAH様ラットモデルが報告された(Abe K. Circulation 2010)。我々は、このモデルを用いて、閉塞性内膜病変の進展における脱分化型平滑筋(SMA+SM1+SM2±)と炎症細胞浸潤(CD68+macrophage)の関与、さらに炎症性サイトカインの関与を報告してきた(Otsuki S, Mitani Y, YIA finalist investigator, American Heart Association 2013, PLOS ONE in revision)。

さらに新規 Endthelin 受容体拮抗薬 Macitentan が、興味ある事に本モデルの閉塞性内膜病変を初めてリバーズする事を報告した (Shinohara T, Mitani Y, シンポジウム、日本小児循環器学会 2014, Am J Physiol in revision)。

そこで本モデル肺で発現亢進し、Macitentan で抑制する遺伝子の網羅的遺伝子解析を行った所、興味ある事に炎症・細胞分化関連因子遺伝子発現の有意変化(52 genes)を認めた。その中

で、炎症と細胞の未分化維持に関わり得る MCP-1 の病変での発現を確認し、他の因子も含めて検討中である。

本研究では、52 遺伝子産物の中から、脱分化因子(血小板由来増殖因子 PDGF)により誘導した培養平滑筋脱分化の促進・抑制効果を評価し、in vivo で炎症・分化関連因子の阻害剤投与、遺伝子導入の病変抑制効果の検討により、炎症・平滑筋脱分化系制御の PAH 組織病変抑制効果を評価する。

2. 研究の目的

当施設で病変抑制効果を確認済みの macitentan と、別に候補薬剤を選定した MCP1(CCL2)阻害剤(RS504393)を用いて、血行動態、組織病変抑制効果を検討し、炎症関連遺伝子プロファイル、血管平滑筋脱分化への影響を、in vivo で検討した。

3. 研究の方法

1) macitentan, RS504393, in vivo 効果と平滑筋分化能、炎症細胞浸潤、遺伝子発現解析。2) 52 候補遺伝子から病変局在、平滑筋脱分化能評価による候補遺伝子抽出と in vivo の効果判定。

(1) ヒトPAH類似ラットモデルの作成

ラットに VEGF 受容体チロシンリン酸化酵素阻害剤(Sugen 5416,20mg/kg,1回皮下注)(Sigma)を投与後、1/2気圧(380 mmHg, 10%酸素、標高5,500mの高山に相当)21日間の慢性低酸素暴露刺激を加える。Sugen 投与後、評価病日で心カテを行い、屠殺、組織採取を行う (Mitani Y et al. Circulation 1997)。

(2) 肺高血圧の評価

評価日に小動物用心エコー検査装置(TOSHIBA, NEMIO 35, 12.0 MHz)を用いて左室変形を評価し、内頸静脈より右室圧、大動脈圧を測定後、心肺組織を摘出する。右室肥大は、重量比により評価する。気管切開、人工呼吸下で開胸し、肺凍結サンプル、還流固定肺を作成する。(Mitani Y et al. Circulation 1997)。

(3) 組織の免疫染色

切片の免疫染色は、平滑筋抗体抗 SMA 抗体 1A4(Dako)、平滑筋形質特異的抗体 SM1(Yamasa), SM2(Yamasa)、マクロファージ抗体 CD68 (ED1, Millipore), 抗 PCNA 抗体 PC10(Dako),抗内皮細胞 vWF 抗体(Millipore)、今回抽出した遺伝子産物に対する抗体を用いて、Iso-IHC DAB kit (InnoGenex)により ABC 法並びに共焦点顕微鏡により、既報の方法に準じて行う(Mitani Y, Eur Respir J. 2001)(Mitani Y, et al Thorax1999.)。

(4) mRNA、蛋白発現解析

total RNA を TRIzol reagent (Invitrogen)を用いて抽出し、cDNA を作成し、の発現を既報により PCR 法で評価する。また学内の設備を用いて、Laser microdissection(ARCTURUS, AB applied biosystems)により内膜肥厚の組織を採取し、mRNA 発現解析を行う。(Sawada H, Mitani Y et al, J Exp Med 2014)

(5) 網羅的発現解析、In silico 解析

miRNeasy Mini kitを用いてRNA抽出を行い、RNAの増幅(Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent Technologies)、マイクロアレイ解析 (Agilent Technologies, SurePrint G3 Rat 8x60k ver. 1 color 8解析)を行う(Hokkaido System Science Co. Ltd)。既報に従いアレイデータを RankProdを用いて発現差の解析を行い、Pathway Studio 7(Ariadne Genomics, Rockville, MD, USA)を用いて、pathway解析を行う。(Umemoto N, Nishimura Y, Shimada Y, Tanaka T et al. Mol Biotechnol. 2013;55(2):131-42.)

(7) ヒトPAHラット個体での薬剤の効果判定: 個体の治療protocol

macitentan, RS504393,のin vivo効果(血行動態指標、組織病変指標、炎症細胞浸潤、遺伝子発現解析)と培養細胞における平滑筋脱分化能への影響を検討する。薬剤は、胃ゾンデ、Osmotic pump、腹腔内投与等、薬剤に応じた方法で行い、本モデルの3-5週(治療protocol)で行う。検討は、無治療健常群、開始時疾患対象

群(3週)、疾患対照群(5週)、治療群(5週)の4群で行う。

(8) 網羅的解析結果、血管平滑筋脱分化能評価に基づく治療標的の解析(三谷義英、Zhang E)

52 遺伝子産物の中から、平滑筋脱分化能、病変局在に応じてターゲットを決定し、阻害剤等の薬剤投与、遺伝子導入 (Mitani Y. J Thorac Cardiovasc Surg 2008)により、上記のモデルの実験群で、肺高血圧病変の抑制効果を検討する。さらに特に着目した治療群肺の網羅的遺伝子解析を行う。

また、遺伝子導入で生物学的効果が得られない事もあり、可能な薬剤を用いて効果を判定する。上記の実験を行いながら、遺伝子導入、可能な薬剤投与により治療標的を決定して行く。研究の進行に応じて、十分な効果の得られない場合は、グループで討議し、0-3 週に薬剤投与を行う予防 protocol の採用、既に幾つかの実験系で陽性結果が得られつつある macitentan, RS504393, Imatinib の投与結果に網羅的遺伝子発現解析を組み合わせた in silico 解析も含めて総括して行く。

4. 研究成果

(1) マシテンタンは肺血管新生内膜線維性閉塞病変を予防する: Sugen/Hypoxia 肺高血圧ラットモデルでの検討

肺切片直径 50 μ m 以下の全血管に対する新生内膜線維性閉塞病変の発現率は、治療直前 PH 群 $0.5 \pm 0.3\%$ 、無治療 PH 群 $5.5 \pm 2.1\%$ ($p < 0.05$ vs 治療直前 PH 群)、マシテンタン治療 PH 群 $0.5 \pm 0.2\%$ ($p < 0.05$ vs 無治療 PH 群)。閉塞血管面積に対する新生内膜の線維化面積率は、治療直前 PH 群 $6.1 \pm 0.9\%$ 、無治療 PH 群 $14.9 \pm 0.5\%$ ($p < 0.05$ vs 治療直前 PH 群)、マシテンタン治療 PH 群 $6.1 \pm 1.1\%$ ($p < 0.05$ vs 無治療 PH 群)であり、線維性閉塞病変発現率と線維化面積率ともに、有意にその予防効果を認めた。新生内膜線維性閉塞病変の発現は、右室収縮期圧($r=0.420$, $p=0.009$)、右室肥大($r=0.504$,

p=0.001)、閉塞血管出現率(r=0.499、p=0.001)と相関関係を示した。肺組織の遺伝子発現は Collagen1a1 において正常対照群に対する比率が、無治療 PH 群 1.44 ± 0.1 (p < 0.05 vs 正常対照群)、マシテンタン治療 PH 群 $1.42 \pm 0.1\%$ (p < 0.05 vs 正常対照群)であり、無治療 PH 群とマシテンタン治療 PH 群に有意差はなかった。

Fibronectin1 は無治療 PH 群 1.48 ± 0.08 (p < 0.05 vs 正常対照群)、マシテンタン治療 PH 群 1.13 ± 0.06 (p < 0.05 vs 無治療 PH 群)でありマシテンタン治療により有意に減少した。

結論: マシテンタン治療により肺高血圧ラットの新生内膜線維性閉塞病変を予防した。以上は、Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015 に報告した。

(2) 閉塞性肺血管病変の新規治療標的の網羅的遺伝子解析による探索

早期治療時期において、SuHx 群は、対照群と対比して 427 遺伝子発現差が認められ、その内 102 遺伝子発現が ERA で制御された。102 遺伝子の中で、後期治療時期にも発現差を認め治療で制御された 24 遺伝子を除き 78 遺伝子を得た。それらの遺伝子発現は、炎症と細胞分化に関わった。最終的に endothelin 受容体、炎症、細胞分化と細胞死に関わる 2 つの遺伝子を選んだ。本研究では、その中で報告のない 11 因子の阻害剤を投与し、肺動脈圧の低下、肺血管閉塞性病変の改善効果を検討した。しかし、阻害剤投与では、肺高血圧と血管病変の改善効果は乏しかった。その標的因子の受容体の欠損動物を作成した。現在、作成に成功しており、現在同モデルの病変進展効果研究に繋がった。

結語: 今後、候補遺伝子の validation と臨床的に早期発見の方法の確立が重要と考えた。

以上は、米国循環器学会 2017 で報告し、現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 5 件)

1: Comparative Transcriptome Analysis Identifies CCDC80 as a Novel Gene Associated with Pulmonary Arterial Hypertension

Nishimura Y, Sasagawa S, Sawada H, Mitani Y, Maruyama K, TANAKA T

Front Pharmacol. 2016 Jun 7;7:142. doi: 10.3389/fphar.2016.00142. eCollection 2016

(査読あり)

2: Detrimental Impact of Vasopressin V2 Receptor Antagonism in a SU5416/Hypoxia/Normoxia-Exposed Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension.

Goto I, Dohi K, Ogihara Y,, Mitani Y, Ito M.et al. Circ J. 2016 Mar 25;80(4):989-97.

(査読あり)

3: Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin 5HT2A receptor antagonist, ameliorates the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats.

Zhang E, Maruyama J, Mitani Y, Sawada H, Maruyama K.et al.

J Anesth. 2015 Oct;29(5):715-23.

(査読あり)

4: Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats: early intervention in overcoming the survivin-mediated resistance to apoptosis. Shinohara T, Sawada H, Mitani Y. et al.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015 Mar 15;308(6):L523-38.

(査読あり)

5: Otsuki S, Sawada H, Mitani Y et al. Potential contribution of phenotypically modulated smooth muscle cells and related inflammation in the development of experimental obstructive pulmonary vasculopathy in rats.

PLoS One. 2015 Feb 25;10(2):e0118655.

(査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

1: Mitani Y. Early Detection of Pulmonary Arterial Hypertension in Apparently Healthy Children by Mandatory School Electrocardiography Screening: A Japanese Nationwide Survey

World Symposium on Pulmonary Hypertension, Nice Feb 2018

2: Mitani Y, Sawada H, Hirayama M.

Differentially Expressed Genes in Early and Late Treatment for Occlusive Pulmonary Vasculopathy in Sugen/hypoxia Models: Molecular Basis for Early Treatment

American Heart Association (Anaheim, California) 2017.11

3: Mitani Y. Fundamental insight into pulmonary vascular disease: Perspectives from pediatric PAH

The 8th Takao Symposium (Mtsue, Japan) Oct 2017

4: Sawada H, Ohashi H, Mitani Y . Lung Biopsy Findings in Children with Severe Pulmonary Hypertension Which is Associated with but Unexplained by Coexisting Congenital Systemic to Pulmonary Shunt: Implications into the Role of Acute Vasodilator Testing in Operability
American Thoracic Society (Washington D.C.) 2017.5.20

5: Mitani Y. The use of EKG as a screening tool
10th International conference of neonatal & Childhood Pulmonary Vascular Disease (San Francisco, March, 2017)

6: 三谷義英
閉塞性肺血管病変の新規治療標的の網羅的遺伝子発現解析による探索
第1回日本肺高血圧肺循環学会 (10.2.2016、東京)

7: Mitani Y. How does macitentan work in occlusive pulmonary vasculopathy?

15th International PH forum (Barcelona, Spain, 3.18-20, 2016)

8: Mitani Y. What is the Cellular Target in Occlusive Pulmonary Vasculopathy?: New Insights

Immature Smooth Muscle Cells

American Heart Association (Orland, 2015 Nov)

9: Shinohara T., Sawada H., Mitani Y. et al. Macitentan Reverses Early Obstructive Pulmonary Vasculopathy in Rats: Early Intervention in Overcoming the Survivin-mediated Resistance to Apoptosis
Association for European Pediatric and Congenital Cardiology (Praph, 2015 May)

[図書] (計 3 件)

1: Mitani Y (分担執筆)

Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension-From Bench to Bedside.

(Chapter 15, Pathophysiology and Genetics: Bmpr2), 115-124, Springer, 2017

(総ページ数 236 ページ)

2: 三谷義英 (分担執筆)

Eisenmenger 症候群—小児から成人まで— (肺動脈の組織学的特徴)

医薬ジャーナル社, 32-38, 2017

(総ページ数 159 ページ)

3: Mitani Y (分担執筆)

Kawasaki Disease (Functional and Structural Alterations of Coronary Arteries Late after Kawasaki Disease and the Risk of Acute Coronary Syndrome in Adults), 421-426, Springer, 2016.

(総ページ数 552 ページ)

[産業財産権]

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

1)研究代表者

三谷 義英 (MITANI Yoshihide)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 60273380

(2)研究分担者

澤田 博文 (SAWADA Hirofumi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 30362354

丸山 一男 (MARUYAMA Kazuo)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 20181828

田中 利男 (TANAKA Toshio)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 00135443

西村 有平 (NISHIMURA Yuhei)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 30303720