

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2020
課題番号：18K16413
研究課題名（和文）肺血流増加モデルマウスを用いた慢性血栓塞栓性肺高血圧症への新規治療介入の探索

研究課題名（英文）Novel therapeutic interventions for chronic thromboembolic pulmonary hypertension using a mouse model of increased pulmonary blood flow

研究代表者
皆月 隼（Minatsuki, Shun）
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50772761
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）：左肺切除により、残存した右肺動脈の肺血流を増大させ、右肺動脈に定量的な容量負荷（High flow）を引き起こすモデルマウス（PAOVモデル）作成した。このモデルでは右肺に血流が集中することで、血栓非存在部の血管リモデリングを表している。同モデルでは血管リモデリングを生じることが明らかとなり、その機序にマクロファージが関与していることが明確となった。これらの結果を論文として発表した。（Int Heart J. 2019 Mar 20;60(2):451-456.）

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究が慢性肺血栓塞栓性肺高血圧症の血管病態解明の一助になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We created a mouse model (PAOV model) in which left pneumonectomy increased pulmonary blood flow in the remaining right pulmonary artery, causing quantitative volume loading (high flow) in the right pulmonary artery. The left pneumonectomy increased pulmonary blood flow in the remaining right pulmonary artery, causing a quantitative volume load in the right pulmonary artery (PAOV model). This model represents vascular remodeling in the absence of thrombus due to the concentration of blood flow in the right lung. In this model, vascular remodeling was found to occur, and the involvement of macrophages in the mechanism was clarified. These results were presented in a paper. (Int Heart J. 2019 Mar 20;60(2):451-456.)

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：cardiovascular medicine

キーワード：vascular remodeling pulmonary hypertension

1. 研究開始当初の背景

CTEPH は肺動脈が器質化血栓により閉塞し肺高血圧症、低酸素血症をきたす予後不良の疾患である。臨床では閉塞血管への治療戦術の進歩により多くの症例で肺高血圧症の離脱が得られているが、これらの症例でも低酸素血症が残存し QOL を低下させる。この酸素化正常化が今後の CTEPH 治療による課題であり、これは非閉塞血管での血流増加誘発性肺血管リモデリングが原因となることが判明している。このように非閉塞血管に対しての介入の必要性は広く認知されているが、一方でその分子機構、および治療標的は不明であり大きな課題である。

このような背景から、申請者は血流増加誘発性肺血管リモデリングの分子機構を明らかにするために、定量的な肺血流増加 (high flow) をきたす病態モデルとしてマウス左肺切除モデル、PAOV モデルを樹立した。このモデルは、左肺切除により残存した右肺動脈の血流を増加させ、右肺動脈に定量的な肺血流量増加を引き起こすモデルである。この病態モデルの右肺動脈は CTEPH の非閉塞部の血管と同様の high flow をきたしていると考えられる。このモデルを用いて、申請者は既に high flow が単独で肺血管リモデリングを惹起することを確認している。興味深いことにこれまでの解析から、high flow 病態モデルマウスでの肺血管周囲壁細胞において、マクロファージをはじめとする炎症細胞浸潤を認めた。さらに申請者はマクロファージ遊走阻害作用を有するジクロロ酢酸 (DCA) 投与により、PAOV モデルでの肺血管リモデリング、および右室/左室重量比が軽減する結果を得ている。これらの事実から、肺組織に浸潤するマクロファージは単に組織リモデリングによって集積するのではなく、血管リモデリング促進作用があるという知見を得ている。

これらの予備的知見から、申請者は CTEPH の非閉塞性病変では、血栓の存在の有無にかかわらず、High flow 単独の刺激がマクロファージを中心とした炎症細胞浸潤を介して肺血管リモデリングを引き起こすとの仮説を構築した。一方、どのマクロファージ亜集団がリモデリングをなすのか、また high flow 下でのマクロファージを介した肺動脈平滑筋増殖因子は明確ではない。

2. 研究の目的

本研究は CTEPH の非閉塞部の血管では、肺血流量増加により誘導されるマクロファージが肺血管リモデリングを引き起こすとの申請者独自の発想に基づく新しい研究提案である。我々は既に肺血流量増加をきたす High flow 病態モデルマウスを構築し、解析を開始している。さらに、この病態モデルでのマクロファージ発現が亢進しているという予備的知見を得ている。現行の治療では改善が望めない非閉塞部の血管リモデリングを抑制することができれば、CTEPH 患者の予後および生活の質の改善が期待できる。これは従来の CTEPH 治療を大きく変えるものであり、極めて臨床的意義の大きな研究である。

3. 研究の方法

申請者は左肺切除により、残存した右肺動脈の肺血流を増大させ、右肺動脈に定量的な容量負荷 (High flow) を引き起こすモデルマウスを樹立した (PAOV モデル)。このマウスにおいて、左肺切除後 3 週間後に肺血管リモデリングが生じた結果、右室重量が増加することを確認している。この PAOV モデルマウスは High flow による定量的な容量負荷を呈しており、本研究の要である器質化血栓非閉塞部遠位の筋性動脈病変の病態を反映すると考えられる。既に、申請者は構築したモデルマウスにおいて肺血管周囲にマクロファージをはじめとする炎症細胞浸潤が起こることを確認した。さらに同モデルを用いた解析によりマクロファージ遊走抑制作用を有するジクロロ酢酸 (DCA) 投与により、肺血管リモデリング、および右室/左室比が低下することを確認している。

以上の事実から、申請者はマクロファージを中心とする炎症プロセスが High flow に伴う肺血管リモデリングにおいて重要な役割を果たしているとの仮説を構築し、以下の研究を計画している。

PAOV モデル作成後に肺組織に集積する炎症細胞の時系列 profile につき、免疫染色 (CD11b, F4/80, CD206, Ly6G, CD3) により評価を行う。特にマクロファージの M1/M2 極性については、フローサイトメーター (M1; Ly6c^{hi}, M2; Ly6c^{lo}) を用いてその肺血管への集積について経時的解析を行う。

肺血管リモデリング促進マクロファージ亜集団の同定 (研究計画 : 平成 31 年度)

DCA 投与により PAOV モデルにおけるマクロファージは肺血管リモデリングを促進する役割を担うことは判明したが、血管リモデリングを実際に起こす phenotype は明らかでない。

PAOV モデルでの集積するマクロファージの役割につき、マクロファージを除去するクロドロネートリポソームを経時的 (day 1, 3, 7, 21) に投与する Loss-of-function アプローチにより、肺血管リモデリングを促進するマクロファージ亜集団を同定する。クロドロネートリポソーム投与によるマクロファージ除去が十分でない場合に際して、マクロファージ 特異的にヒトジフテリア受容体を発現し、マクロファージ特異的な除去が可能である Lysm-DTR マウスの手配を開始している。加えて、その M1/M2 極性に着目したアプローチを行う。申請者は既に M1/M2 マクロ

ファージ機能を欠失したマクロファージ特異的 HIF1-、HIF-2 ノックアウトマウスの樹立に成功している。これらのアプローチにより、PAOV モデルにおいて肺血管リモデリングを促進するマクロファージ亜集団 (PAOV マクロファージ) の同定を行う。次に、PAOV マクロファージにおける遺伝子発現 profile につき、RNA-seq 法を用いて解析を行う。肺血管に常在するマクロファージと比較して有意に発現の上昇している分泌因子の絞り込みを行う。同定した候補因子につき PAOV マクロファージ・肺動脈平滑筋共培養系を用いてその役割を検証することで肺動脈平滑筋増殖因子の同定を行う。

4 . 研究成果

左肺切除により、残存した右肺動脈の肺血流を増大させ、右肺動脈に定量的な容量負荷 (Highflow) を引き起こすモデルマウス (PAOV モデル) 作成した。このモデルでは右肺に血流が集中することで、血栓非存在部の血管リモデリングを表している。同モデルでは血管リモデリングを生じることが明らかとなり、その機序にマクロファージが関与していることが明確となった。これらの結果を論文として発表した。(Int Heart J. 2019 Mar 20;60(2):451-456.) さらに、実際に肺組織に集積する炎症細胞の時系列 profile につき、免疫染色 (CD11b, F4/80, CD206, Ly6G, CD3) により評価を行う。特にマクロファージの M1/M2 極性については、フローサイトメーター (M1; Ly6chi, M2; Ly6clo) を用いてその肺血管への集積について経時的解析を行い、現在解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Minatsuki Shun, Takeda Norihiko, Soma Katsura, Katoh Manami, Maki Hisataka, Hatano Masaru, Takimoto Eiki, Manabe Ichiro, Komuro Issei	4. 巻 60
2. 論文標題 Murine Model of Pulmonary Artery Overflow Vasculopathy Revealed Macrophage Accumulation in the Lung	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 451 ~ 456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.18-281	査読の有無 無
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 Minatsuki Shun, Takeda Norihiko, Soma Katsura, Katoh Manami, Maki Hisataka, Hatano Masaru, Takimoto Eiki, Manabe Ichiro, Komuro Issei	4. 巻 60
2. 論文標題 Murine Model of Pulmonary Artery Overflow Vasculopathy Revealed Macrophage Accumulation in the Lung	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 451 ~ 456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.18-281	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------