

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08098

研究課題名(和文) 老化シグナルによって制御される肺高血圧の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of pulmonary hypertension regulated by Senescence Signalling

研究代表者

保屋野 真 (HOYANO, Makoto)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40790283

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)：低酸素による肺高血圧症(PH)モデルマウスを開発し、肺におけるp53の発現が有意に低下していることを明らかにした。メタボローム解析と細胞外フラックスアナライザーを用いたin vitro実験から、PASMCsにおけるp53の発現抑制は、解糖のアップレギュレーションとミトコンドリア呼吸の減少をもたらし、がん細胞に似た増殖性の表現型であることが示唆された。マウスPHモデルでp53を全身的に遺伝的に枯渇させると、症状がより重篤化することが示された。肺高血圧マウスを用いた実験では一定の成果を報告したが、研究チームの退職・異動に伴い、十分な研究活動が困難となり、ヒト検体を用いた研究は進行しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症におけるp53の役割について解明を進めることができた。今後、ヒト検体を用いた研究により、肺高血圧の発症・進行の機序を解明し、肺高血圧症の予防・治療法の確立を目指したい。

研究成果の概要(英文)：We developed a mouse model of hypoxia-induced pulmonary hypertension (PH) and found significant reduction of p53 expression in the lungs. Our in vitro experiments with metabolomic analyses and the Seahorse XF extracellular flux analyzer indicated that suppression of p53 expression in PASMCs led to upregulation of glycolysis and downregulation of mitochondrial respiration, suggesting a proliferative phenotype resembling that of cancer cells. It was previously shown that systemic genetic depletion of p53 in a murine PH model led to more severe lung manifestations. Although certain results were reported in experiments using pulmonary hypertensive mice, research using human specimens did not proceed due to difficulties in conducting sufficient research activities as a result of retirement and transfer of the research team.

研究分野：Cardiology

キーワード：肺高血圧症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧患者は増加の一途をたどり、重症例の生命予後は未だ不良であるが、肺血管リモデリングが肺高血圧症の主要な病態基盤であると広く認識されるようになってきた(Circ Res 2014)。肺動脈性肺高血圧症において血管内皮細胞の細胞障害や細胞死が促進すること、それとは反対に平滑筋細胞の細胞死が抑制され過剰な平滑筋細胞増殖が生じることが肺血管リモデリングの主要な病態であると考えられている(Circulation 2014)。また、ミトコンドリア機能が抑制されることが平滑筋細胞の過剰な増殖と関連することもわかっている。しかしながら、肺高血圧症の病態において、肺血管内皮細胞や平滑筋細胞の細胞老化や細胞内代謝に着目した研究は未だ数少なく、Cre-Lox システムを用いて細胞特異的に詳細な検討を行った研究は殆ど存在しない。

2. 研究の目的

本研究において、内皮や平滑筋細胞特異的細胞老化制御マウスに(内皮細胞特異的 Cre、平滑筋細胞特異的 Cre マウスを p53flox/flox、p21flox/flox、Mdm2/4flox/flox (Mdm は p53 を抑制する分子) マウスと交配することで作製する) 慢性低酸素刺激により肺高血圧症モデルを作製し、細胞老化の病的意義の解明に挑む。また、肺血管内皮細胞や平滑筋細胞の代謝のリモデリングにも着目し、最近我々が開発した解糖系抑制 flox マウス(Pgxflox/flox)等も使い、メタボローム解析やプロテオミクス、DNA マイクロアレイ解析といった網羅的解析をバイオインフォマティクスの専門家の支援下に行うことで、肺高血圧の病態における細胞老化を介した細胞内代謝リモデリングの意義を明らかにする。また、肺高血圧症に伴う細胞老化や細胞代謝リモデリングの結果、循環血液中の代謝産物のレベルが変容し、全身の代謝不全や遠隔臓器の細胞老化を促進する可能性があり、肺高血圧症モデルマウスに加え、肺高血圧症例のサンプルを用いて検討を行う。本研究課題において、細胞老化を介した細胞代謝リモデリングを標的とした次世代の肺高血圧治療や治療コンセプトの確立に挑む。本研究課題において、肺高血圧症における細胞老化や代謝リモデリングの病的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

初年度(平成 29 年度)において野生型肺高血圧マウスモデルを用いた検討を行い、肺血管内皮細胞や平滑筋細胞の細胞老化や代謝リモデリングを Flow cytometry (FACS) やメタボローム解析を用いて解析する。また、内皮及び平滑筋細胞特異的細胞老化制御マウスの作製を行う(Floxed マウスは作製済みであり、現在交配中である)。平成 29 年度から 30 年度にかけて、肺高血圧モデルマウスやヒト肺高血圧症例の様々な採血部位に由来する血漿を用いてメタボローム解析を行い、肺高血圧に伴い変動する代謝産物を同定する。肺循環前後の採血サンプルを比較することで、肺高血圧時に生じる代謝変化を評価することができる。平成 30 年から 31 年にかけて、細胞老化制御モデルマウスの機能解析を行う。また、特異的な変動を示す代謝物質が見出された場合、Crisp/Cas9 等を用いた遺伝子改変モデルマウスの作製を含めた機能解析を行う。

1) 野生型モデルマウスを用いた検討

野生型マウスを低酸素下で 4-6 週間飼育し、肺高血圧モデルを作製する。機能解析の後に、肺から MACS や FACS を用いた Cell sorting により内皮細胞や平滑筋細胞を単離し、メタボローム解析(曾我ら) DNA マイクロアレイ解析を行い、肺高血圧に伴う細胞の代謝のリモデリングや細胞老化のレベルを評価する。処理すべきデータ量が膨大になることが懸念されるが、奥田らにデータ解析を依頼し効率的に研究を遂行する。

2) 遺伝子改変マウスの解析

1. 血管内皮細胞を標的とした解析

肺高血圧時には肺血管内皮細胞障害や細胞死が生じることがわかっている。そこで、1)血管内皮細胞の細胞老化を抑制したマウス(p53 を内皮細胞特異的に抑制することで作製する(Cdh5-BAC-CreERT2 x p53flox/flox マウス))、2)血管内皮細胞の細胞老化を促進したマウス(p53 を内皮特異的に過剰発現することで作製する(Cdh5-BAC-CreERT2 x Mdm2/4flox/flox マウス))に肺高血圧モデルを作製し、表現型を解析する。また、内皮細胞内の糖代謝を抑制したマウス(Cdh5-BAC-CreERT2 x Pgxflox/flox マウス)やミトコンドリア代謝を抑制したマウス(Cdh5-BAC-CreERT2 x Mfn1/2flox/flox マウス)に肺高血圧モデルを作製し、表現型を解析する。

2. 平滑筋細胞を標的とした解析

肺高血圧時には肺血管平滑筋細胞のミトコンドリア代謝やアポトーシスが抑制され、平滑筋細胞の過剰な増殖により血管内腔が縮小することが肺高血圧の中心的病態と考えられている。PET を用いたヒトの研究により、肺高血圧症患者では肺の糖取り込みが上昇している報告からも、

我々は平滑筋細胞において解糖系が亢進し癌細胞様の代謝プロファイルを獲得することが病態を負に制御しているという仮説を検証する。平滑筋細胞の p53 を抑制したマウス（細胞老化抑制モデル：Myh11-CreERT2 x p53flox/flox マウス）や、p53 を過剰発現したマウス（細胞老化促進モデル：Myh11-CreERT2 x Mdm2/4flox/flox マウス）に肺高血圧モデルを作製し、表現型を解析する。また、平滑筋細胞の糖代謝を抑制したマウス（Myh11-CreERT2 x Pgx1flox/flox マウス）やミトコンドリア代謝を抑制したマウス（Myh11-CreERT2 x Mfn1/2 flox/flox マウス）に肺高血圧モデルを作製し、表現型を解析する。Myh11-CreERT2、p53flox/flox、Mdm2flox/flox、Mdm4flox/flox、Pgx1flox/flox、Mfn1/2flox/flox マウスは現在飼育中であり、実験に使用可能な状況である。Cdh5-BAC-CreERT2 は久保田ら（慶應義塾大学）より輸入し繁殖準備中である。また、肺高血圧症患者由来初代平滑筋細胞（中村らから贈与済み）の解析も行うことができる。

3) ヒト・マウスにおけるバイオマーカーの探索

肺高血圧モデルマウスやヒト肺高血圧症例の血漿にメタボローム解析を行い、肺高血圧に伴い変動する代謝産物を同定する。ヒト症例においてカテーテル施行時に、1) 肺動脈検体、2) 肺動脈楔入圧測定時採血検体（左房由来検体に相当）を用いて、マウスモデルにおいては、肺動脈（もしくは右室）及び肺静脈（もしくは左室）採血を用いてメタボローム解析を行う。これらの検討を行うことで、肺循環前後の採血サンプルの代謝物変化を比較し、肺高血圧に伴う肺や全身の代謝的リモデリングを評価することができる。

4. 研究成果

低酸素による肺高血圧症（PH）モデルマウスを開発し、肺における p53 の発現が有意に低下していることを明らかにした。メタボローム解析と細胞外フラックスアナライザーSeahorse XF を用いた *in vitro* 実験から、PASMCs における p53 の発現抑制は、解糖のアップレギュレーションとミトコンドリア呼吸の減少をもたらし、がん細胞に似た増殖性の表現型であることが示唆された。マウス PH モデルで p53 を全身的に遺伝的に枯渇させると、肺の症状がより重篤化することが示された。肺高血圧マウスを用いた実験では一定の成果を報告したが、研究チームの退職・異動に伴い、十分な研究活動が困難となり、ヒト検体を用いた研究は進行しなかった。

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 1件）

1. 著者名 Wakasugi Takayuki, Shimizu Ippei, Yoshida Yohko, Hayashi Yuka, Ikegami Ryutarō, Suda Masayoshi, Katsuomi Goro, Nakao Masaaki, Hoyano Makoto, Kashimura Takeshi, Nakamura Kazufumi, Ito Hiroshi, Nojiri Takashi, Soga Tomoyoshi, Minamino Tohru	4. 巻 14
2. 論文標題 Role of smooth muscle cell p53 in pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0212889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0212889	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0件

〔図書〕 計0件

〔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	南野 徹 (Minamino Tohru) (90328063)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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