

令和元年6月12日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19444

研究課題名(和文)肺動脈付着細胞を用いた慢性肺血栓症動物モデル確立と肺血管リモデリング機序解明

研究課題名(英文)Animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension by cells proliferating within pulmonary arteries

研究代表者

重城 喬行(Takayuki, Jujo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：90736422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CTEPHの器質化血栓から発生した肉腫様細胞と筋線維芽細胞を肺高血圧症処理を施したラットに投与した。しかし、SDラットでは細胞が生着せず、T細胞免疫を欠いたF344ラットでは長期生存が得られないなどの問題点が発生した。研究期間中に肺動脈に発生する肺動脈内膜肉腫の手術検体より世界で初めて細胞株の樹立に成功した。この細胞をマウスやラットへの投与したが、残念ながら同様の要因によりCTEPHモデル作成には至らなかった。一方、PIS-1と命名されたこの細胞はラットにおける腫瘍形成能など悪性細胞の必要条件を満たし、チロシンキナーゼ受容体が肺動脈内膜肉腫の治療ターゲットになり得ることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈内膜肉腫細胞では血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)や血管内皮細胞増殖因子受容体(VEGFR)などが高発現し、これらを阻害するチロシンキナーゼ受容体阻害薬であるPazopanibがこの細胞の増殖や腫瘍増大を抑制することを発見した。本来の目的を離れた副次的な産物であるが、本研究の成果はこうした肺動脈原発腫瘍の今後の治療進歩に寄与しうるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Establishing an animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) was not successful. We injected intravenously sarcoma-like cells (SCLs cells), myofibroblast cells to SCID mice or F344 rats. However, those cells did not proliferate. We established a cell line of pulmonary intimal sarcoma during the studying period. The cells have the requirement of malignant cells including tumorigenesis in rats. The cells highly expressed tyrosine kinase receptors (TKRs) including platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor receptors (PDGFR and VEGFR). Pazopanib, which is a tyrosine kinase inhibitor (TKIs), could inhibit the proliferation of PIS-1 cells and the growth of subcutaneous tumor in rats. It was suggested that TKRs might be an treatment target for pulmonary intimal sarcoma.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺高血圧症 肺塞栓症 肺動脈内膜肉腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)は、肺動脈内に残存した器質化血栓と続発する肺高血圧症を特徴とする難治性疾患である。CTEPHの病態解明を目指していくつかの視点から

一つはCTEPH器質化血栓からの細胞を分離・培養しその特徴を明らかにすることである。筋線維芽細胞が著しい増殖能と浸潤能を有し悪性細胞に類似した性質を持つ事を明らかにするとともに (Int J Cardiol. 159:119, 2012)、この細胞が内皮細胞の間葉系細胞への転換(内皮間葉転換)を促す細胞間の相互作用に関与していることを明らかにした (Sakao S, et al. Respir Res. 2011;12:109).

もう一つの視点がCTEPHを含めた肺高血圧症の末梢肺血管に認められるリモデリング所見についての解析である。CTEPHは近位部肺動脈に残存している器質化血栓が大きな病理学的な特徴であるが、遠位部の筋性肺動脈リモデリングが、血行動態およびガス交換能に大きな影響を及ぼすことを明らかとした (Jujo T, et al. PLOS ONE. 2015 and 2016)。さらにしかし、CTEPHにおいて肺血管リモデリングをきたす機序そのものは未だ不明であり、CTEPHモデル動物実験での検証が必要と考えられた。さらに肺高血圧モデル動物における肺動脈リモデリングの定量においても同様にリモデリングの強さが収縮期右室圧(RVSP)と有意な正の相関があることを見いだした (Takeuchi T, Jujo T, et al. Histol Histopathol 2016)。しかしながら、CTEPHにおける中枢部血栓の慢性化機序および末梢部分の肺動脈リモデリングが成立する機序に関しては、未だ不明である。



図1. 肺血管に付着し閉塞するSCLs細胞

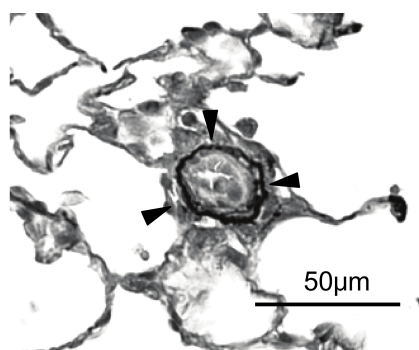


図2. 内膜肥厚により閉塞する末梢肺動脈

2. 研究の目的

CTEPH 実験動物モデルを確立させるとともに、近位部肺動脈閉塞と末梢肺動脈への相互作用の検討を行いリモデリングを誘導・維持する関連因子の探索を行い、CTEPHにおける肺高血圧症の進展・持続機序を解明することが目標である。さらにこの機序解明を通し、リモデリング予防ないしリモデリング解除を誘導する治療薬シーズへの探索を行う事が目的であった (図3)。

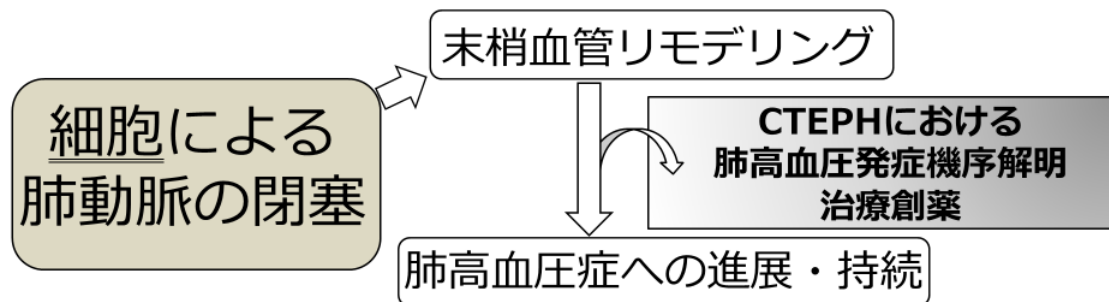


図3. 研究計画概要

3. 研究の方法

SD ラットと T 細胞免疫欠損ラットに対し VEGF 受容体拮抗薬と低酸素曝露を併用した肺高血圧処理 (Su-Hx モデル) を施すとともに、CTEPH 筋線維芽細胞の培養中に得られた肉腫様細胞 (SCLs) (Jujo T, et al. Int J Oncol. 2012) や筋線維芽細胞など CTEPH から得られた培養細胞の静脈内注射を行い、長期に肺高血圧症が持続する CTEPH モデル実験動物確立を目指した。処理を施したラットにおいては肺組織の病理学的検討や右心カテーテル検査での血行動態の検討、フローサイトメトリーなどの肺構成細胞の評価を行い、モデル確立についての検討を行うこととした。

4. 研究成果

実験開始後、計画に沿い SD ラット及び T 細胞免疫欠損ラットに対して VEGF 受容体拮抗薬と低酸素曝露による肺高血圧処理を行うとともに、各種細胞の静脈内投与を行った。CTEPH の器質化血栓から分離培養した筋線維芽細胞は免疫系による排除などによりいずれのラットにも生着を認めなかった。SCLs は T 細胞欠損ラットで生着したが、悪性度が高い故に 1-2 ヶ月ほどで死亡するなど長期生存を得ることができなかった。本研究計画を遂行するため、新たな投与細胞の探索が必要と考えられた。

新たな投与細胞の候補として研究期間内に当院で手術を行った肺動脈血管内膜肉腫の手術検体を用い新たに肉腫細胞の細胞株を樹立した。肺動脈血管内膜肉腫は肺動脈を原発とする極めて稀な腫瘍であり、この細胞株樹立は世界初で我々は PIS-1 (pulmonary intimal sarcoma-1) と命名した。PIS-1 は高い増殖能と浸潤能、遺伝子的不安定性 (genetic instability)、動物での腫瘍形成能を持つなど悪性細胞としての必要条件を満たしていることを確認した。

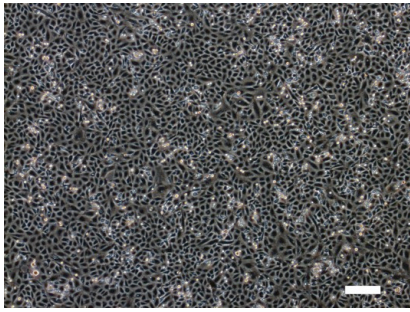


図4. 内膜肉腫培養細胞 (PIS-1)

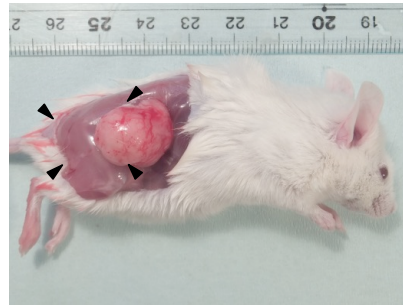


図5. マウスへの皮下投与で形成された腫瘍

さらにこの細胞はチロシンキナーゼ受容体を極めて高発現していることを認め、チロシンキナーゼ受容体阻害薬である Pazopanib で細胞増殖抑制およびラットにおける腫瘍を抑制しうる事を見いだした(図3, 4)。肺動脈内膜肉腫に対し、有効な化学療法レジメンは確立されていないが、Pazopanib は化学療法薬剤の候補となり得る。Pazopanib は本邦でも既に「軟部肉腫」に対する保険適用が承認されており、本研究で得られた成果は今後肺動脈内膜肉腫の治療法確立を目指した Pazopanib を用いた臨床研究へと発展していく可能性があると考えられる。

なお、PIS-1 を肺高血圧症ラットに投与したがやはり長期生存は得られず、CTEPH モデル動物作成には残念ながら至らなかった。しかし、肺動脈内で増殖する細胞株が一つ増えたことにより、肺動脈における細胞増殖機序及び肺動脈リモデリング形成の解明に向けて多角的なアプローチを可能とするツールになると考えている。今後、こうした細胞がアポトーシス抵抗性を示し、長期的に肺動脈リモデリングが維持される機序に分子細胞学的なアプローチを行っていきたいと考えている。

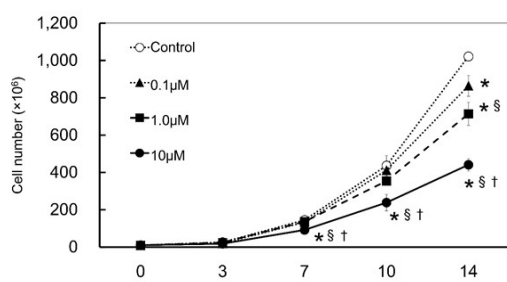


図6. PazopanibによるPIS-1の増殖抑制

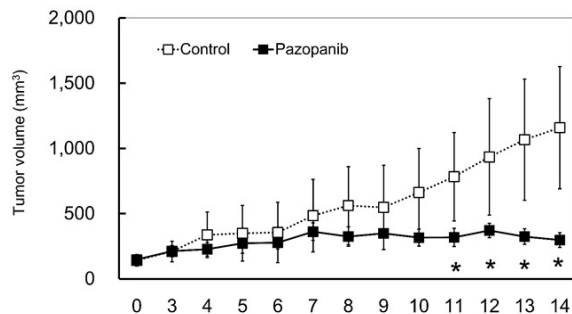


図7. Pazopanibによるラット腫瘍増大抑制

5. 主な発表論文等

本研究で得られた研究成果は第 57 回日本呼吸器学会学術講演会でポスター発表を行い、さらに英文学術雑誌で既に掲載されている。

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. Sanada TJ, Sakao S, Naito A, Ishibashi-Ueda H, Suga M, Shoji H, Miwa H, Suda R, Iwasawa S, Tada Y, Ishida K, Tanabe N, Tatsumi K. Characterization of pulmonary intimal sarcoma cells isolated from a surgical specimen: In vitro and in vivo study. PLoS One 2019;14:e0214654、査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0214654

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 重城喬行、坂尾誠一郎、植田初江、内藤亮、菅正樹、三輪秀樹、松村茜弥、須田理香、加藤史照、西村倫太郎、石田敬一、増田政久、田邊信宏、巽浩一郎. 肺動脈内膜肉腫 (pulmonary artery intimal sarcoma)の細胞株樹立. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。