

令和元年6月28日現在

機関番号：85306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09488

研究課題名(和文) 肺高血圧症罹患細胞により構築した血管モデルを用いた肺高血圧症進展機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of pulmonary vascular remodeling by using in vitro vascular models comprised of cells derived from patients with pulmonary hypertension

研究代表者

小川 愛子(Ogawa, Aiko)

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター(臨床研究部)・独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター(臨床研究部)・分子病態研究室長

研究者番号：40572748

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)：肺高血圧症は、肺小動脈の血管内腔が狭小化・閉塞し、右心不全に至る難治性疾患である。複数の肺高血圧症治療薬が開発されているものの、いまだ予後不良であり、発症進展機序の解明と新たな治療法の開発が急務である。

本研究では、肺高血圧症例由来肺動脈平滑筋細胞を導入した肺微小血管モデルを作成して送液培養を行い、病態の進展に関与すると考えられるメカニカルストレスの影響を詳細に解析した。その結果、メカニカルストレスが様々なシグナル伝達経路を介して遺伝子発現パターンを変化させ、肺動脈平滑筋細胞の増殖促進を誘導するなど、細胞の性質を変容させることが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新たに作製した血管モデルを用いることにより、肺高血圧症患者の肺微小血管が受けるメカニカルストレスが病態の進展に深く関与することを明らかにした。本研究結果は、肺高血圧症の発症機序を解明するための重要な手がかりとなるとともに、新たな治療標的分子に関する有益な情報をもたらしている。今後、血管モデルを用いて各種薬剤の治療効果の判定に応用することにより、肺高血圧症の新規治療法の開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary hypertension is characterized by stenosis and obstruction of pulmonary arteries, leading to right heart failure. Overall survival of patients with pulmonary hypertension has been reported to be unsatisfactory despite many drugs have become available. There is an urgent need for elucidating mechanisms of disease progression and development of new therapeutic options.

We established novel vascular models in this study using pulmonary arterial smooth muscle cells derived from patients with pulmonary hypertension. We perfused these models with culture media and analyzed effects of mechanical stress at a molecular level. As a result, mechanical stress modified property of smooth muscle cells such as proliferation rate, through activation of various signal pathways and gene expression.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧 微小血管モデル メカニカルストレス シグナル伝達

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症(pulmonary hypertension: PH)は、肺小細動脈の血管内腔が狭小化・閉塞するために肺動脈圧が上昇し、右心不全に至る難治性疾患である。現在、複数の PH 治療薬が開発されているものの、3 年生存率は 60%といまだ予後不良であり、発症進展機序の解明と新たな治療の開発が急務である。

肺小細動脈の狭小化・閉塞を引き起こす肺血管リモデリングの本態は、主に肺動脈平滑筋細胞(PASMC: pulmonary artery smooth muscle cells)の異常増殖と考えられているが、その詳細な発症機構は明らかにされていない。研究代表者はこれまでに、PH 患者由来 PASMC の単離技術を確立し、正常細胞との比較を行い、血小板由来増殖因子や凝固因子とその受容体が、PH の病態進展に中心的な役割を果たすことを明らかにしてきた (Circulation 2005, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009, Physiol Rep 2013)。

一方、PH 症例の蓄積に伴い、治療によりある程度改善した症例では、治療を強化しなくても臨床症状の改善が持続するのに対し、一旦血行動態が悪化した症例では治療に抵抗性を示すことが観察されている。即ち、血行動態の悪化自体が PH の病態悪化をさらに進行させる可能性がある。血行動態はメカニカルストレスの変化を介して、冠動脈や頸動脈等の動脈硬化を悪化させることが報告されているものの、メカニカルストレスの肺動脈への作用や PH 病態への影響はこれまでほとんど報告されていない。

肺動脈は体血管の約 1/10 程度の低圧の血管系であり、肺動脈特異的な現象である低酸素性肺動脈攣縮など、体血管とは異なる性質を有する。また、正常 PASMC と PH 症例の PASMC では増殖能やアポトーシス耐性など、様々な性質が異なることも報告されている。従って、肺動脈のメカニカルストレスへの反応性は、体血管とは異なる可能性がある。そこで、肺動脈壁由来細胞を用いてメカニカルストレスの作用を検証する必要があることから、PH 症例由来 PASMC を用いた新規微小血管モデルを構築し、メカニカルストレスを負荷して遺伝子の発現パターンの変化を解析することにより、病態解明と創薬の基盤づくりとなる本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、PH 症例から単離・培養した PASMC を用いて肺微小血管モデルを作成し、これにメカニカルストレスを負荷し、PH の病態進展に重要な PASMC の増殖を制御するメカニカルストレス関連分子機構を解明し、新規 PH 治療開発の基盤となる研究を行い、新規治療法の可能性を探索することを目的とした。本研究の実施により、既存の動物モデルや平面培養細胞を用いた研究手法の限界や問題点を克服しうる、新たな微小血管モデルを確立し、PH 病態悪化のメカニズムの解明に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

(1) PH 症例における肺動脈内メカニカルストレスの測定

PH 症例の肺動脈における各種指標を測定し、実際に肺動脈内で負荷されているメカニカルストレス値を算出した。なお、測定に関しては、当院臨床研究審査委員会の承認を受け、対象者からの同意を得て行った。

(2) PH 症例の PASMC の単離・培養

PH 症例の PASMC は、当院臨床研究審査委員会の承認を得てこれまでに取得しているものを使用した。すでに報告しているとおり、PH 症例より摘出された肺から肺動脈を採取し、その後酵素処理を行って PASMC を単離し、継代培養を行った (Circulation 2005, 他)。

(3) 血管モデル作製

ポリジメチルシロキサン素材を用いた流路チップ内で PASMC を培養することにより、PASMC1 層から成る血管モデルの作製を行った。なお、次項で述べるように、この方法では、負荷する条件によっては細胞剥離が起こることがあるため、PASMC と内皮細胞層を積層することにより 2 層構造の血管モデルを作製し (特許出願済み)、実験に使用した。

(4) 細胞の形態観察と発現たんぱく質の発現解析

血管モデル内の細胞の配向性を顕微鏡を用いて観察した。また、各種の抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて対象とするたんぱく質の発現とその局在を検討した。また、必要に応じて得られた画像から 3 次元イメージを構築し、詳細な解析を行った。

(5) 遺伝子発現パターンの解析

メカニカルストレスを負荷したことにより、遺伝子プロファイルがどのように変化するのかを明らかにするために、静置細胞と送液負荷細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、リアルタイム PCR 法により個々の遺伝子発現量の変化を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) PH 症例における肺動脈内メカニカルストレスの計測

PH 症例の肺動脈が実際に受けているシアストレス強度を算出したところ、これまでに他の血管疾患で報告されている値よりも高いことが明らかとなった。そこで、この値を、本研究で負荷すべき値とした。

(2) PH 患者由来 PSMC を用いた血管モデルの作製

まず、ポリジメチルシロキサン素材を用いた流路チップ内で PSMC を播種した 1 層の血管モデルを作製した。この 1 層血管モデルにペリスタポンプを用いて送液によるシアストレスを負荷したところ、PSMC が送液方向に配向性を示し、細胞増殖能が亢進することが明らかとなった(発表論文)。

しかしながら、1 層の PSMC のみから成る血管モデルにおいては、高いシアストレスの負荷により細胞剥離が起こり、血管モデルの維持が困難であった。そこで、コーティング方法や播種細胞数など適切な条件の検討を行った。さらに、研究代表者が既に確立していた静置培養下で PH 症例由来 PSMC に内皮細胞を積層する 2 層培養の手法を取り入れ、血管モデル流路内で PSMC に内皮細胞を積層した 2 層培養状態で送液可能な血管モデルを作製した。この新規 2 層構造血管モデルでは、高シアストレス条件下においても細胞が剥離することなく長期間の培養維持が可能であった。本血管モデルの作製方法を特許出願した(狩野光伸, 松崎愛子, 田中啓祥: モデル血管システム、シアストレス負荷用のモデル血管部及び循環器系疾患の治療薬のスクリーニング方法, 出願番号: JP2017-017692 出願日: 2017 年 2 月 2 日)。

(3) 血管モデルを用いたメカニカルストレスによる細胞応答の解析

上記(2)で開発した 2 層培養血管モデルに対して、シアストレスの強度を変化させて加え、細胞の形態変化や細胞増殖能を検討すると共に、シアストレスにより誘導される細胞内シグナル伝達経路を免疫染色や PCR などにより評価した。その結果、シアストレス負荷により、細胞の配向性と細胞増殖能の亢進、炎症が惹起されることが明らかとなった。また、シグナル伝達経路の解析からは、シアストレスにより、細胞の増殖や運動、ストレス応答の調節を担う細胞内シグナル伝達経路である TGF- β , PI3K, MAPK シグナル伝達経路などの活性化が誘導されるとともに、各種増殖因子の発現量が増加することが見出された。以上の結果から、シアストレスは、これらのシグナル伝達分子を介して PSMC の増殖や炎症をもたらし、PH の病態を悪化させる可能性が示された。そこで、シアストレスにより誘導される上記のシグナル伝達経路の阻害剤を始めとして、PH 症例由来 PSMC の細胞増殖能亢進を抑制する薬剤を探索したところ、複数の薬剤が候補として見出されている。

また、メカニカルストレスが PSMC の遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、マイクロアレイを用いて静置細胞と送液負荷細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、メカニカルストレスにより発現量の変動する遺伝子が多数見出されている。今後、これらの変動する遺伝子群の情報は、シアストレスが PSMC に与える影響と PH 発症のメカニズムを分子レベルで明らかにするための重要な手がかりとなり、新規 PH 治療薬のターゲットとして新たな薬剤開発への糸口となることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Chausheva S, Naito A, Ogawa A, et al. 12 名省略. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension in Austria and Japan. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019, in press, 査読有, DOI: 10.1016/j.jtcvs.2019.01.019.
2. Sato K, Nitta M, Ogawa A. A microfluidic cell stretch device to investigate the effects of stretching stress on artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Inventions*. 2019, 4, 1, 査読有, DOI: 10.3390/inventions4010001.
3. Ejiri K, Ogawa A, Fujii S, et al. 2 名省略. Vascular Injury Is a Major Cause of Lung Injury After Balloon Pulmonary Angioplasty in Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ Cardiovasc Interv*. 2018, 11, e005884, 査読有, DOI: 10.1161/circinterventions.117.005884.
4. Sato S, Ogawa A, Matsubara H. Change in R wave in lead V1 predicts survival of patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 2018, 8, 1-7, 査読有, DOI: 10.1177/2045894018776496.
5. Shimokawahara H, Ogawa A, Mizoguchi H, et al. 13 名省略. Vessel Stretching Is a Cause of Lumen Enlargement Immediately After Balloon Pulmonary Angioplasty: Intravascular Ultrasound Analysis in Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ Cardiovasc Interv*. 2018, 11, e006010, 査読有, DOI: 10.1161/circinterventions.117.006010.
6. Ogawa A, Takahashi Y, Matsubara H. Clinical prediction score for identifying patients with pulmonary veno-occlusive disease/pulmonary capillary hemangiomatosis. *J Cardiol*. 2018, 72, 255-60, 査読有, DOI: 10.1016/j.jjcc.2018.02.009.
7. Ogawa A, Satoh T, Fukuda T, et al. 13 名省略. Balloon Pulmonary Angioplasty for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Results of a Multicenter Registry. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2017, 10, e004029, 査読有, DOI:

- 10.1161/CIRCOUTCOMES.117.004029.
8. Ogawa A, Miyaji K, Matsubara H. Efficacy and safety of long-term imatinib therapy for patients with pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis. *Respir Med*. 2017, 131, 215-19, 査読有, DOI: 10.1016/j.rmed.2017.08.032.
 9. Higasa K, Ogawa A, Terao C, et al. 9 名省略. A burden of rare variants in BMPR2 and KCNK3 contributes to a risk of familial pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm Med*. 2017, 17, 57, 査読有, DOI: 10.1186/s12890-017-0400-z.
 10. Ogawa A, Satoh T, Tamura Y, et al. 2 名省略. Survival of Japanese Patients With Idiopathic/Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Cardiol*. 2017, 119, 1479-84, 査読有, DOI: 10.1016/j.amjcard.2017.01.015.
 11. Nagayoshi S, Ogawa A, Matsubara H. Spontaneous enlargement of pulmonary artery after successful balloon pulmonary angioplasty in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *EuroIntervention*. 2016, 12, e1435, 査読有, DOI: 10.4244/EIJ-D-15-00484.
 12. Sato K, Nakajima M, Tokuda S, et al. 1 名省略, 4 番目. Fluidic Culture and Analysis of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells for the Study of Pulmonary Hypertension. *Anal Sci*. 2016, 32, 1217-21, 査読有, DOI: 10.2116/analsci.32.1217.
 13. Kawakami T, Ogawa A, Miyaji K, et al. 7 名省略. Novel Angiographic Classification of Each Vascular Lesion in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Based on Selective Angiogram and Results of Balloon Pulmonary Angioplasty. *Circ Cardiovasc Interv*. 2016, 9, e003318, 査読有, DOI: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.115.003318.
 14. Tokunaga N, Ogawa A, Ito H, et al. 1 名省略. Rapid and high-dose titration of epoprostenol improves pulmonary hemodynamics and clinical outcomes in patients with idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension. *J Cardiol*. 2016, 68, 542-7, 査読有, DOI: 10.1016/j.jcc.2015.11.012.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 小川愛子. How to Diagnose PVOD/PCH. 第 83 回日本循環器学会学術集会. 2019.
2. 松原広己, 小川愛子. 肺静脈閉塞症 / 肺毛細血管腫症の臨床診断. 第 3 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会. 2018.
3. Ogawa A. Elucidating mechanisms of vascular remodeling in pulmonary hypertension. The 23rd Annual Scientific Meeting of International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy. 2018.
4. 小川愛子. 肺高血圧症の新たな治療展開. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 2018.
5. Matsubara H, Ogawa A. Survival of Patients with Pulmonary Hypertension -A Single Center Experience in Japan. 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. 2018.
6. Ogawa A, Shimokawahara H, Ejiri K, Matsubara H. Mechanism of Lumen Enlargement and Pulmonary Injury in Balloon Pulmonary Angioplasty for CTEPH. National Proceedings: CTEPH2017. 2017.
7. 小川愛子, 松原広己. PAH 診断のピットフォール. 第 65 回日本心臓病学会学術集会. 2017.
8. Ogawa A, Ito H, Matsubara H on behalf of the Japanese Circulation Society Joint Working Group for the “Statement for balloon pulmonary angioplasty for chronic thromboembolic pulmonary hypertension (JCS 2014)”. Balloon Pulmonary Angioplasty for Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: A Japanese Multicenter Registry. International CTEPH Conference 2017. 2017.
9. 小川愛子. PVOD/PCH の診断と治療. 第 2 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会. 2017.
10. Ogawa A, Hisanaga N, Tanaka HY, Matsubara H, Kano MR. Novel vascular model for evaluating effects of shear stress in pulmonary hypertension. 2017 Keystone Symposia Conference. Z3: Angiogenesis and Vascular Disease. 2017.
11. 久永なつみ, 小川愛子, 田中啓祥, 狩野光伸, 松原広己. 肺高血圧症症例由来の肺血管細胞を用いた血管モデルの構築. 第 64 回日本心臓血管動物質学会. 2017.
12. 小川愛子, 松原広己. Upfront 治療法 (適応, 施行法, 効果, 問題点) Upfront 療法の実際. 第 1 回日本肺高血圧症・肺循環学会学術集会. 2016.
13. 小川愛子. エポプロステノールの有効な使い方. 第 1 回日本肺高血圧症・肺循環学会学術集会. 2016.
14. Ogawa A. What happens to the vessels when we perform BPA? 2016 CTEPH

- Treatment Advisory Meeting. 2016.
15. 小川愛子. 岡山医療センターにおける肺高血圧症治療の最前線. 第2回 J-ISCP 国際心血管薬物療法学会日本部会学術集会. 2016.

〔図書〕(計1件)

1. 巽浩一郎, 田邊信宏, 石田敬一, 他. 17名省略, 5番目. レタープラス株式会社, 慢性血拴塞栓性肺高血圧症(CTEPH)診療ガイドライン. 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: モデル血管システム, シアストレス負荷用のモデル血管部及び循環器系疾患の治療薬のスクリーニング方法

発明者: 狩野光伸, 松崎愛子, 田中啓祥

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-017692

出願年: 2017年2月2日

国内外の別: 国内