

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09597

研究課題名(和文) 気管支上皮細胞のTrkBによる炎症性シグナルを介した肺高血圧症の病態機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis of pulmonary hypertension through inflammatory signaling by TrkB in bronchial epithelial cells

研究代表者

岡澤 慎 (Makoto, Okazawa)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40414130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症に対するTrkBシグナルの役割を検討した。肺の器官培養、細気管支上皮の3D培養で、BDNF-TrkBシグナル依存性に炎症応答が惹起した。タモキシフェン誘導型TrkBノックアウトマウスに対し、低酸素誘発性肺高血圧症モデルを作製した結果、右室/左室重量比の上昇や右室線維化の進行やRVEFの低下がみられた。即ち、低酸素誘発性肺高血圧症モデルで生じる右心室負荷に対し、BDNF-TrkBシグナルが保護的な作用を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAH病態が進行すると、右心室に負荷がかかることで心臓の働きが悪くなり、右心不全を引き起こす。右心不全は、PAHの重要な予後規定因子であり、慢性右心不全に対しては、血液循環の悪化による水分貯留に対する利尿薬による対症療法がなされる。本研究で得られた、BDNF-TrkBシグナルが低酸素誘発性肺高血圧症モデルマウスにおける右心室負荷に対する保護作用を有するとの結果は、PAHにおける右心不全に対する新規治療ターゲットとなる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by elevated pulmonary arterial pressure, leading to right ventricular overload, hypertrophy, and dilatation. Neurotrophic tyrosine receptor kinase type 2 (TrkB) regulates various physiological and pathological processes. However, the role of TrkB signaling in the pathological processes of PAH is not well understood. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-TrkB signaling activated inflammatory signals in lung organ culture and air-liquid interface culture of bronchial epithelial cells. Conditional TrkB knockout mice showed increased Fulton's index, increased RV fibrosis, and reduced RVEF after 4-week hypoxia exposure. BDNF-TrkB signaling might have a protective role in right ventricular remodeling in PAH.

研究分野：分子生物学、血管生物学、神経生物学

キーワード：肺高血圧症 TrkB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension: PAH) は原因不明の機序により肺動脈に狭窄や閉塞が生じて肺動脈圧が異常に上昇する疾患で、適切な治療がなされないと右心不全から死に至る可能性のある厚生労働省指定の難病である。PAH の治療には、プロスタグランジン I₂、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬、可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激剤などの肺動脈平滑筋細胞の収縮・弛緩の不均衡を標的とした薬剤が使用可能となり、近年、予後は改善しつつある。しかしながら、進行した PAH の予後は未だ不良で、PAH に対して保険適応のある上記の治療薬は何れも平滑筋の収縮・弛緩制御を標的とする同一作用点の薬剤ばかりであるため、これらと異なる分子機序の治療薬の開発が喫緊の課題となっている。また、PAH 病態への炎症性サイトカインの関与も示され、血管周囲に集簇する細胞の役割が明らかになりつつあるが、発症機序にはいまだ不明な点が多く、新規治療法の確立には至っていない。

2. 研究の目的

ニューロトロフィン受容体 TrkB は神経系だけでなく、様々な臓器で生理的役割を担っている。研究代表者らは *in silico* で、PAH の病態形成時に発現変化する分子として、PAH モデル(低酸素暴露性肺高血圧症モデル[Hypoxia-induced PH: HPH]と Sugen[VEGFR2 阻害剤]低酸素モデル[Sugen/Hypoxia: Su/Hx])で発現が変化するが、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞では発現が変化しない遺伝子として、ニューロトロフィン受容体の一つ TrkB 受容体を同定した。PAH モデルにおいて TrkB は肺では、気管支上皮細胞で発現上昇し、免疫応答の惹起を示唆する結果を得た。これまでの報告で、血管平滑筋の TrkB の PAH への関与は示唆されていたが、血管平滑筋以外での TrkB の役割は不明であった。本研究では、PAH 病態における BDNF-TrkB シグナルの役割を明らかにし、新規診断法、予防法、治療法の提案を行う。

3. 研究の方法

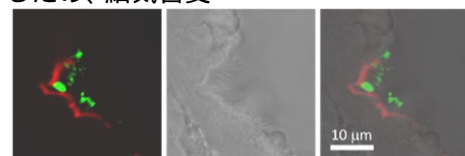
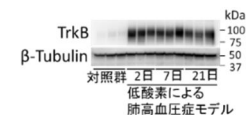
肺のスライス器官培養系と気管支上皮の気相液相界面培養 (3D 再構築培養) を用いて、低酸素、BDNF、anti-BDNF 等による TrkB の発現への影響、TrkB シグナルによるサイトカイン産生に対する影響を qRT-PCR や、免疫組織化学的解析により検討した。

TrkB の全身性ノックアウト (TrkB flox; RosaCreERT2, TrkB flox; UBCCreERT2) および気管支上皮特異的ノックアウト (TrkB flox; Foxj1CreERT2) 血管内皮細胞特異的ノックアウト (TrkB flox; VECadherinCreERT2)、血管平滑筋特異的ノックアウト (TrkB flox; SmmhcCreERT2) および TrkB のリガンドである BDNF の全身性ノックアウト (BDNF flox; RosaCreERT2) マウスを作成し、tamoxifen 誘導性に各細胞で TrkB あるいは BDNF を欠損させた。低酸素負荷により PAH モデルを作製し、肺動脈圧への影響を右心カテーテルにより RVSP (右室収縮気圧) を測定して、生理学的に検討した。また、右室/左室重量比、肺小動脈の中膜肥厚を検討した。心臓への影響は、MRI による volumetry 解析、qRT-PCR により検討した。

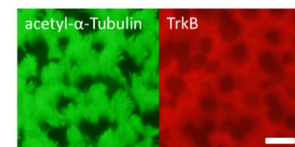
4. 研究成果

(1) HPH マウスおよび Su/Hx ラットモデルにおいて、肺で TrkB が発現上昇した。特に気管支上皮繊毛細胞に TrkB が発現上昇した。肺器官培養では IL-25, IL-13 等の炎症性サイトカインの発現亢進がみられた。繊毛上皮細胞での BDNF-TrkB 依存性シグナルの影響を検討するため、細気管支上皮の気相液相界面培養 (3D 培養) を行った。1%低酸素で培養すると TrkB の発現が亢進し、*in vivo* での TrkB 発現誘導が再現された。BDNF の添加は IL-25 等のサイトカインの発現を亢進し、抗 BDNF 抗体で発現は抑制された。その際、Notch1 の発現が BDNF 依存的に抑制された。以上の結果から、HPH マウス肺における BDNF-TrkB シグナル依存的な炎症シグナルの活性化が示唆された。

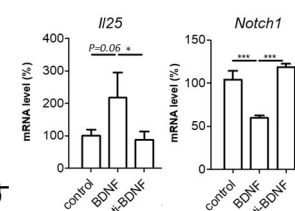
(2) TrkB flox マウスあるいは BDNF flox マウスと ROSA26CreERT2 マウスを交配し、TrkB flox/flox; ROSA26CreERT2 マウスと BDNF flox/flox; ROSA26CreERT2 マウスを得た。これらのマウスにタモキシフェンを投与し全身性に TrkB (あるいは BDNF) を欠損した ROSA-TrkB cKO マウス (あるいは ROSA-BDNF cKO マウス) を用いて低酸素暴露性肺高血圧症モデル [Hypoxia-induced PH: HPH] を検討した。肺動脈圧への影響を右心カテーテルにより検討した結果、ROSA-TrkB cKO マウスでは右室収縮気圧 (RVSP) への影響は小さかったものの、右室/左室重量比は上昇し、右室の繊維化が進行した。他方、ROSA-BDNF cKO の HPH モデルでも、ROSA-TrkB cKO マウス同様右室/左室重量比が上昇する傾向がみられた。すなわち、マウス HPH モデルにおいて、BDNF-TrkB シグナルは心保護作用を有することが示唆された。



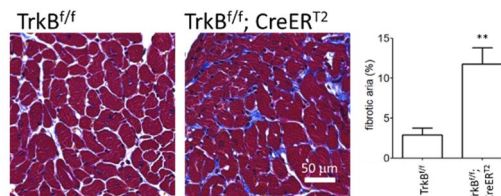
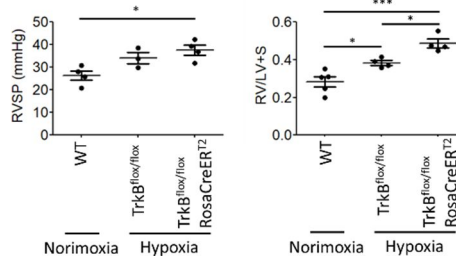
red: TrkB, green: acetyl- α -Tubulin



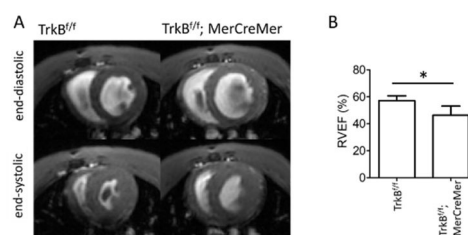
気管支3D培養でTrkB発現が再現



(3) TrkB あるいは BDNF を全身でノックアウトした際の表現型が、どの肺のどの細胞の TrkB シグナルを介したものであるかを検討するために、各種組織特異的 Cre マウス (絨毛上皮細胞特異的: Foxj1CreERT2, 血管内皮特異的: VEcadherinCreERT2, 血管平滑筋特異的: SmmhcCreERT2) と交配し、タモキシフェン投与し、組織特異的に TrkB を欠損させ、HPH モデルを検討した。肺動脈圧への影響を右心カテーテルにより検討した結果、いずれの TrkB cKO マウスでもコントロールに比べ右室収縮気圧 (RVSP) および、右室/左室重量比に大きな変化はなかった。即ち、HPH モデルに対する心保護作用に絨毛上皮細胞、血管内皮、血管平滑筋の TrkB シグナルの関与は小さいか、複数のシグナルにより相殺されていると考えられた。



(4) タモキシフェン投与した心筋特異的 TrkB cKO マウス (TrkB flox; MHCmerCreMer) で HPH モデルを作製し、心保護作用に対する影響を右心カテーテルによる血行動態測定や MRI による心機能評価を行った。その結果、右室収縮期圧の顕著な変化は見られなかったが、MRI による volumetry 解析で、Cre (-) のコントロールマウスに比べ心筋特異的 TrkB cKO マウスは右室駆出率が有意に低下した。即ち、右心不全の傾向がみられた。さらに、心臓の遺伝子発現解析の結果、心不全マーカーの上昇が見られたことから心不全が発症したことが示唆された。即ち、心筋の TrkB シグナルが低酸素による心機能低下に対して保護的に作用していると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mori Hiroyoshi, Ishibashi Tomohiko, Inagaki Tadakatsu, Okazawa Makoto, Masaki Takeshi, Asano Ryotaro, Manabe Yusuke, Ohta-Ogo Keiko, Narazaki Masashi, Ishibashi-Ueda Hatsue, Kumanogoh Atsushi, Nakaoka Yoshikazu	4. 巻 84
2. 論文標題 Pristane/Hypoxia (PriHx) Mouse as a Novel Model of Pulmonary Hypertension Reflecting Inflammation and Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1163-1172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-1102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Makoto Okazawa, Tadakatsu Inagaki, Tomohiko Ishibashi, Takeshi Masaki, Hiroyoshi Mori, Ryotaro Asano, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 TrkB might have a role for right ventricular homeostasis under chronic hypoxia-induced PH
3. 学会等名 The 2nd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Okazawa, Tadakatsu Inagaki, Tomohiko Ishibashi, Takeshi Masaki, Hiroyoshi Mori, Ryotaro Asano, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 TrkB might have a role for right ventricular homeostasis under chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 第26回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishibashi T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Okazawa M, Nakaoka Y.
2. 発表標題 Cre recombination in hematopoietic cells of smooth muscle cell-targeted Cre recombination mice.
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting (IVBM) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森啓悦、稲垣薫克、石橋知彦、岡澤慎、正木豪、熊ノ郷淳、中岡良和
2. 発表標題 プリスタンを用いた新しい膠原病性肺高血圧症モデル作製の試み
3. 学会等名 第三回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishibashi T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y
2. 発表標題 Cre-mediated recombination in hematopoietic lineage cells of smooth muscle cell-specific targeted Cre mice.
3. 学会等名 The16 Korea - Japan Joint Symposium onVasucular Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori H, Inagaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Masaki T, Asano R, Nakaoka Y.
2. 発表標題 A novel mouse model of PAH reflecting inflammation and fibrosis.
3. 学会等名 The16 Korea - Japan Joint Symposium onVasucular Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiko T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y,
2. 発表標題 Cre expression in hematopoietic cells of smooth muscle cell-targeted Cre recombination mice
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori H, Inagaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Masaki T, Asano R, Nakaoka Y,
2. 発表標題 Pristane might be useful for creating a novel model of CTD-PAH in mice
3. 学会等名 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム,
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 啓悦, 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 岡澤 慎, 正木 豪, 浅野 遼太郎, 熊ノ郷 淳, 中岡 良和
2. 発表標題 A novel mouse model of PAH reflecting inflammation and fibrosis.
3. 学会等名 第23回日本血管病理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori H, Inagaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Masaki T, Asano R, Kumanogo A, Nakaoka Y,
2. 発表標題 A novel mouse model of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension accompanied by infiltration of inflammatory cells
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石橋知彦、稲垣薫克、森啓悦、正木豪、浅野遼太郎、岡澤慎、中岡良和
2. 発表標題 平滑筋細胞特異的Creマウスの血球細胞におけるCre発現の解析
3. 学会等名 第26回日本血管生物医学会学術集会、
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石橋知彦, 正木豪, 稲垣薫克, 森啓悦, 浅野遼太郎, 岡澤慎, 中岡良和
2. 発表標題 CD4陽性細胞のIL-6シグナルは肺高血圧症の病態形成に重要である
3. 学会等名 第4回 日本肺高血圧・肺循環学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okazawa M, Inagaki T, Ishibashi T, Masaki T, Mori H, Asano R, Takei K, Nakaoka Y,
2. 発表標題 TrkB has a protective role for right ventricular dysfunction under chronic hypoxia-induced PH
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inagaki T, Mitsui M, Asano R, Ogo T, Aoki K, Masaki T, Tomohiko T, Okazawa M, Nakaoka Y,
2. 発表標題 Critical Roles of Interleukin-21 Signaling in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko T, Masaki T, Inagaki T, Mori H, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y,
2. 発表標題 gp130-mediated signaling in CD4-positive cells is important for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko I, Masaki T, Inagaki T, Okazawa M, Nakaoka Y
2. 発表標題 gp130-mediated signaling in CD4-positive cells has a critical role for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第3回 Asia Australia Vascular Biology Meeting (AAVBM) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣薫克、浅野遼太郎、三井麻利江、青木一晃、石橋知彦、岡澤慎、大郷剛、中岡良和
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症の重症化における interleukin-21の役割
3. 学会等名 第27回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋知彦、正木豪、稲垣薫克、森啓悦、浅野遼太郎、岡澤慎、中岡良和
2. 発表標題 CD4陽性細胞におけるgp130シグナルの肺高血圧症病態形成における役割
3. 学会等名 第27回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中岡 良和	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 *
3. 書名 新しい臨床を開拓するための分子循環器病学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中岡 良和 (Nakaoka Yoshikazu) (90393214)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	
研究 協力者	大郷 剛 (Ogo Takeshi) (80617077)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・特任部長 (84404)	