

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10153

研究課題名(和文) 肺血管発生と肺高血圧症におけるTbx4の役割

研究課題名(英文) Roles of Tbx4 for Pulmonary Vascular Development and Pulmonary Hypertension

研究代表者

内田 敬子(Uchida, Keiko)

慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・准教授

研究者番号：50286522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺血管発生の詳細は不明な点が多い。肺血管を構成する内皮細胞や平滑筋細胞の起源の候補と考えられている肺間葉系細胞には転写因子Tbx4が比較的高く発現しているが、肺血管発生におけるTbx4の役割は不明である。また、近年小児期発症の肺動脈性肺高血圧症でTBX4遺伝子変異が検出されたが、その発症機序は不明である。

本研究ではTbx4に着目し、胎生期の肺間葉系細胞でTbx4の発現を低下させたところ内皮様の管腔形成能が促進され、肺器官培養でTbx4の発現を低下させたところ肺発生が抑制された。肺間葉系細胞のTbx4は肺の発生や肺動脈性肺高血圧症の病態に關与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺血管は体血管とは異なる性質を持ち、生命に必須であるガス交換に重要な役割を担う。また、肺動脈性肺高血圧症は近年治療薬が複数開発されたが未だに肺移植を要する難治性の疾患である。本研究では、Tbx4という胎生期の肺血管前駆細胞を含むと考えられている肺間葉系細胞に発現する転写因子に着目し、肺血管発生ならびに肺動脈性肺高血圧症発症の分子機構の一端となる知見を得た。本研究の成果は肺血管再生医療や肺動脈性肺高血圧症の新規治療標的の開発に貢献しうる。

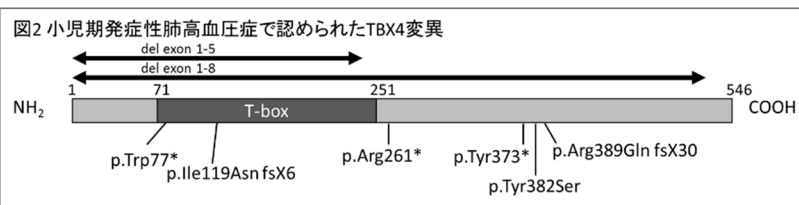
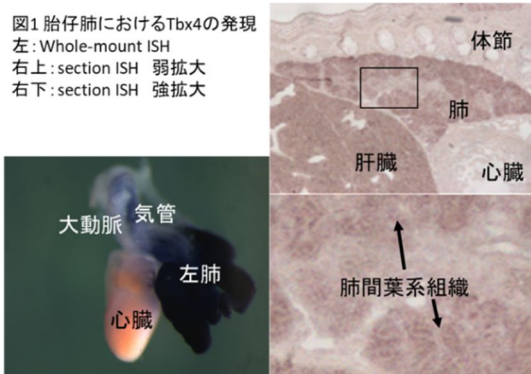
研究成果の概要(英文)：One of the transcription factors which are crucial for organogenesis, Tbx4, is highly expressed in the lung mesenchyme. Lung mesenchyme consists of undifferentiated progenitor cells, which give rise to various cell types, possibly including pulmonary vascular cells. Recently TBX4 mutations have reported in patients with PAH. However, the mechanisms of pulmonary vascular development and pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH) remain unclear. We found that Tbx4 knockdown in lung mesenchymal cells facilitated tube formation activity, which is characteristic of endothelial cells, and that Tbx4 knockdown in lung organ culture inhibited lung development. Our results suggest that Tbx4 in undifferentiated mesenchymal progenitor cells may be involved in the formation of both airways and vessels in the lungs. The roles of Tbx4 in the lung mesenchyme may pave the way for novel mechanisms underlying pulmonary vascular development and pathogenesis of PAH.

研究分野：心血管発生

キーワード：肺動脈 転写因子 平滑筋 肺動脈性肺高血圧症

1. 研究開始当初の背景

近年、血管発生の細胞・分子機序の研究は進んでいるが、肺血管の発生については未だ不明な点が多い。肺血管内皮細胞の一部や肺動脈平滑筋細胞は肺上皮細胞を取り囲む肺間葉系細胞から分化形成されると考えられているが、その詳細は不明である。肺血管細胞への分化過程を標識する分子マーカーもなく、分化機構を観察する実験系も未確立であることも一因である。Tbx4 は胎生期の肺に発現する T-box 型転写因子の一つであり、肺内では肺間葉系組織に発現が高い(図 1)。マウス Tbx4 遺伝子座に同定された Tbx4 の肺間葉系特異的エンハンサー(Tbx4-LME)領域は、肺を持つ動物種や肺の相同器官である浮き袋(鰓)を持つポリプテルスまで認められており、進化的に保存された領域によって発現が制御されている。しかし、Tbx4 ノックアウトマウスは肺発生の時期より以前に胎生致死となるために Tbx4 の肺における機能は不明である。また、最近、肺動脈性肺高血圧症の患者において TBX4 遺伝子変異が複数報告された((Kerstjens-Frederikse et al. J Med Genet, 2013, Levy et al. Eur Respir J, 2016、図 2)。しかし TBX4 変異が肺動脈性肺高血圧症を発症する分子機序は全く不明である。



2. 研究の目的

本研究の目的は肺血管発生および肺高血圧症発症における Tbx4 の役割を解明することである。さらに、本研究の目的を達成するために、肺動脈特異的分子マーカーの探索と肺血管発生を解析する実験系の確立を目指す。

3. 研究の方法

- 1) 肺動脈平滑筋特異的分子マーカーの探索と肺動脈発生の解析系の確立
- 2) RNA 干渉により Tbx4 の発現を低下させた肺間葉系細胞および肺動脈平滑筋細胞の機能解析
- 3) アンチセンスオリゴヌクレオチドにより Tbx4 の発現を低下させた肺器官培養を用いた肺気道ならびに肺血管の発生過程の観察

4. 研究成果

1) 肺動脈特異的マーカーの探索
Tbx4-LME 領域に reporter である LacZ 遺伝子を連結させたトランスジェニックマウスを作製したところ LacZ の発現は肺動脈には認められなかった。そこで、独自に肺動脈平滑筋に特異的に発現する分子 2 型イノシトール三リン酸受容体の翻訳開始領域に LacZ 遺伝子を挿入したマウス (IP3R2-LacZ マウス, Ishizaki-Asami et al. Dev Biol, 2020) を用いて肺動脈発生を解析する実験系を確立した(図 3)。本実験系では、胎生 11 日から 13 日の IP3R2-LacZ マウスから肺を取り出し 2 日間の肺器官培養を行い、肺動脈を観察することが可能であった(図 4)。

2) Tbx4 発現低下肺間葉系細胞と Tbx4 発現低下肺動脈平滑筋細胞の機能解析
胎仔マウスから摘出した肺から採取した肺間葉系細胞初代培養において、RNA 干渉を用いて Tbx4 の発現を低下させたのちにマトリゲル上に播種したところ、血管内皮細胞様の管腔形成能が促進された(図 5)。

3) Tbx4 発現低下肺器官培養における肺発生の観察

胎生 11 日から 13 日に肺を取り出し、Tbx4 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド存在下で 2 日間肺器官培養を行ったところ、Tbx4 の発現量の低下に伴い、肺発生在障害された。

本研究により、肺動脈平滑筋特異的分子マーカー標識マウスを用いた肺動脈発生の実験系が確立し、さらに *in vitro* で特定の遺伝子発現を抑制することにより、気道ならびに肺動脈発生への影響を解析することが可能となった。現在は Tbx4 の発現を低下させた肺間葉系細胞や肺動脈平滑筋細胞、ならびに肺器官培養における肺血管関連遺伝子発現を解析している。本研究で確立した肺血管発生の解析系を利用し、今後さらに肺血管発生異常や肺動脈性肺高血圧症の病態解明が進むことが期待される。

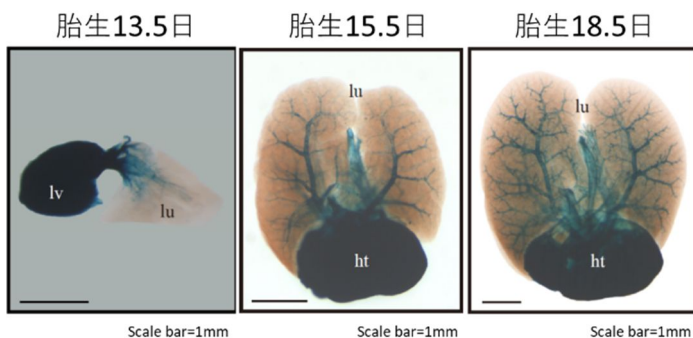


図3. IP3R2-LacZのシグナルは肺動脈の発生を可視化する。a, 気管支; da, 動脈管; h, 頭; ht, 心臓; lu, 肺; lv, 左室; pa, 肺動脈

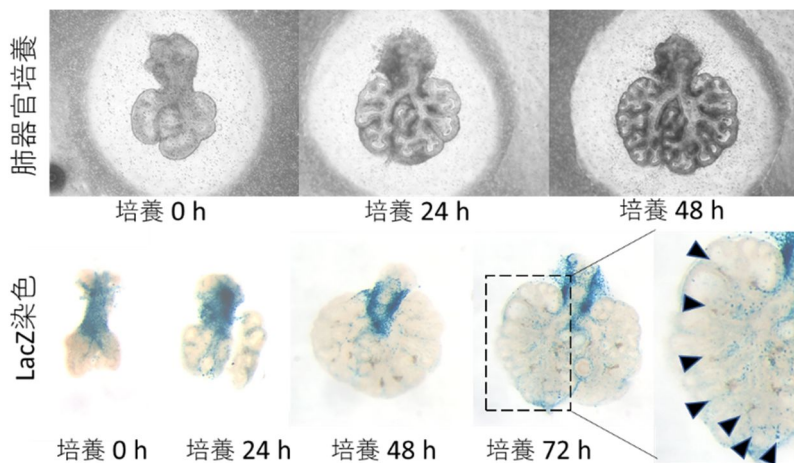


図4. 上段, 胎生11日マウス肺器官培養の経時的変化。下段, 肺器官培養後のwhole-mount LacZ stain。右端は点線部位の拡大図。矢頭で示す領域までLacZ陽性細胞が広がっている。

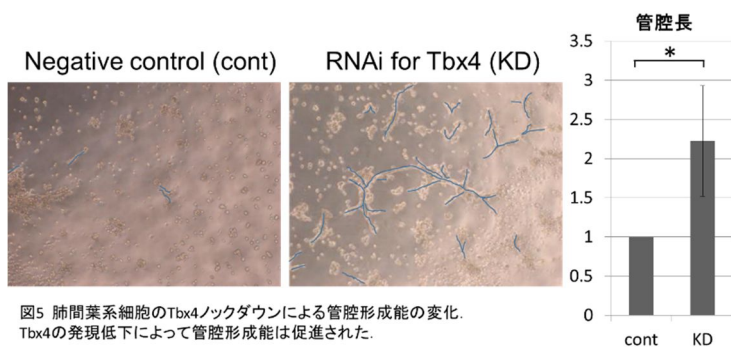


図5 肺間葉系細胞のTbx4ノックダウンによる管腔形成能の変化。Tbx4の発現低下によって管腔形成能は促進された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shibata A, Uchida K, Kodo K, Miyauchi T, Mikoshiba K, Takahashi T, Yamagishi H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits the progression of pulmonary arterial hypertension via calcium signaling and apoptosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 724-734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-018-1304-4.	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Reina Ishizaki, Keiko Uchida, Akimichi Shibata, Kazuki Kodo, Takatoshi Tsuchihashi, Katsuhiko Mikoshiba, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 The 1,4,5-Trisphosphate Receptor 2 as a Novel Marker of Vasculature for Delineating the Cardiopulmonary Development
3. 学会等名 26th Weinstein Cardiovascular Development Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田祐、内田敬子、古道一樹、古谷喜幸、中西敏雄、山岸敬幸
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症を来たすTBX4遺伝子の変異機能解析
3. 学会等名 第3回日本肺高血圧・肺循環学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田敬子、山岸敬幸
2. 発表標題 肺血管発生と肺高血圧症におけるTbx4の役割
3. 学会等名 第120回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 Roles of Tbx4 in the Lung Mesenchymal Cells for Pulmonary Vascular Development
3. 学会等名 The 24th Weinstein Cardiovascular Development Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 Roles of Tbx4 for Pulmonary Vascular Development
3. 学会等名 第53回日本小児循環器学会学術集会・The 13th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum with Asian Pacific Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 Tbx4 in the development of pulmonary vessels
3. 学会等名 The 8th TAKAO International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Reina Ishizaki, Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 as a marker for visualization of pulmonary artery development
3. 学会等名 The 8th TAKAO International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akimichi Shibata, Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) signaling in Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 The 8th TAKAO International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yu Yoshida, Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi
2. 発表標題 TBX4 mutations associated with pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 The 8th TAKAO International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Keiko Uchida, Yu Yoshida, Reina Ishizaki, Akimichi Shibata, Kazuki Kodo, Takatoshi Tsuchihashi, Jun Maeda, Katsuhiko Mikoshiba, Toshio Nakanishi, Hiroyuki Yamagishi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 405
3. 書名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	

〔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
研究協力者	山岸 敬幸 (Yamagishi Hiroyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------