

平成21年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790715

研究課題名（和文）肺高血圧における神経堤由来細胞と骨髄由来細胞の関与：遺伝子改変マウスを用いた検討

研究課題名（英文）Contribution of neural crest-derived and bone marrow-derived cells to the development of pulmonary hypertension: Study using mutant mouse models

研究代表者 大橋 啓之 (Hiroyuki Ohashi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70397511

## 研究成果の概要：

肺高血圧の病変形成に関与しうる幹細胞の動態を知る事は本症の病態理解に重要である。生体内の幹細胞の由来として、胎児期の神経堤細胞と骨髄細胞が注目される。そこで神経堤細胞を追跡できる遺伝子改変マウス及び骨髄細胞を追跡できる蛍光色素発現マウス骨髄の移植モデルを用いて、肺高血圧性肺血管病変へのそれらの細胞の存在分布を検討した。各細胞が肺高血圧に病変に認められ、病変を促進的、抑制的に働く可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺高血圧、先天性心疾患、幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄細胞に種々の血管構成細胞に分化する幹細胞が含まれるとされるが、肺高血圧性血管病変では不明である。

(2) 神経堤由来細胞は、中心肺動脈に分化するが、最近生後の幹細胞としての機能も報告され、肺高血圧性血管病変への関与は不明である。

(3) 最近、蛍光色素 eGFP 発現マウス骨髄移植により、骨髄由来細胞のマウスモデルへの関与が証明できる。また神経堤由来細胞は P0-Cre/Rosa26R マウスにより追跡できる。

## 2. 研究の目的

P0-Cre/Rosa26R マウス及び eGFP 発現マウス骨髄移植モデルを用いて、慢性低酸素暴露による肺高血圧モデルでの肺血管病変への骨髄由来細胞、神経堤由来細胞の存在分布を共焦点顕微鏡、フローサイトメーターを用いて検討する。

## 3. 研究の方法

(1) P0-Cre/Rosa26R マウス（神経堤由来細胞が特異的に発現するマウス）の確立

(2) eGFP 発現マウス由来骨髄の野生型マウスへの移植モデルの作成

(3) 慢性低酸素マウス肺高血圧における肺高血圧の作成と病変の評価

(4) 骨髄由来ないし神経堤由来細胞の肺高血圧マウスの肺ないし肺血管での分布の評価

#### 4. 研究成果

(1) 骨髄由来細胞が肺高血圧マウスの、マクロファージ、血管内皮細胞に分化するが、平滑筋細胞には分化しなかった。血管周囲線維芽細胞にも分化したが、肺高血圧では増加しなかった。

(2) 神経堤由来細胞は、肺高血圧性血管病変の平滑筋細胞に分化した。正常マウスにおいても、肺血管周細胞に分化した。上記をさらに数を増やして検討する事も重要と考えた。

(3) 肺高血圧性血管病変の構成細胞は、骨髄幹細胞及び神経堤由来細胞が異なった役割を果たす可能性が示唆された。

(4) 骨髄由来幹細胞の肺高血圧性血管病変への関与の詳細

**Background:** Bone marrow (BM) stem cells differentiate into various cells under physiological and pathological conditions. However, whether BM-derived cells incorporated into pulmonary vascular diseases (PVD) are of hematopoietic stem cell (HSC) origin or of non-HSC origin, is unknown. We tested the hypothesis that different BM stem cell fractions differentiate into discrete cell lineages in PVD. **Methods & Results:** Lethally irradiated C57BL6 mice, transplanted with whole BM cells (2x 10<sup>6</sup>) (TNC study, n=25) or 6,500 cells from c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup> HSC-rich fraction (KSL study, N=12) from littermates expressing eGFP, were kept in hypobaric hypoxia (380mmHg) or in the ambient air, for 21 days. In TNC study, compared with controls, percentages of CD31+eGFP+BM-derived endothelial cells/ whole CD31+ cells (4.0±0.5 vs 1.7 ± 0.4) and of MOMA2+eGFP+BM-derived macrophages/ whole MOMA2+ cells

(38.4±2.6 vs 20.0±5.0) were higher in hypoxic mice (p<.05). However, α actin+eGFP+BM-derived smooth muscle cells were not found in either group investigated. In KSL study, CD31+eGFP+ endothelial cells were rarely seen both in hypoxic and normoxic mice. In contrast, MOMA2+eGFP+ cells were more frequently seen in hypoxic mice. **Conclusions:** BM-derived macrophages and endothelial cells, which were increased in PVD, mainly originate from an HSC-rich fraction and a non-HSC-rich fraction, respectively. These findings suggest differential roles of BM-derived HSC and non-HSC in the development of pulmonary hypertension.

(5) エンドセリン受容体拮抗薬による肺高血圧抑制における骨髄由来幹細胞動態の関与の詳細

**Background:** Recent studies demonstrated that administration of endothelial progenitor cells (EPCs) or suppression of several inflammatory pathways inhibited the development of pulmonary hypertension (PH) in animals. We tested the hypothesis that bosentan modulates the incorporation of bone marrow (BM)-derived EPCs and macrophages into pulmonary vascular lesions. **Methods and Results:** Lethally irradiated C57BL6 mice, transplanted with BM cells from littermates expressing eGFP, were kept in hypobaric hypoxia (380mmHg) or in the ambient air, and were injected with saline or bosentan sodium salt (30mg/kg/d, ip), for 21 days. Compared with controls (17.6 ± 0.9mmHg), right ventricular systolic

pressure was increased in hypoxic mice ( $26.6 \pm 1.0$ ,  $p < .05$ ), which was inhibited by bosentan ( $22.9 \pm 1.1$ ,  $p < .05$ ). Furthermore, compared with controls, percentages of CD31+eGFP+BM-derived endothelial cells/ whole CD31+ cells ( $4.3 \pm 0.3$  vs  $1.4 \pm 0.1$ ) and of MOMA2+eGFP+BM-derived macrophages/ whole MOMA2+ cells ( $38.4 \pm 5.5$  vs  $17.4 \pm 2.6$ ) were higher in hypoxic mice ( $p < .05$ ), either of which were promoted ( $5.5 \pm 0.3$ ) or inhibited ( $18.6 \pm 2.4$ ) by bosentan ( $p < .05$ ), respectively. Consistently, compared with controls, percentages of EPCs/ whole mononuclear cells in the peripheral blood were increased in hypoxic mice, which were further increased by bosentan. Conclusions: Bosentan promoted BM-derived EPC incorporation but inhibited macrophage infiltration into pulmonary vascular lesions. Modulation of BM-derived cells could be new mechanisms of bosentan in inhibiting PH.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

①Mitani Y(1), Ohashi H(2), Maruyama K(7), Shimpo H(8), 計 9 名 (査読あり)

In Vivo Plaque Composition and Morphology in Coronary Artery Lesions in The Adolescents and Young Adults Long After Kawasaki Disease: A Virtual Histology-Intravascular Ultrasound Study  
Circulation (2009, in press)

②Takabayashi S(1), Ohashi H(4), Mitani Y(4), Shimpo H(5). 計 5 名 (査読あり)

Suture repair of pectus excavatum at the time of cardiac surgery on an infant  
Ann Thorac Surg. 2008 Feb;85(2):651-3.

③Mitani Y(1), Ohashi H(4), Maruyama K(8), Shimpo H(9), 計 10 名 (査読あり)

Fate of the 'opened' arterial duct: Lessons learned from bilateral pulmonary artery banding for hypoplastic left heart syndrome under the continuous infusion of prostaglandin E1.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 2007 Jun;133(6):1653-4.

④Sawada H(1), Mitani Y(2), Ohashi H(3), Maruyama K(8). 計 9 名 (査読あり)

Reversal of increased pulmonary arterial pressure associated with systemic venous collaterals after tonsillectomy in a Fontan candidate after Glenn procedure:  
Impact of obstructive sleep apnea on Fontan circulation.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 2007 May;133(5):1371-3.

Fontan candidate after Glenn procedure: Impact of obstructive sleep apnea on Fontan circulation.  
J Thorac Cardiovasc Surg. 2007 May;133(5):1371-3.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2007 May;133(5):1371-3.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) Mitani Y(1), Ohashi H(2),計 5 名

Necrotic Core and Dense Calcium, not  
Fibrous, Components contribute to an  
Increased Plaque Burden Associated with  
Localized Stenosis in Patients Long after  
Kawasaki Disease: Quantitative Gray  
Scale- and Virtual Histology-  
Intravascular Ultrasound Study

American Heart Association, New Orleans,  
US, 2008.11.10

(2) Mitani Y(1), Ohashi H(2),計 5 名

In Vivo Plaque Composition and Morphology  
in Coronary Artery Lesions in the  
Adolescents and Young Adults Long after  
Kawasaki Disease: Lessons Learned from  
Virtual Histology- Intravascular  
Ultrasound Study

American Heart Association, Orland, US,  
2007.11.7

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大橋 啓之 (Hiroyuki Ohashi)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70397511

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者