

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08506

研究課題名(和文) IL-6阻害による重症肺高血圧症の新規治療法開発に向けた基盤的研究

研究課題名(英文) Fundamental research for the development of a new strategy for the treatment of severe pulmonary hypertension by IL-6 blockade

研究代表者

稲垣 薫克 (Inagaki, Tadakatsu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：20638366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、予後不良の厚生労働省指定難病であり、早急な原因解明および根治的治療薬の開発が望まれている。本研究では、重症PAHモデルが作成可能なラットの系を用いて、肺高血圧病態形成におけるIL-6の役割を明らかにし、PAH発症機構の解明を目指すことを目的とした。IL-6は軽度から中等症の低酸素性肺高血圧モデルだけではなく、重症PHモデルであるMCTモデルおよびSuHxモデルの肺高血圧病態形成に関与し、免疫細胞のCD4陽性細胞におけるIL-6シグナルはPAHの病態形成において中心的な役割を有し、IL-6阻害が難治性PAHに対する新規の有望な治療と成りうることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症は、治療薬の開発が進み治療法が進歩しつつある疾患であるが、薬剤に適応しない患者については未だに予後不良の疾患である。本研究では炎症性サイトカインのIL-6が軽度から重症の肺高血圧症の病態形成に関与することを明らかにした。また、免疫細胞のヘルパーT細胞におけるIL-6シグナルがPH病態形成に関与することが示唆されたことから、炎症に着目した新たな治療法の確立といった肺高血圧症における創薬の可能性や、これまでの既存の薬剤に適応しない重症肺高血圧患者の予後改善にまで発展する可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a refractory disease designated by the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) with a poor prognosis, and the immediate elucidation of its cause and the development of a curative treatment are desired. In this study, we aimed to elucidate the role of interleukin-6 (IL-6) in the pathogenesis of PAH by using a rat system capable of generating a severe PAH model, and to elucidate the mechanism of PAH pathogenesis. IL-6 is involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension not only in mild to moderate hypoxic pulmonary hypertension models, but also in severe PH models, MCT and SuHx models. Furthermore, our results suggest that IL-6 signaling in CD4-positive cells has a central role in the pathogenesis of PAH. Our results indicate that IL-6 inhibition may be a novel and promising treatment for refractory PAH.

研究分野：血管生物学

キーワード：肺高血圧症 interleukin-6 炎症性サイトカイン 肺血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(Pulmonary arterial hypertension: PAH)は原因不明の機序により肺動脈に狭窄や閉塞といったリモデリングが生じて肺動脈圧が異常に上昇する予後不良の疾患であり、治療に不応だと右心不全から死に至る可能性のある厚生労働省指定の難病である。PAHの発症には Bone Morphogenetic Protein Receptor type II(BMPR2)などに代表される遺伝子の変異が関与することが明らかになっているが、変異を有する場合でも疾患浸透率は20%程度と低く、炎症や毒物といった外的素因が関与することでPAHを発症すると考えられている。我々は代表的な炎症性サイトカインである Interleukin-6(IL-6)に着目し、IL-6とPAHとの関係性について検討を進めてきた。我々はこれまでに低酸素誘発性肺高血圧症(HPH)のマウスモデルを用いて、HPHマウスに抗IL-6受容体抗体(MR16-1)を投与するとコントロール群に比べてHPH病態が著明に抑制されることを見出してきた(Hashimoto et al. PNAS. 112(20): E2677-86, 2015)。マウスのHPHモデルは肺血管リモデリングの程度が軽度から中等症の中膜肥厚を呈するモデルであるため、重症PAH患者にみられるような閉塞血管や叢状病変といった重症血管病変の形成にIL-6シグナルが関与するかについては不明のままであった。また、これまでに低酸素により肺血管内皮細胞や血管平滑筋においてIL-6が産生されることを我々や他のグループが報告していたが、肺血管の異常リモデリングの進行過程においてIL-6シグナルが関与する時期や細胞については不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、重症肺高血圧症の血管病変形成におけるIL-6の役割を明らかにするため、ヒトでの重症PAHに類似する肺血管病変を来す動物モデルである Sugan/Hypoxia (SuHx)ラットモデル(Abe et al. Circulation. 121(25):2747-54, 2010)において、IL-6の遺伝的欠損ラットを用いて検討すること、および、肺血管の異常リモデリングの進行過程におけるIL-6シグナルが関与する時期および細胞や組織を明らかにし、PAH発症機構の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

1. Interleukin-6(IL-6) knockout(KO)ラットにおける肺高血圧症モデルの解析

Crispr-Cas9の系でIL-6KOラットを作製し、IL6遺伝子の第2エクソンにおいて118塩基が欠損した個体が得られた。得られたKOラットにおけるIL-6の欠損をLPSの腹腔内投与による血中IL-6の上昇の欠如、およびIL-6の下流で生じるSTAT3のリン酸化が減弱していることにより確認した。作成したIL-6KOラットおよび同腹仔のWTラットに対し、HPHモデル、モノクロタリン(MCT)肺高血圧ラットモデル、およびSuHxモデルを適用し、それぞれ対照群および肺高血圧モデル群に分け、HPH群では3週間の低酸素(10%O₂)負荷をおこない、MCT群ではMCTを皮下に投与(60mg/kg)した後に5週間飼育し、SuHx群はVEGFR2阻害薬であるSu5416をラットに単回皮下投与(20mg/kg)した後に3週間低酸素(10%O₂)に曝露して、その後5週間正酸素に戻すことにより、それぞれのモデルで肺高血圧症を誘発した。

各モデル作成後にイソフルラン麻酔下での心臓カテーテル検査により、体血圧、右心室圧および心拍数をモニターし、右心室収縮期圧(RVSP)を測定した。カテーテル検査後に肺を生理食塩水により脱血し、4%パラホルムアルデヒドの気管内投与による伸展固定を行った。心臓は右心室と左心室及び中隔に切除して秤量した。固定した肺のパラフィン切片(4μm)を作成してElastica van Gieson (EVG)染色を施し、画像解析により血管中膜肥厚または血管閉塞率を定量した。

2. 肺血管の異常リモデリングの進行過程におけるIL-6シグナルが関与する時期や細胞の解明

2-1. PH病態形成におけるIL-6シグナルが関与する時期の検討

上記の1で用いた3種の肺高血圧ラットモデルの肺において、IL-6のmRNA発現における時系列での解析および、モデル作成後の肺におけるIL-6下流シグナルであるリン酸化STAT3の発現解析を行った。

2-2. PH病態形成におけるIL-6シグナルが関与する細胞の検討

IL-6シグナルが機能する細胞をより詳細なレベルで特定するには、ラット実験系では限界があることから、Cre-loxpシステムによる細胞特異的IL-6シグナル欠損マウスにHPHモデルを適用し検討した。PAHにおけるIL-6シグナルの下流で機能する細胞を明らかにするために、IL-6の受容体の一つであるgp130のfloxマウスを用いて血管内皮細胞(VE-Cadherin-CreERT2)、血管平滑筋細胞(SMMHC-CreERT2)およびヘルパーT(Th)細胞(CD4-Cre)におけるIL-6シグナル欠損の影響について検討した。

3. 肺高血圧症患者における疾患特異的な炎症性サイトカインシグナルの活性化に関する検討

国立循環器病研究センターに来院した肺高血圧患者自身から文書による同意が得られて採取した患者血清を対象とし(研究開発番号:M30-060-3)、採取した患者血清から疾患種別の血清IL-6濃度を網羅的サイトカイン解析(LEGENDplex, BioLegend社)により検討した。

4. 研究成果

1-1. HPH ラットモデルにおける IL-6 欠損の PH 病態抑制効果の検討

初めに、HPH ラットモデルの作成と肺高血圧病態の解析を血行動態および肺血管の組織化学的解析により行った (図 1)。WT ラットでは低酸素負荷により肺高血圧が生じ、血管の中膜肥厚が顕著になっている様子が確認されたが、IL-6KO ラットでは PH 病態の有意な抑制が確認された。

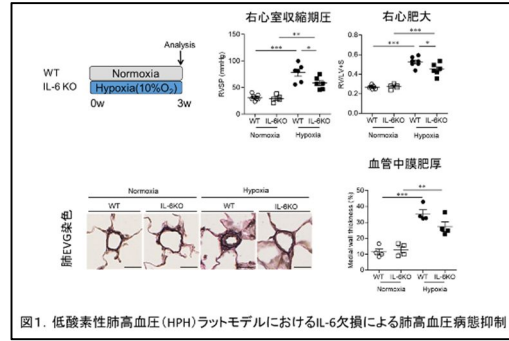


図1. 低酸素性肺高血圧 (HPH) ラットモデルにおける IL-6 欠損による肺高血圧病態抑制

1-2. MCT ラットモデルにおける IL-6 欠損の PH 病態抑制効果の検討

図 2 に示すように、MCT 投与により WT ラットでは HPH モデルよりも重度の血管リモデリングが生じ、著明な PH 病態の形成が確認されたが、IL-6KO ラットでは PH 病態の改善がみとめられ、特に右心室収縮期圧 (RVSP) および肺血管の中膜肥厚において、有意な低下が確認された。

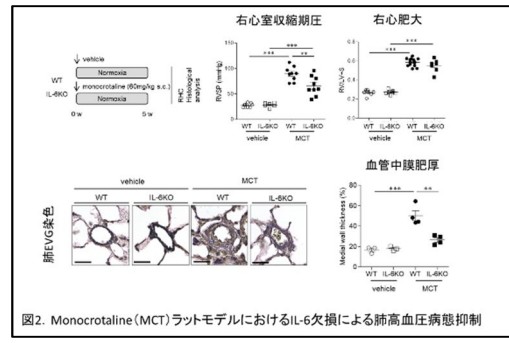


図2. Monocrotaline (MCT) ラットモデルにおける IL-6 欠損による肺高血圧病態抑制

1-3. SuHx ラットモデルにおける IL-6 欠損による PH 病態抑制効果

図 3 に示すように、WT ラットでは体血圧に匹敵するレベルまで右心室収縮期圧 (RVSP) が上昇し、右心肥大も 3 つのモデルで、最重症となっており、肺血管のリモデリングにおいては閉塞血管の著明な増加が観察された。一方、IL-6KO ラットでは、WT ラットで観察された重症 PH 患者にみられるような叢状病変や内膜閉塞病変などの肺血管病変は観察されず、PAH 病態の有意な抑制がみとめられた。また、SuHx モデル作成後 5 週後における右心室圧は KO ラットでは WT ラットとの差は見られないが、作成後 8 週では IL-6KO ラットで有意に低下したことから、IL-6 シグナルは、肺高血圧症における肺血管病変の重症化に関与していることが示唆された。

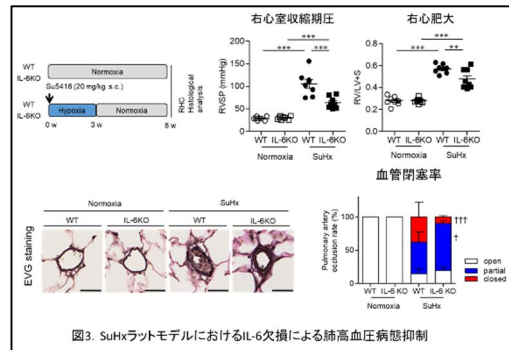


図3. SuHx ラットモデルにおける IL-6 欠損による肺高血圧病態抑制

2-1. PH 病態形成における IL-6 シグナルが関与する時期の検討

上記の 3 種の PH ラットモデルにおいて、肺における IL-6 の発現変化を検討した。その結果、図 4 に示すように、各 PH モデルにおいて肺の IL-6 mRNA 発現上昇が確認された。SuHx モデルにおいては、HPH モデルと同様に低酸素による一過性の IL-6 上昇がみられた後に、モデル作成から 8 週間後の解析時においても 2 倍程度の上昇がみとめられた。肺における IL-6 シグナルの下流で活性化されるリン酸化 STAT3 のタンパク質発現を Western Blotting により検討した結果、各 PH モデルの肺においてリン酸化 STAT3 の有意な上昇がみとめられ、IL-6KO ラットではその上昇が有意に抑制されることが明らかとなった。

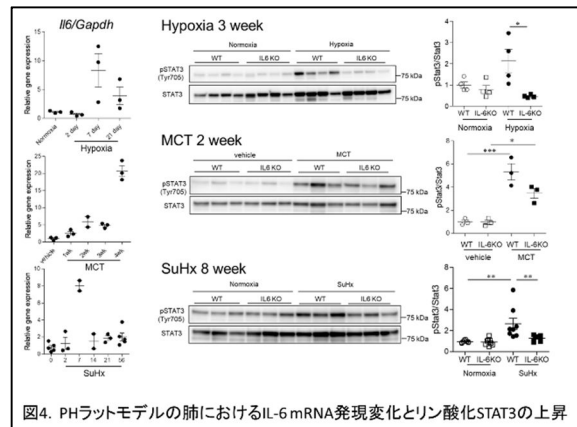


図4. PH ラットモデルの肺における IL-6 mRNA 発現変化とリン酸化 STAT3 の上昇

2-2. PH 病態形成における IL-6 シグナルが関与する細胞の検討

IL-6 受容体の一つである gp130 の flox マウスと VE-Cadherin-CreERT2 マウス、SMMHC-CreERT2 マウス、および CD4-Cre マウスをそれぞれ掛け合わせ、HPH モデルの PH フェノタイプの比較を行った結果、gp130 flox:CD4 Cre マウスにおいて有意な右心室収縮期圧の低下と肺血管中膜肥厚の抑制といった PH 病態抑制効果が確認された (図 5)。また、ラットの SuHx モデルにおける肺の免疫染色により、血管リモデリングを呈する血管

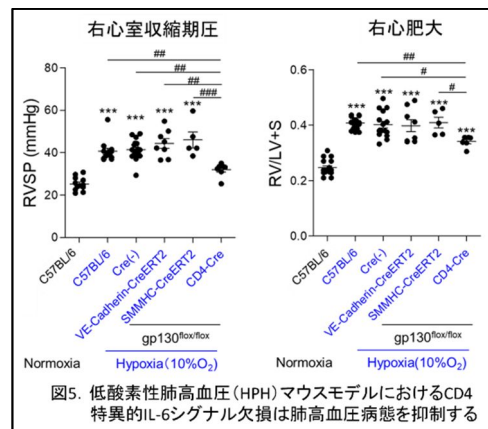


図5. 低酸素性肺高血圧 (HPH) マウスモデルにおける CD4 特異的 IL-6 シグナル欠損は肺高血圧病態を抑制する

周囲には IL-6 の下流シグナルであるリン酸化 STAT3 と血球細胞、特に CD4 陽性細胞が共染される傾向が確認された。以上のことから、軽度から重症の PH において、IL-6 はヘルパー T 細胞に作用することで PH の病態形成に寄与している可能性が示唆された。

3. 肺高血圧症患者における疾患特異的な炎症性サイトカインシグナルの活性化に関する検討

国立循環器病センターに通院する肺高血圧症患者における血中サイトカインレベルを検討する臨床研究で収集された一部の血清サンプルでサイトカイン解析を行った結果、特発性 PAH 患者の重症例や薬剤誘発性の PAH 患者において IL-6 が上昇していることを見出した(図 6)。現在も PH 患者および健常者の血液サンプルの集積を継続しており、特定の肺高血圧症のサブタイプにおける IL-6 関連シグナルの上昇が確認できれば、特定の PH のサブタイプに対する IL-6 阻害療法への発展が期待される。

以上の結果から、IL-6 は軽度から中等症の低酸素性肺高血圧モデルだけではなく、重症 PH モデルである MCT モデルおよび SuHx モデルの肺高血圧病態形成に関与し、免疫細胞の CD4 陽性細胞における IL-6 シグナルは PAH の病態形成において中心的な役割を有し、IL-6 阻害が難治性 PAH に対する新規の有望な治療と成りうることが示唆された。

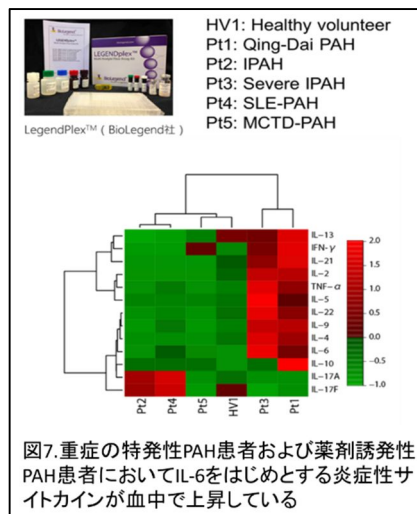


図7.重症の特発性PAH患者および薬剤誘発性PAH患者においてIL-6をはじめとする炎症性サイトカインが血中で上昇している

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Inagaki Tadakatsu, Pearson James T., Tsuchimochi Hirotsugu, Schwenke Daryl O., Saito Shigeyoshi, Higuchi Takahiro, Masaki Takeshi, Umetani Keiji, Shirai Mikiyasu, Nakaoka Yoshikazu	4. 巻 320
2. 論文標題 Evaluation of right coronary vascular dysfunction in severe pulmonary hypertensive rats using synchrotron radiation microangiography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H1021 ~ H1036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00327.2020	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 Mori Hiroyoshi, Ishibashi Tomohiko, Inagaki Tadakatsu, Okazawa Makoto, Masaki Takeshi, Asano Ryotaro, Manabe Yusuke, Ohta-Ogo Keiko, Narazaki Masashi, Ishibashi-Ueda Hatsue, Kumanogoh Atsushi, Nakaoka Yoshikazu	4. 巻 84
2. 論文標題 Pristane/Hypoxia (PriHx) Mouse as a Novel Model of Pulmonary Hypertension Reflecting Inflammation and Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-1102	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 Masaki Takeshi, Okazawa Makoto, Asano Ryotaro, Inagaki Tadakatsu et al.	4. 巻 118
2. 論文標題 Aryl hydrocarbon receptor is essential for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2023899118	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tadakatsu Inagaki, Tomohiko Ishibashi, Makoto Okazawa, Takeshi Masaki, Marie Mitsui, Kazuteru Aoki, Ryotaro Asano, Takeshi Ogo, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 Critical Roles of Interleukin-21 Signaling in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Ishibashi, Takeshi Masaki, Tadakatsu Inagaki, Makoto Okazawa, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 gp130 Signaling in CD4 Cells Is Important for the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣 薫克, 浅野 遼太郎, 石橋 知彦, 岡澤 慎, 正木 豪, 三井 麻利江, 青木 一晃, 大郷 剛, 中岡 良和
2. 発表標題 Interleukin-21阻害による肺動脈性肺高血圧症の新規治療法開発
3. 学会等名 第5回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣薫克、大郷剛、中岡良和
2. 発表標題 炎症性サイトカインシグナル阻害によるPAHの新規治療法開発
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋知彦、正木豪、稲垣薫克、森啓悦、浅野遼太郎、岡澤慎、中岡良和
2. 発表標題 CD4陽性細胞におけるgp130シグナルは肺高血圧症の病態形成に重要である
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣薫克、石橋知彦、岡澤慎、正木豪、真鍋侑資、浅野遼太郎、大郷剛、中岡良和
2. 発表標題 肺高血圧症におけるIL-6の重要性：遺伝子改変ラットを用いた検討
3. 学会等名 第29回日本血管生物医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tadakatsu Inagaki, Ryotaro Asano, Marie Mitsui, Tomohiko Ishibashi, Makoto Okazawa, Takeshi Ogo, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 Anti-interleukin-21 aptamer treatment improves pathology in a rodent models of pulmonary hypertension.
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nakanishi, T., Baldwin, S.H., Fineman, J.R., Yamagishi, H	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 405
3. 書名 Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension	

〔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	石橋 知彦 (Ishibashi Tomohiko) (30722285)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級 研究員 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中岡 良和 (Nakaoka Yoshikazu) (90393214)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

	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
研究協力者	前寺 範子 (Maedera Noriko)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究補助員 (84404)	

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