

令和 3 年 4 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17664

研究課題名(和文) 難治性肺動脈性肺高血圧症と骨髄由来細胞に関連はあるか？

研究課題名(英文) An association between bone marrow derived cells and intractable pulmonary arterial hypertension

研究代表者

三輪 秀樹 (Hideki, Miwa)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30832597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄のみGFP (green fluorescent protein, 励起光を受け緑色蛍光を発する蛋白質)を発現するGFP骨髄キメララットに、Sugen5416 (VEGF受容体拮抗薬) + 低酸素暴露処理を行った肺高血圧モデルラットを作成した。同ラットの肺動脈病変を調べたところ、GFP陽性(骨髄由来)細胞の存在が確認された。さらに、骨髄移植により、肺高血圧の重症化が抑制されることが示され、骨髄と肺動脈性肺高血圧症の関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症の生命予後は著しく改善しているが、あらゆる薬剤治療に抵抗性を示し、循環動態の改善が得られず、肺移植を要する例や死に至る症例が散見される。そのような症例に見られる不可逆的肺動脈リモデリングの形成機序は不明な点が多い。動物モデルを使用した本実験により、肺動脈リモデリングに骨髄由来細胞が存在していること、さらに骨髄移植が肺高血圧の重症化を抑制する可能性、が示された。あくまでも動物実験での結果であり、解析に用いた個体数も少なく、臨床応用にはさらなる追加研究が必要であるが、内科的治療には反応が得られない肺動脈性肺高血圧症の病態解明や新規治療展開に貢献し得る結果と考える。

研究成果の概要(英文)：Green fluorescent protein (GFP) bone marrow chimeric rats, in which only bone marrow expresses GFP, were induced pulmonary hypertension by Sugeng5416 (VEGF receptor antagonist) and hypoxia. As the results, the presence of GFP-positive (bone marrow-derived) cells was confirmed in the pulmonary vascular lesions. Furthermore, it was shown that bone marrow transplantation suppressed the severity of pulmonary hypertension. Those results suggested relationship between bone marrow and pulmonary arterial hypertension.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：骨髄 肺動脈性肺高血圧症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) に対する特異的治療薬として近年複数の薬剤が登場しているが、あらゆる薬剤に対し抵抗性を示す難治性血管病変が存在しており、現在の臨床的な課題となっている。この課題の解決には、病変の形成機序を明確にする必要がある。過年度申請者は、同種異性肺移植 + ヒトの PAH に最も近いとされる Su/Hx {Sugen5416 (vascular endothelial growth factor receptor antagonist), hypoxia} 誘導肺高血圧モデルを用いて、上記血管病変に骨髄由来と想定される Y 染色体陽性細胞が動員されていることを示した。しかし同モデルでは、Y 染色体が骨髄由来とは断定できず、別のモデルを用いて骨髄由来細胞の存在を確認する必要があった。

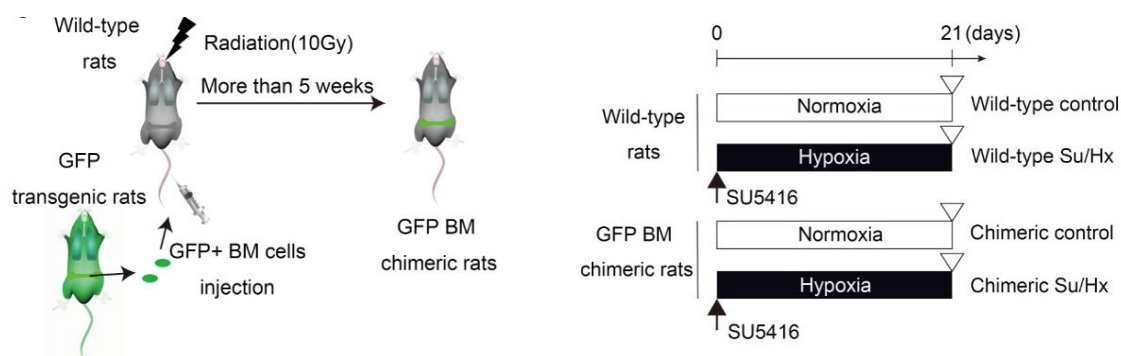
2. 研究の目的

骨髄のみを green fluorescent protein (GFP) 陽性細胞で置換した GFP 骨髄キメララット (GFP 陽性細胞 = 骨髄由来細胞と断定できる)、そのラットに Su/Hx 処理を行った GFP 骨髄キメラ + Su/Hx 誘導肺高血圧モデルラットを用いて、難治性肺動脈病変と骨髄由来細胞の関連の確認を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

A) GFP 骨髄キメラ + Su/Hx 誘導肺高血圧モデルラットの作成

まず GFP 発現 SD 雌ラットの骨髄を採取した。次にレシピエントとなる野生型 SD 雌ラットに X 線照射を行い、その後野生型ラットへ GFP 発現骨髄細胞を投与した。同ラットの末梢血を採取し、フローサイトメトリーにて骨髄の GFP 陽性細胞率を評価した。上記評価で 70% 以上の骨髄置換が得られている個体に対して、Sugen5416 投与/低酸素暴露 (Su/Hx 処理) を行った。骨髄移植を行っていない野生型ラットにも同様の Su/Hx 処理を行った。



B) 肺循環動態評価

Su/Hx 処理開始 3 週間後に右心カテーテル検査を実施し、右室収縮期圧を測定した。さらに (右室/左室 + 中隔) の重量比も算出した。

C) フローサイトメトリー

GFP 骨髄キメララット肺を摘出、浮遊細胞化した。

CD31 (血管内皮細胞マーカー), CD45 (血球系マーカー), -SMA (平滑筋マーカー) 抗体を利用し、

血管内皮細胞：CD31+CD45-

血球系細胞： -SMA-/CD31-CD45+

平滑筋細胞： -SMA+/CD31-CD45-

と定義し、これら3種の細胞内でGFP発現率を評価した。

D) 蛍光免疫組織染色

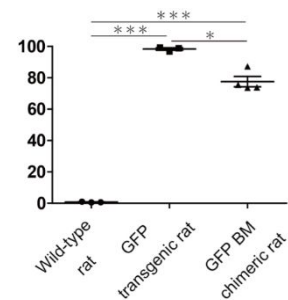
vWF(血管内皮細胞マーカー), -SMA(平滑筋マーカー)、anti-GFP抗体を利用し、共焦点顕微鏡にて肺動脈病変内のGFP陽性細胞の局在を評価した

4. 研究結果

A) GFP骨髄キメララットの末梢血GFP陽性率

左図の通り、GFP骨髄キメララット(GFP BM chimeric rat)は、wild-typeラットに比べ有意にGFP陽性率が高値であった。

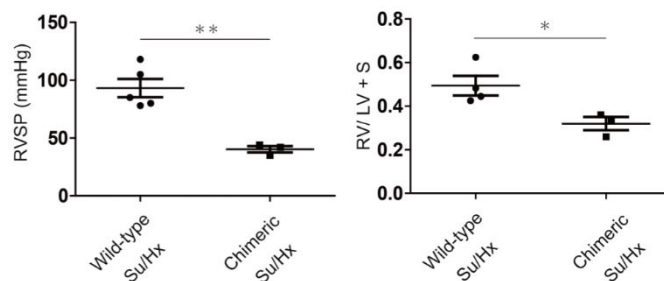
(* $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$)



B) 肺循環動態評価

Su/Hx処理を行っていない、GFP骨髄キメラ、野生型controlラットのRVSPは、それぞれ、 22.5 ± 1.3 、 23.3 ± 1.6 mmHgであった。RV/LV+Sはそれぞれ、 0.23 ± 0.01 、 0.27 ± 0.03 であった。

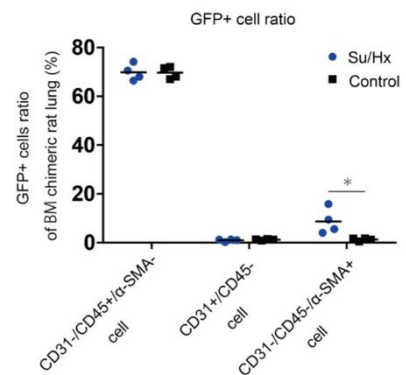
GFP骨髄キメラ + Su/Hxラットは、controlラットに比べ、RVSP, RV/LV+Sは上昇していたが(40.3 ± 2.7 mmHg, 0.32 ± 0.03)、野生型Su/Hxラットに比べ、これらの値は低値であった。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)



C) フローサイトメトリー

血球系細胞、血管内皮細胞群におけるGFP陽性率は、Su/Hx群、Control群で有意差を認めなかったが、平滑筋細胞群においては、Su/Hx群にてGFP陽性率はcontrol群に比べ有意に高値であった。

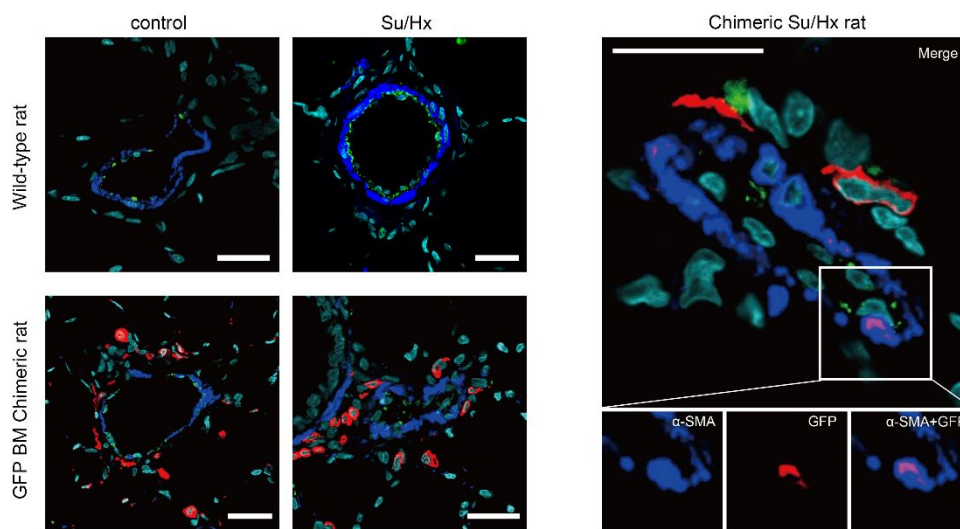
(* $P < 0.05$)



D) 蛍光免疫組織染色

GFP陽性細胞(赤)は、野生型モデルの肺組織中には見られず、GFP骨髄キメラモデル肺組織のみに見られた(左図)。

GFP骨髄キメラSu/Hxラットでは、血管平滑筋と想定される α -SMA陽性細胞内にGFP陽性細胞を認めた(右図)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三輪 秀樹
2. 発表標題 PAH動物モデルにおける肺動脈構成細胞の起源検証
3. 学会等名 第4回 日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H.Miwa
2. 発表標題 An investigation of the origins of pulmonary artery lesion cells in pulmonary arterial hypertension rat models
3. 学会等名 29th International Congress of the European Respiratory Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------