

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08155

研究課題名(和文) 肺高血圧症の閉塞性病変における平滑筋細胞形質変換のプロテオームによる網羅的解析

研究課題名(英文) proteomic analysis of smooth muscle cell transformation in obstructive lesions of pulmonary hypertension.

研究代表者

加藤 太一 (Kato, Taichi)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20422777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット肺高血圧モデルにおいて、閉塞性病変形成における平滑筋細胞の形質変換に關与する蛋白を、レーザーマイクロダイセクション法により閉塞性病變の組織を選択的に取得して、プロテオーム解析による網羅的探索を行うことで探索した。プロテオーム解析の結果、非閉塞性病變で発現が増強している蛋白を29、閉塞性病變で発現が増強している蛋白を23得た。今後はこれらの蛋白の機能解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症は肺動脈が進行性に狭窄、閉塞する難治性疾患である。この疾患では肺血管を構成する平滑筋細胞が増殖能を持つタイプに性質が変わることが血管の閉塞に關与しているが、その機序は解明されていない。本研究ではレーザーマイクロダイセクション法にて肺血管のみを選択的に肺組織から取得し、プロテオーム解析で平滑筋細胞の性質が変わることに關与する蛋白を網羅的に探索した。その結果閉塞病變のない組織から29、閉塞病變から23の特徴的な蛋白質が得られた。今後はこれらの蛋白の機能を解析して、肺高血圧症の病変形成の機序を明らかにする予定であり、この機序が明らかになれば、閉塞病變の進行抑制につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for proteins involved in the phenotypic changes of smooth muscle cells in the formation of obstructive lesions in a rat model of pulmonary hypertension. To search these proteins, we selectively obtained tissues of obstructive lesions by laser microdissection and performed a comprehensive search using proteomic analysis. Proteome analysis revealed 29 proteins that are upregulated in non-obstructive lesions and 23 proteins that are upregulated in obstructive lesions.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧症 平滑筋細胞 形質変換 レーザーマイクロダイセクション プロテオーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は、肺動脈が進行性に狭窄、閉塞する難治性疾患であり、重篤な場合、生命予後が不良な疾患である。現在の実臨床では、肺血管を直接拡張させる薬剤が開発され、治療に用いられている。しかし、それらの薬剤で治癒には至らず、肺移植が行われる例もあり、新たな治療戦略が必要である。

肺高血圧病変における血管内腔の閉塞性病変では、平滑筋細胞が増殖能は乏しく収縮能を有する収縮型から、増殖能および遊走能を有する合成型に形質変換することが関与している。しかしながら、肺高血圧病変において、この形質変換がどのような機序で起こるのかは分かっていない。

肺高血圧病変において、平滑筋細胞の形質変換に関わる分子が明らかになれば、その機能を抑制することで閉塞病変の形成を抑制することが期待される。そういった分子の探索方法としてプロテオーム解析を始めとする網羅的解析が挙げられる。しかしながら、肺には肺血管以外にも肺胞その他の肺組織があるため、肺組織全体の蛋白を用いて網羅的解析を行っても肺血管以外の機能に関わる分子が大量に検出される可能性が高く、また、肺血管に特異的な因子でも微量な変化の場合は、肺血管以外の因子の変動に隠れてしまい、検出できない可能性がある。こうした背景から肺組織全体をサンプルとした網羅的解析は非常に効率が悪いと考えられる。

研究代表者らはすでに研究代表者らが他の研究で行っているレーザーマイクロダイセクション法を用いて、肺血管組織のみを選択的に取得して網羅的解析を行うことで、より効率よく、かつ鋭敏に肺血管病変の形成にかかわる因子を同定できると考えて、本研究を始めるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット肺高血圧モデルにおいて、肺高血圧症の閉塞性病変における平滑筋細胞の形質変換に関与する蛋白を、レーザーマイクロダイセクション法により閉塞性病変の組織を選択的に取得して、プロテオーム解析による網羅的探索を行うことで同定し、機能を検証することである。

肺血管閉塞性病変における平滑筋細胞の形質変換を促す蛋白が同定されれば、従来の薬剤では治療困難であった進行した肺高血圧症に対する新しい治療ターゲットになりうるほか、血中にも分泌されるもの場合は、閉塞性病変進行のバイオマーカーとなる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺高血圧モデルの作成

肺高血圧モデルを7週齢の雄のSDラットにVEGF受容体遮断薬のSugen5416を皮下注射した後、0.5気圧の低酸素下で3週間飼育し、その後通常気圧下にて飼育して肺高血圧モデルを作成した。このモデルでは、その後通常酸素下で飼育すると、週数に従って、肺血管の閉塞性病変の出現から叢状病変の出現といったヒトの重症肺高血圧病変に極めて類似した病変が得られるため、肺高血圧症研究で現在標準的なモデルである。

### (2) モデルの肺高血圧評価

モデル動物の肺高血圧症の評価として、頸静脈からカテーテルを挿入して、右室圧測定を行った。間接的な肺高血圧評価として、摘出した心臓の右室 / 心室中隔 + 左室の重量比 (Fluton index) を計測し、右室肥大の評価を行った。

### (3) 肺血管組織のプロテオーム解析

上記肺高血圧モデルの肺組織からレーザーマイクロダイセクション法にて肺血管病変の組織を得た。収縮型が多い病変と合成型が多い病変のそれぞれから血管組織を取得し、両者の蛋白の発現を比較することで、閉塞性病変に特異的な蛋白を検索することを試みた。具体的には、得られた組織から蛋白を抽出し、プロテオーム解析を行った。解析はnanoLC-MS/MSによって直接解析するショットガン分析法にて行い、解析ソフトとしてはMASCOT (Matrix Science社)を使用する。NCBI gene, GeneMANIA、タンパク質間結合データベース (PPI データベース) などのデータベースを参考に、2群間で大きく発現の異なる蛋白のうち、平滑筋細胞の形質変換に関連する蛋白を検討した。

### (4) 同定した蛋白の肺血管病変における発現の確認

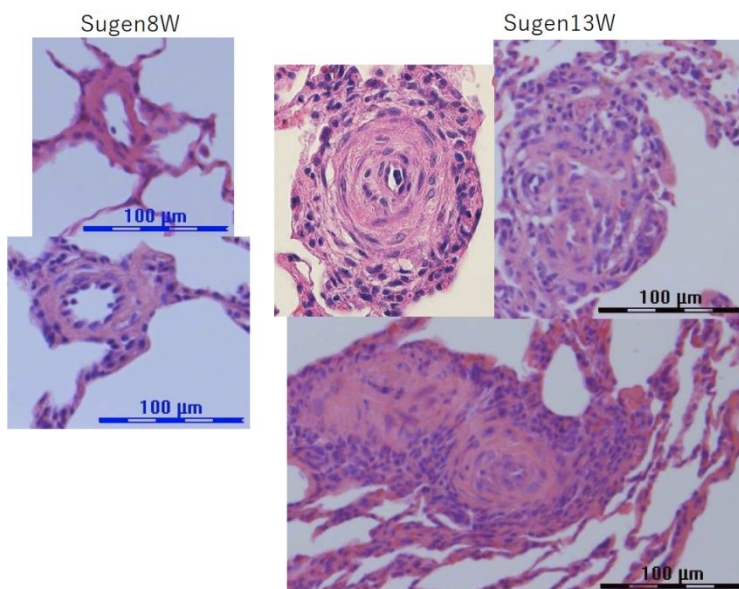
同定した蛋白について、免疫染色により、肺血管閉塞性病変と非閉塞性病変での発現量と発現部位を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 肺高血圧モデルの作成

研究代表者らの既報をふまえて、当初は低酸素 3 週間の後、通常気圧下 5 週時点での同一個体における閉塞性病変と非閉塞性病変の組織をそれぞれレーザーマイクロダイセクション法にて得て、比較する予定としていたが、閉塞性病変の比率が想定よりも少なく、時系列で病変の再検討を行った。7 週齢の雄 SD ラットに対し、Sugen5416 皮下注後 3 週間の低酸素と 5 週間(8 週モデル)または 10 週間(13 週モデル)の通常気圧下で飼育したラットを作成した。(2) に詳説するが、血行動態及び組織評価をした結果より、当初の 8 週モデルの同一個体内での閉塞性病変と非閉塞性病変の比較よりも、8 週モデルと 13 週モデル間で病変を比較する方が解析に適切であると考えられた。

図 1. 8 週モデルと 13 週モデルの組織像



### (2) モデルの肺高血圧評価

低酸素負荷も Sugen5416 投与も行っていないコントロール群に比べ、8 週モデルと 13 週モデルにおいてそれぞれ有意に右室圧は上昇していた。また、右室肥大の評価項目である Fluton index もコントロール群に比べ、8 週モデルと 13 週モデルにおいてそれぞれ有意に上昇していた。組織所見としては図 1 のように、8 週モデルと比較して、13 週モデルにおいて閉塞性病変が多く認められた。

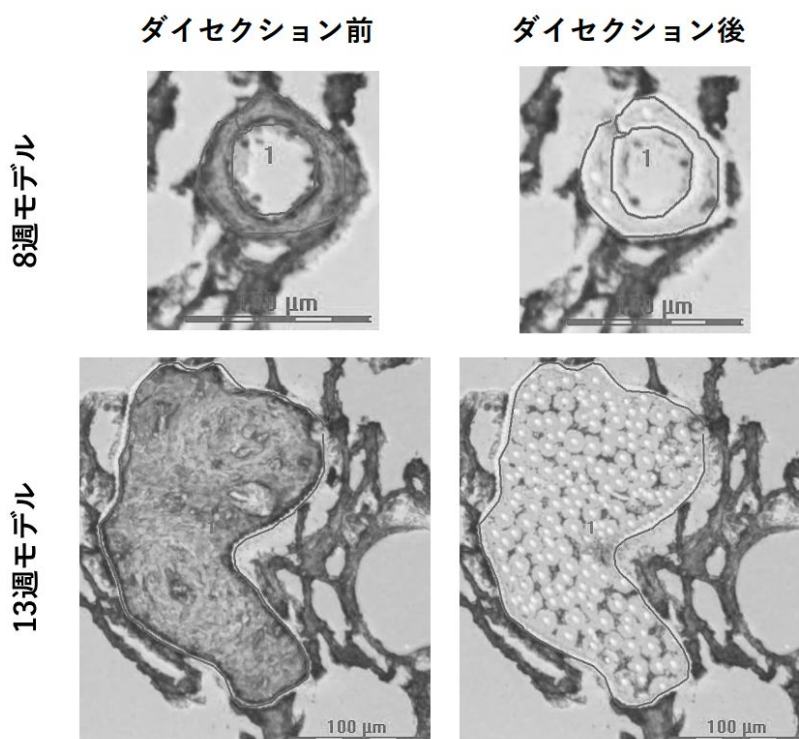
### (3) 肺血管組織のプロテオーム解析

8 週モデルと 13 週モデルのそれぞれの肺血管組織に対し、図 2 のごとく、レーザーマイクロダイセクションにて組織を取得した。

8 週モデルの肺組織においても一部閉塞性病変が認められるため、8 週モデルの組織の取得においては図 2 上段のように、形質変換があまり起こっていないと想定される血管組織をできるだけ取得して、13 週モデルとの差を検出しやすくした。

これらの組織からタンパク質を抽出し、プロテオーム解析のサンプルとした。

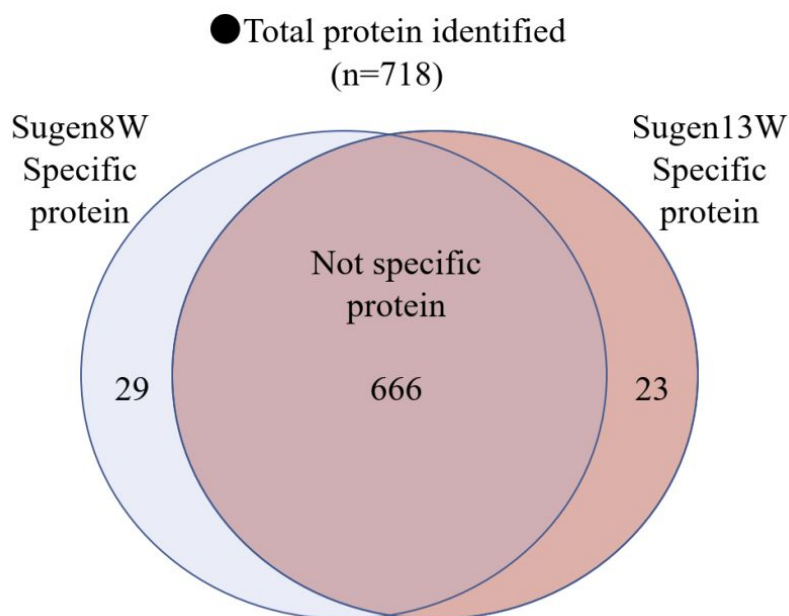
図 2. レーザーマイクロダイセクション



プロテオーム解析では、 $P < 0.05$ ,  $\log_2FC > 0.5$  をカットラインとしたところ、発現の異なる蛋白が 718 得られた。

そのうち 8 週モデルで特異的に発現が多く認められた蛋白が 29、13 週モデルで特異的に発現が多く認められた蛋白が 23 認められた。

図 3. プロテオーム解析概要



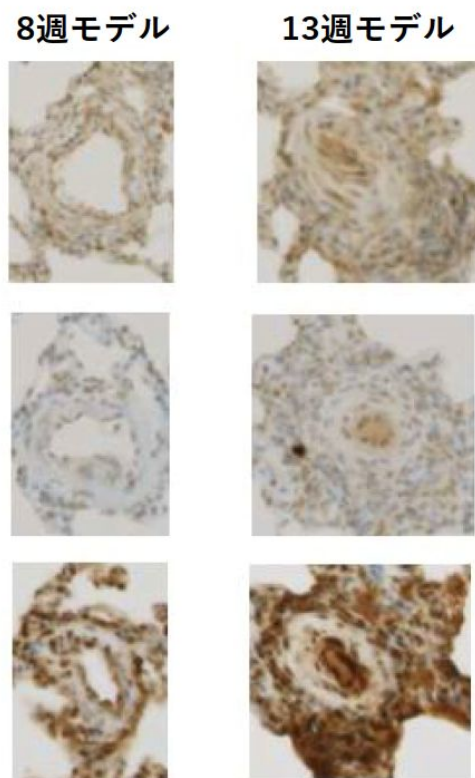
(4) 同定した蛋白の肺血管病変における発現の確認

プロテオーム解析で得られた蛋白について免疫染色にて発現を確認した(図4)。

一部の蛋白は平滑筋細胞とは異なる細胞で発現が見られたが、8 週モデルと 13 週モデルでの発現量についてはおおむねプロテオーム解析での傾向と同様であった。

今後はこれらの蛋白のうち、発現部位などから肺高血圧病変における平滑筋細胞の形質変換に関与していることが疑われる蛋白の機能解析を進める予定である。

図 4. 免疫染色による発現の確認



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawashima N, Fukazawa Y, Nishikawa E, Ohta-Ogo K, Ishibashi-Ueda H, Hamada M, Ichikawa D, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Nishio N, Kojima S, Kato T, Takahashi Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Echocardiography Monitoring of Pulmonary Hypertension after Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transplant Cell Ther.	6. 最初と最後の頁 786.e1-786.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtct.2021.05.017.	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 Kato T, Mitani Y, Masuya M, Maruyama J, Sawada H, Ohashi H, Ikeyama Y, Otsuki S, Yodoya N, Shinohara T, Miyata E, Zhang E, Katayama N, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Hirayama M.	4. 巻 10
2. 論文標題 A non-selective endothelin receptor antagonist bosentan modulates kinetics of bone marrow-derived cells in ameliorating pulmonary hypertension in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pulmonary Circulation	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2045894020919355.	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 -
1. 著者名 Yamamoto H, Hayano S, Okuno Y, Onoda A, Kato K, Nagai N, Fukasawa Y, Saitoh S, Takahashi Y, Kato T.	4. 巻 326
2. 論文標題 Phosphorylated proteome analysis of a novel germline ABL1 mutation causing an autosomal dominant syndrome with ventricular septal defect.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 81-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijcard.2020.10.032	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 Kataoka S, Kawashima N, Okuno Y, Muramatsu H, Miwata S, Narita K, Hamada M, Murakami N, Taniguchi R, Ichikawa D, Kitazawa H, Suzuki K, Nishikawa E, Narita A, Nishio N, Yamamoto H, Fukasawa Y, Kato T, Yamamoto H, Natsume J, Kojima S, Nishio I, Taketani T, Ohnishi H, Takahashi Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful treatment of a novel type I interferonopathy due to a de novo PSMB9 gene mutation with a Janus kinase inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2021.03.010	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 Fukasawa Y, Yamamoto H, Ito M, Saito A, Go K, Morimoto Y, Yasuda K, Sato Y, Hayakawa M, Kato T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Case report: High-dose epoprostenol therapy in pediatric patients with pulmonary hypertension and developmental lung disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Pediatr	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2023.1116434.	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 -

1. 著者名 Go K, Kato T, Kito M, Morimoto Y, Kawai S, Yamamoto H, Fukasawa Y, Yasuda K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Effects of general anesthesia on the results of cardiac catheterization in pediatric patients with ventricular septal defect.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Congenit Heart Dis.	6. 最初と最後の頁 235-242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32604/chd.2023.027590	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 -

1. 著者名 Kato T, Miura M, Kobayashi T, Kaneko T, Fukushima N, Suda K, Maeda J, Shimoyama S, Shiono J, Hirono K, Ikeda K, Sato S, Numano F, Mitani Y, Waki K, Ayusawa M, Fukazawa R, Fuse S, Z-Score Project 2nd Stage Study Group.	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of coronary arterial aneurysm regression in patients with Kawasaki disease by aneurysm severity: factors associated with regression.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.121.022417.	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6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kato T
2. 発表標題 Understanding the Pathophysiology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 The 16th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kato T
2. 発表標題 Screening by Electrocardiogram (Japan Experience)
3. 学会等名 The 1st Multidisciplinary and Collaborative Approach on Pulmonary Artery Hypertension: International Summer Course Program (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤太一、深澤佳絵、山本英範、沼口敦、伊藤美春、齊藤明子、佐藤義朗、内田広夫、早川昌弘
2. 発表標題 小児3群肺高血圧症に対する治療内容と効果の検討
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤太一、森本美仁、山本英範、深澤佳絵、沼口敦、伊藤美春、齊藤明子、佐藤義朗、早川昌弘
2. 発表標題 新生児慢性肺疾患に合併する肺高血圧症に対する治療の検討
3. 学会等名 第5回日本肺高血圧・肺循環学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤太一、足立史郎
2. 発表標題 肺高血圧診療における成人診療科への移行
3. 学会等名 第58回日本小児循環器学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤明子、脇田浩正、郷清貴、森本美仁、山本英範、伊藤美春、村松友佳子、深澤佳絵、佐藤義朗、加藤太一、高橋義行、早川昌弘、安田和志、伊藤諒一
2. 発表標題 長期生存し肺移植を行った非典型ACD/MPVの一例
3. 学会等名 第125回日本小児科学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	佐藤 義朗  (Sato Yoshiaki)  (30435862)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授   (13901)	
研究分担者	山本 英範  (Yamamoto Hidenori)  (80801662)	名古屋大学・医学部附属病院・医員   (13901)	

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