

令和元年6月18日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15739

研究課題名(和文)肺動脈性肺高血圧症の病態形成メカニズムの解明と新規治療法開発の基盤構築

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension and an approach to develop a new therapy

研究代表者

生谷 尚士(Ikutani, Masashi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：40513718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：難病に指定されている疾患の一つである肺動脈性肺高血圧症(指定難病86)は、肺動脈肥厚を起因とした肺動脈圧の著しい上昇により、右心不全を引き起こす疾患である。その病態形成過程は依然不明である。本研究では肺動脈肥厚の新規動物モデルを確立し、白血球の一種である2型自然リンパ球が血管肥厚を誘導するという現象を見出し報告した。血管肥厚を引き起こす細胞集積の機序の一端の解明にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後到来する超高齢化社会において膠原病などの慢性炎症疾患は増加の一途を辿ることが確実視されている。肺動脈性肺高血圧症の発症機序は不明であるが、膠原病などの他の疾患に合併する 경우가非常に多い。そのために肺動脈性肺高血圧症の増加も予想されている。本研究は新たな視点から疾患発症の機序の解明を試みたものである。これまでに想定されていなかった細胞の関与も証明しており、新規治療法開発の基盤の構築に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：One of intractable diseases, pulmonary arterial hypertension, is characterized by severe obstruction of small pulmonary arteries and concomitant high pulmonary artery pressure, leading to progressive right ventricular failure. The mechanism of pathogenesis of this disease is largely unknown. In this project, we developed an animal model to study the early phase of development of arterial hypertrophy. We reported that type 2 innate lymphoid cells were involved in the process.

研究分野：免疫学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 インターロイキン(IL)-33 IL-5 ILC2 好酸球

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension : PAH) は、肺動脈肥厚を起因とした肺動脈圧の著しい上昇により、右心不全を引き起こす難治性疾患である。PAH の発症には遺伝的背景や物理的閉塞など様々な要因が指摘されているが、病因の特定には至らず、その病態形成過程は不明である。PAH は自覚症状がないまま長い期間を経て発症し、診断時には末期の状態である場合がほとんどである。そのために経過的な観察などの手段が絶たれ、原因解明は困難を極める。PAH の発症には膠原病などの慢性的な炎症反応が関与するとの指摘がなされており、我が国でも膠原病に伴うPAH が半数以上に上る。このような難病の発症メカニズムの解明には動物モデルが必須である。PAH の研究にも、これまでに複数のモデルが確立され貴重な知見が得られている。しかしながら、ヒトの病態を忠実に再現しているものは少ないとされており、病因解明へと導く動物モデルの確立が切望されている。

Interleukin (IL) -5 はIL-4 やIL-13 とともにT helper type 2 (Th2) サイトカインと総称される。IL-5 は好酸球を制御する中心的な因子であり、気管支喘息などのアレルギー疾患、寄生虫やウィルス感染防御に深く関与する。長らく主なIL-5 産生細胞はTh2 細胞だと理解されてきたが、数年前、新規に同定されたGroup 2 Innate Lymphoid Cell (ILC2) が多量のIL-5 を産生する細胞として一躍脚光を浴びた。肺のIL-5 産生ILC2 はIL-33 に応答し即時に多量のIL-5 を産生し、好酸球増多を誘導する。IL-33 は経気道的な異物の侵入による組織傷害によって分泌され、アレルギーを惹起するサイトカインとして知られる。またIL-33 はアラミンの1つであり、近年自己免疫疾患を含む膠原病などにおいて末梢血中での上昇が報告されており、その関与が再び注目されている。

研究代表者はIL-33 を比較的長期間動物に投与することで、ヒトPAH の血管病態に酷似する血管肥厚を誘導することに成功した。この血管肥厚にはILC2 と好酸球が必須の役割を担う。ヒトのPAH 患者検体の血管周囲に好酸球が存在するなどの報告はなされていないが、ヒト検体を用いた我々の検討では肥厚の初期段階の血管周囲において好酸球の存在を確認している。これは好酸球が比較的早期に作用し、時間が経過するとともに血管肥厚が重症化し、役割を終えた好酸球が離脱するものと推測される。そのため入手可能な組織検体が末期の状態であるヒトでは、好酸球がすでに離脱している可能性がある。さらにPAH 患者の末梢血の解析からはIL-33 シグナルの関与が報告されている。代表者は膠原病などの患者末梢血で顕著に上昇するIL-33 が、長い年月をかけて肺組織に作用し続け、ILC2 と好酸球を介した重度の血管肥厚を誘導すると考えている。本研究は新たな視点でPAH の原因である肺動脈肥厚の発症メカニズムの解明にアプローチし、新規の治療標的の同定や有効な予防法の開発に貢献するものである。

2. 研究の目的

特定疾患に指定されるPAHは、本態性や薬剤性を含めその病態形成過程は依然不明である。代表者はこれまでに肺動脈肥厚の動物モデルを確立し、ILC2 と好酸球が肺動脈肥厚を誘導するこれまでにない新たな発症メカニズムを突き止めた。この血管肥厚はILC2 の肺動脈周囲への移行を起点とし、引き続く好酸球集積により引き起こされる。しかしながら、ILC2 の移行メカニズムは依然不明である。本研究では、ILC2 と好酸球の詳細な動態解析を糸口に肺動脈肥厚の病態形成メカニズムを明らかにすることを研究目的とし、新規治療法開発の基盤を構築する。

3. 研究の方法

本研究では研究目的を達成するために、ILC2 の動態解析を中心とした研究を行った。肺動脈肥厚はリコンビナントIL-33を1週間に1度、計3回投与することで誘導される。この投与による細胞表面分子の発現状況の変化をフローサイトメトリー法を用いて解析した。ここでは特に免疫細胞の局在や遊走に深く係わるインテグリン分子の変化に焦点を当てた。IL-33の投与により変化が生じたインテグリン分子の阻害剤を利用し、肺動脈肥厚に及ぼす影響を観察した。肥厚血管の頻度や状態をEVG染色法で評価し、ILC2や好酸球の集積の程度を蛍光免疫染色法で検討した。

4. 研究成果

本研究期間の初期に当初までの研究成果である、IL-33 長期投与による肺動脈肥厚の形成とその過程における ILC2 の役割に係わる研究、を欧米学術誌（5、主な発表論文等 雑誌論文）において報告した。この報告の中で、ILC2 が肺動脈の周囲に集積し、好酸球を呼び集め、重度の肥厚を引き起こすことを明らかにした（図 1）。さらに実際に PAH 疾患の治療薬として使用されている薬剤が IL-33 による肺動脈肥厚を抑制することも見出した。これらの成果から本動物モデルは PAH に至る肺動脈肥厚の特に初期の段階を研究する上で有用なモデルであると考えられる。その後研究を進展させ、IL-5 レセプターに結合する抗体が効率的に肺動脈肥厚を抑制することも明らかにし報告した（雑誌論文）。これは将来的に IL-5 シグナルを標的とした治療薬の開発に向けた基礎的な研究である。

上述のように本研究では ILC2 の血管周囲への移行メカニズムに焦点を当てた。特にインテグリンに着目した。インテグリン分子は α 鎖と β 鎖から成り、それぞれが複数知られている。様々な組み合わせが可能であり、その組み合わせによって結合するリガンドや機能が異なる。リガンドは細胞外マトリックスや接着分子である。IL-33 を一週間に一度合計 3 回投与したマウスの肺 ILC2 上のインテグリン分子をフローサイトメトリ法で解析した。その結果、 $\beta 1$ 鎖が顕著に上昇することが判明した（図 2）。そこで $\beta 1$ 鎖の機能を阻害する中和抗体を入手し、IL-33 と同時に中和抗体を投与した。すると IL-33 による肺動脈肥厚が低減し、また肺 ILC2 が有意に減少しており、それに伴う好酸球の浸潤も阻害されていた。蛍光免疫組織化学染色法で肥厚している肺動脈を観察した結果、肥厚血管周囲の ILC2 と好酸球の集積は顕著に抑制されていた（図 3）。これらは当該インテグリン分子が ILC2 の動態に係わっていることを証明するものである。

今後の検討課題であるが、 $\beta 1$ 鎖のパートナー分子の同定をまず行いたい。 $\beta 1$ 鎖と結合する α 鎖は複数知られているが、ILC2 が肺動脈の周囲に集積する過程で役割を担う α 鎖を明らかにしていく必要がある。パートナー分子の同定により、リガンドが明らかになることも期待される。ILC2 による肺動脈肥厚の詳細なメカニズムの解明を発端とし、PAH 疾患の治療法開発の基盤を構築していきたい。

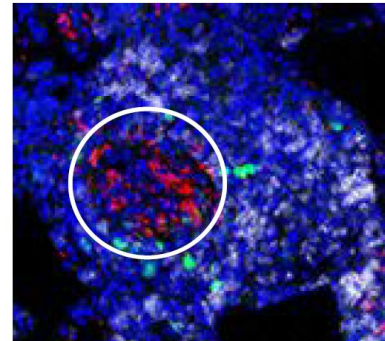


図 1、IL-33 長期投与による肺動脈肥厚の組織像

白円は肥厚している肺動脈を示す。細胞核（青）、平滑筋細胞（赤）、ILC2（緑）、好酸球（白）を示す。

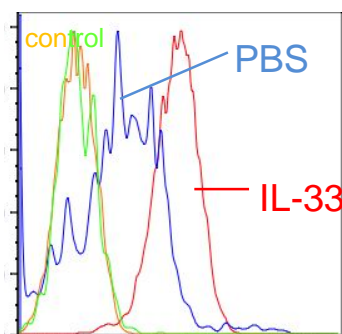


図 2、IL-33 長期投与による肺 ILC2 の $\beta 1$ 鎖の発現上昇

IL-33 投与時（赤）と溶媒対象投与時（青）の ILC2 上の $\beta 1$ 分子の発現状況を示す。黄と緑の実線はそれぞれの染色抗体の陰性コントロール群である。

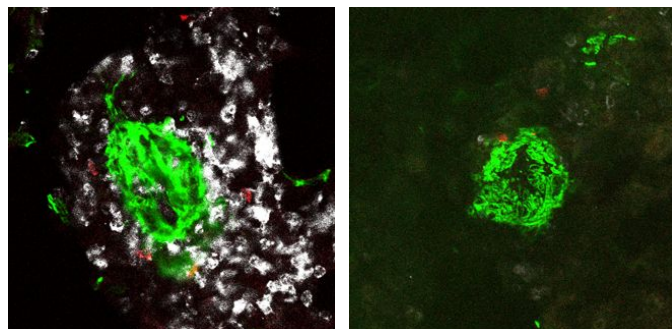


図 3、抗 $\beta 1$ 機能阻害抗体による肺動脈肥厚の抑制と血管周囲の ILC2・好酸球の減少

平滑筋細胞（緑）、ILC2（赤）、好酸球（白）を示す。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Ikutani Masashi, Ogawa Shinya, Yanagibashi Tsutomu, Nagai Terumi, Okada Kazuki, Furuichi Yoko, Takatsu Kiyoshi, Elimination of eosinophils using anti-IL-5 receptor alpha antibodies effectively suppresses IL-33-mediated pulmonary arterial hypertrophy, Immunobiology, 査読有、223巻、2018、pp.486-492
doi: 10.1016/j.imbio.2017.12.002

Ikutani Masashi, Tsuneyama Koichi, Kawaguchi Makoto, Fukuoka Junya, Kudo Fujimi, Nakae Susumu, Arita Makoto, Nagai Yoshinori, Takaki Satoshi, Takatsu Kiyoshi, Prolonged activation of IL-5-producing ILC2 causes pulmonary arterial hypertrophy, JCI Insight, 査読有、2巻、2017、e90721
doi: 10.1172/jci.insight.90721

〔学会発表〕(計3件)

Ikutani Masashi, Tsuneyama Koichi, Nakae Susumu, Takatsu Kiyoshi, Takaki Satoshi, Characterization of ILC2 in IL-33-induced chronic inflammation, 第47回日本免疫学会学実集会、2018

Ikutani Masashi, Tsuneyama Koichi, Nakae Susumu, Takatsu Kiyoshi, Takaki Satoshi, Chronic IL-33-induced inflammation results in pulmonary arterial hypertrophy, 第46回日本免疫学会学実集会、2017

生谷 尚士、常山 幸一、高津 聖志、高木 智、IL-33誘発性肺動脈肥厚におけるILC2の機能解析、第38回日本炎症・再生医学会、2017

〔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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高津 聖志

ローマ字氏名：Takatsu Kiyoshi

研究協力者氏名：中江 進

ローマ字氏名：Nakae Susumu

研究協力者氏名：常山 幸一

ローマ字氏名：Tsuneyama Koichi

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。