

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07841

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧の血管病変形成への血管平滑筋と炎症の関与：ゲノム編集技術の応用

研究課題名(英文) Contribution of vascular smooth muscle cells and inflammation to the development of occlusive pulmonary vascular disease

研究代表者

三谷 義英 (Mitani, Yoshihide)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60273380

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)：ゲノム編集技術による遺伝子改変ラットを用いて、PAHの肺血管病変における内膜平滑筋細胞の由来する細胞を決定し、CCR2がPAHの内膜病変形成に必須であるかを生体内で解明した。(A)CCR2 knock-outラットにおけるPAHによる肺血管病変への影響：心エコー、心臓カテーテル検査により血行動態を評価した。knock-outラットで、血行動態と組織病変の改善を認めた。(B)Myh11-Cre ラットを用いたPAHモデルでの分化型平滑筋細胞のFate mapping解析：現在、ゲノム編集技術を用いて、Myh11-Cre-ERT2 knock-inラットの作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CCR2を介した炎症がラット肺高血圧の肺血管病変の発症、進展に必須であることが判明した。これにより、肺高血圧の病変形成の機序の解明における、CCR2を介した経路の解明につながる。さらに、CCR2ないしその下流の重要な経路を標的とする分子標的治療の可能性を開く。さらに肺高血圧の閉塞性肺血管病変の血管平滑筋由来の細胞の関与が明らかになれば、その分化、遊走が内膜肥厚の形成に繋がるか否かの検討が初めて可能となる。それを踏まえて、内膜形成における分子標的治療の開発への可能性が広がる。

研究成果の概要(英文)：Using genome-edited rats, we determined the origin of intimal smooth muscle cells in pulmonary vascular lesions of PAH and elucidated whether CCR2 is essential for the formation of intimal lesions in PAH in vivo. (A) Effect of PAH on pulmonary vascular lesions in CCR2 knock-out rats: Hemodynamics was evaluated by echocardiography and cardiac catheterization, and hemodynamic and tissue lesions were improved in knock-out rats. (B) Fate mapping analysis of differentiated smooth muscle cells in a PAH model using Myh11-Cre rats: We have now succeeded in generating Myh11-Cre-ERT2 knock-in rats using genome editing technology.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧 動物モデル ゲノム編集 炎症 CCR2 ケモカイン MCP1

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(PAH)は、特発性ないし先天性心疾患、膠原病などに二次性に発症する難治性疾患で、新たな治療法開発には病態解明に基づく新規の治療標的の同定が重要である。最近、ヒト PAH 類似の特徴的な閉塞性肺血管病変を有するラットモデルを用いて、病変の進展・退縮における脱分化型血管平滑筋と炎症細胞の関与と網羅的遺伝子発現解析から得られた候補遺伝子 MCP1 受容体(CCR2)を報告した。しかし、内膜脱分化平滑筋細胞の由来細胞と、さらに CCR2 が PAH の発症、進展及び平滑筋の脱分化に必須か否かは不明である。一方、従来困難とされてきた遺伝子改変ラット作成に於いて、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて遺伝子改変ラットの作成に最近 我々は成功した。本研究では、ゲノム編集技術による遺伝子改変ラットを用いて、PAH の責任病変である肺血管病変に於ける内膜平滑筋細胞の由来する細胞を決定し、CCR2 が PAH の内膜病変形成に必須であるかを生体内(in vivo)で解明する事が全体目標である。

PAH における閉塞性肺血管病変の進展過程と治療による退縮過程の分子機序を解明する事は、本症の新規治療法を開発上で重要である。我々はこれまで、内皮機能低下、下流の cGMP、内皮活性化と macrophage の浸潤、平滑筋の形質転換、血管収縮亢進、プロテアーゼの PAH への関与を動物モデル、培養血管平滑筋系、患者検体(Mitani Y. Circulation 1997, Mitani Y. Thorax 1999, Mitani Y. FASEB J 2000, Mitani Y. Eur Respir J. 2000, Mitani Y. Eur Respir J 2001, Mitani Y. J Appl Physiol 2002, Sawada H, Mitani Y. Chest 2007, Mitani Y. J Thorac Cardiovasc Surg 2008, Mitani Y. Int J Cardiol 2011, Sawada H, Mitani Y. J Exp Med 2014, Yoshida A et al. J Hum Genet 2016, Nishimura Y et al. Front Pharmacol 2017)を用いて報告してきた。しかし、従来の動物モデルにおいて、Grade1 の病変が再現されるが、Grade 2-4 の閉塞性内膜病変は再現できない事が問題であった。

最近開発された血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体チロシンリン酸化酵素阻害剤 (Sugen) 投与下に 3 週間の 0.5 気圧の慢性低酸素暴露(Hx)により 4 段階を経て進行するヒト PAH 様 (SuHx)ラットモデルを用いて、脱分化型平滑筋 (SMA+SM1+SM2±)と炎症細胞浸潤 (CD68+macrophage)の関与、さらに網羅的遺伝子発現解析から本モデルの病変の進展、薬物的退縮に関連する炎症と脱分化の 2 関連遺伝子を同定し、炎症性ケモカイン MCP1(CCR2 リガンド)が内膜細胞に局在することを見出した (Shinohara T, Mitani Y et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2015, Otsuki S, Mitani Y et al. PLoS One 2015, Mitani Y. American Heart Association 2017)。しかし、本モデルはマウスで病変が再現できず、遺伝子改変モデルを用いた生体内(in vivo)での解析は困難と考えられた。

最近、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術の進歩により、ラットを含む大動物での遺伝子改変モデルが可能となってきた。そこで、遺伝子改変ラットの専門家である大阪大学大学院医学系研究科実験動物学真下知士博士と共同で標的遺伝子 MCP1 受容体(CCR2)の Knock-out ラットと、Cre Loxp 系を用いてタモキシフェン誘導性分化型平滑筋マーカー(Myh11)陽性細胞(中膜分化型平滑筋由来細胞)を tdTomato レポーター遺伝子産物で追跡可能な Mhy11-Cre-ERT2 X LoxP-Rosa26-tdTomato Knock-in (KI)ラットの作成に成功した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、SuHx ラットモデルに於いて、(1) CCR2 knock-out ラットにおける PAH による肺血管病変への影響、(2) Myh11-Cre ラットを用いた PAH モデルでの分化型平滑筋細胞の Fate mapping 解析(表現型転換後も分化型平滑筋由来細胞を追跡可能)、(3) 上記ラットの交配による CCR2 欠損の肺血管病変、平滑筋の脱分化、炎症への影響の解析が、具体的な研究課題である。

3. 研究の方法

(1) CCR2 knock-out (KO)ラットにおける PAH による肺血管病変への影響

CCR2 knock-out ラットと野生型ラットを用いて、SuHx 処理と対照群の 4 群を作成し、処置開始後 3 週、5 週、8 週に心エコーで循環評価を行い、8 週で心臓カテーテル検査による右室圧、大動脈圧測定後、屠殺し定量的組織評価、免疫染色による評価を行う。

(2) Myh11-Cre ラットを用いた PAH モデルでの平滑筋細胞の Fate mapping 解析

Myh11-Cre-ERT2 X LoxP-Rosa26-tdTomato knock-in (KI)ラットを作成し、3 週、5 週、8 週で心エコー、心カテによる右室圧測定後、屠殺し共焦点顕微鏡を用いて多重染色により分化型平滑筋由来細胞を評価する。

(3) 上記ラットの交配による CCR2 欠損の肺血管病変、平滑筋の脱分化、炎症への影響の解析

上記ラットの交配により、肺血管病変、炎症細胞浸潤に加えて、分化型平滑筋由来細胞の動態を共焦点顕微鏡を用いて多重染色により評価する。

4. 研究成果

(1) CCR2 遺伝子欠損ラットを用いた肺動脈性肺高血圧症の病態の検討 【背景】肺動脈性肺高血圧症(PAH)では、MCP1 等炎症性サイトカインの増加が示されている。一方、病態・血管病変形成における炎症の機序については十分に解っていない。【仮説】MCP1 の受容体である CCR2 の抑制により、PAH の血行動態、組織病変が軽減すると考え、その機序について検討した。【方法】CRISPAR/Cas9 で CCR2 遺伝子欠損ラット(CCR2(-/-))を作成した。SU5416 低酸素(SuHx)、またモノクロタリン(MCT)により PAH を誘導した。心臓カテーテルを用いて血行動態を評価し、肺組織標本で血管病変と、免疫染色による CD68 陽性細胞の血管浸潤を評価した。【結果】CCR2(-/-)では野生型(WT)と比較し、心臓カテーテルの右室収縮期圧は減少(SuHx:63.4mmHg,vs.WT66.7, MCT:32.9mmHg,vs.WT42.9)した。SuHx による末梢肺動脈の閉塞病変数が減少し(11.6%,vs.WT16.5)、MCT による中膜肥厚が軽減した(7.7%, vs. WT16.5)。末梢肺動脈 周囲への血管あたりの CD68 陽性細胞数は減少した(SuHx:0.31,vs.WT0.82, MCT:3.1,vs.WT4.5)。【結語】CCR2 欠損により、PAH の血行動態と血管病変が軽減した。CCR2 は炎症性細胞遊走の機序を介して、PAH の血管病変形成に関与している可能性がある。

(2) Myh11-Cre ラットを用いた PAH モデルでの平滑筋細胞の Fate mapping 解析

Mhy11-Cre-ERT2 X LoxP-Rosa26-tdTomato knock-in (KI)ラットを作成に成功した。生存は可能であるが、動物により生後早期に腹部膨満など異常をきたし、致死的な例も認められた。現時点で、例数を増やし、疾患モデル作成可能なラットを準備中である。

(考察)

本研究の独自性と創造性は、(1)これまでの独自の研究に基づいて候補遺伝子を網羅的 遺伝子解析により絞り込んだ点、(2) 内膜細胞の由来として中膜平滑筋に着目した点、(3) ゲノム編集技術を導入して新規に作成した遺伝子改変ラットモデルを用いた点、(4) これらの病態理解に基づいて従来の肺血管拡張作用に加えて、炎症と脱分化を治療標的として提示し、今後の基礎的、臨床的研究へと発展性が期待できる点である。

MCP1 の CCR2 ノックアウトラットを作成し、疾患モデルを作成が可能であった。MCT および SuHx モデルで、CCR2 ノックアウトは、肺血管病変の軽減が認められ、両モデルにおいて、CCR2 は必須である系であることが示された。CCR2 欠損の肺高血圧抑制機序も含めて、現在投稿準備中である。

Myh11-Cre ラットに関しては、疾患モデル作成可能な動物を準備中であり、引き続き 継続して研究を実施している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kato T, Mitani Y, Sawada H, Ohashi H, Otsuki S, Yodoya N, Shinohara T, Masuya M, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Hirayama M. | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 A non-selective endothelin receptor antagonist bosentan modulates kinetics of bone marrow-derived cells in ameliorating pulmonary hypertension in mice. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Pulm Circ | 6. 最初と最後の頁 1 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 - |
| 1. 著者名 Morikawa M, Mitani Y, Holmborn K, Kato T, Koinuma D, Maruyama J, Vasilaki E, Sawada H, Kobayashi M, Ozawa T, Morishita Y, Bessho Y, Maeda S, Ledin J, Aburatani H, Kageyama R, Maruyama K, Heldin CH, Miyazono K | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 The ALK-1/SMAD/ATOH8 axis protects against hypoxia and development of pulmonary arterial hypertension. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Signal | 6. 最初と最後の頁 607 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aay4430 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Toba S, Mitani Y, Yodoya N, Ohashi H, Sawada H, Hayakawa H, Hirayama M, Futsuki A, Yamamoto N, Ito H, Konuma T, Shimpo H, Takao M. | 4. 巻 5620 |
| 2. 論文標題 Prediction of Pulmonary to Systemic Flow Ratio in Patients With Congenital Heart Disease Using Deep Learning-based Analysis of Chest Radiographs | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 JAMA Cardiol | 6. 最初と最後の頁 5620 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1001/jamacardio.2019.5620 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mitani Y, Tsuda E, Kato H, Higaki T, Fujiwara M, Ogawa S, Satoh F, Nakamura Y, Takahashi K, Ayusawa M, Kobayashi T, Ichida F, Matsushima M, Kamada M, Suda K, Ohashi H, Sawada H, Komatsu T, Waki K, Shinoda M, Tsunoda R, Yokoi H, Hamaoka K. | 4. 巻 275 |
| 2. 論文標題 Emergence and Characterization of Acute Coronary Syndrome in Adults After Confirmed or Missed History of Kawasaki Disease in Japan: A Japanese Nationwide Survey | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Front Pediatr | 6. 最初と最後の頁 275 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2019.00275 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sawada H, Mitani Y, Nakayama T, Fukushima H, Kogaki S, Igarashi T, Ichida F, Ono Y, Nakanishi T, Doi S, Ishikawa S, Matsushima M, Yamada O, Saji T | 4. 巻 199 |
| 2. 論文標題 Detection of Pediatric Pulmonary Arterial Hypertension by School Electrocardiography Mass Screening | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Am J Respir Crit Care Med | 6. 最初と最後の頁 1397-1406 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.201802-03750C | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Sumitomo N, Baba R, Doi S, Higaki T, Horigome H, Ichida F, Ishikawa H, Iwamoto M, Izumida N, Kasamaki Y, Kuga K, Mitani Y; Japanese Circulation Society and the Japanese Society of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery of Joint Working. | 4. 巻 82(9) |
| 2. 論文標題 Guidelines for Heart Disease Screening in Schools (JCS 2016/JSPCCS 2016) - Digest Version. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Circ J | 6. 最初と最後の頁 2385-2444 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-66-0153. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshihide Mitani |
| 2. 発表標題 Challenges and opportunities in the early diagnosis and treatment, and prevention of pulmonary arterial hypertension (Invited, Lecture) |
| 3. 学会等名 The 16th International Conference ofn Endothelin (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshihide Mitani |
| 2. 発表標題 Warning Signs in daily ECG (Invited, Symposium) |
| 3. 学会等名 Asia-Pacific Society Pediatric Cardiology Society 2020 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hironori Oshita, Hirofumi Sawada, Yoshihide Mitani, Jane Kabwe, Noriko Yodoya, Naoki Tsuboya, Kazunobu Ohya, Hiroyuki Ohashi, Kazuo Maruyama, Masahiro Hirayama |
| 2. 発表標題 Perinatal hypoxia aggravates occlusive pulmonary vasculopathy in the adolescent rats: Establishment of a fatal Sugeng/Hypoxia model and its molecular basis |
| 3. 学会等名 American Heart Association (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shuhei Toba, Yoshihide Mitani, Hiroyuki Ohashi, Hirofumi Sawada, Noriko Yodoya, Hidetoshi Hayakawa, Masahiro Hirayama, Ayano Futsuki, Naoki Yamamoto, Hisato Ito, Takeshi Konuma, Hideto Shimpo, Motoshi Takao |
| 2. 発表標題 Quantitative Analysis of Chest X-ray Using Deep Learning to Predict Pulmonary to Systemic Flow Ratio in Patients with Congenital Heart Disease |
| 3. 学会等名 American Heart Association (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Souya Kitamura, Hirofumi Sawada, Yoshihide Mitani, Hiroyuki Ohashi, Noriko Yodoya, Kazunobu Ooya, Kohei Matsushita, Yuki Koike, Kohei Otake, Mikihiro Inoue, Keiichi Uchida, Kazuo Maruyama and Masahiro Hirayama |
| 2. 発表標題 Inhaled Iloprost Added-On to Nitric Oxide Rescues a Neonate with Severe Congenital Diaphragmatic Hernia without Using Extracorporeal Membrane Oxygenation |
| 3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大下裕法、三谷義英、澤田博文、大橋啓之、淀谷典子、大矢伸伸、坪谷尚季、平山雅浩 |
| 2. 発表標題 周産期侵襲は肺動脈性肺高血圧の発症、増悪の危険因子となるか:実験的検証 |
| 3. 学会等名 日本小児循環器学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大下裕法、三谷義英、澤田博文、大橋啓之、淀谷典子、大矢和伸、坪谷尚季、平山雅浩 |
| 2. 発表標題 周産期ストレスによるラット肺動脈性肺高血圧の増悪効果 |
| 3. 学会等名 日本肺高血圧肺循環学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hironori Oshita, Hirofumi Sawada, Yoshihide Mitani, Jane C. Kabwe, Noriko Yodoya, Hiroyuki Ohashi, Kazuo Maruyama, Masahiro Hirayama. |
| 2. 発表標題 Perinatal origin of pulmonary arterial hypertension: From a newly established fatal Sugden/Hypoxia rat model |
| 3. 学会等名 日本循環器学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計5件

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 三谷義英 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 朝倉書店 | 5. 総ページ数 3250 |
| 3. 書名 1. 心房中隔欠損症、房室中隔欠損症・心内膜症欠損症、心室中隔欠損症、動脈管開存、Eisenmenger症候群、内科学（第12版） | |

| | |
|-------------------------------------|------------------|
| 1. 著者名 三谷義英 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 2069 |
| 3. 書名 先天性心疾患の低酸素発作、今日の治療指針2021年版 | |

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 三谷義英 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 550 |
| 3. 書名 先天性心疾患（内科）、今日の治療指針 | |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 三谷義英 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 診断と治療社 | 5. 総ページ数 210 |
| 3. 書名 6. 鑑別のポイント 「鑑別すべき冠動脈病変・心病変」川崎病 診断の手引き ガイドブック | |

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 三谷義英 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 南江堂 | 5. 総ページ数 250 |
| 3. 書名 川崎病、実践に生きる臨床心エコー図法 | |

〔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 | 丸山 一男 (Maruyama Kazuo) (20181828) | 三重大学・医学系研究科・教授 (14101) | |
| 研究分担者 | 澤田 博文 (Sawada Hirofumi) (30362354) | 三重大学・医学系研究科・講師 (14101) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|