

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08428

研究課題名(和文)肺高血圧症の重症度および治療反応性の差異に関する検討

研究課題名(英文) Study on the difference of severity and treatment response of pulmonary hypertension

研究代表者

中里 和彦 (Nakazato, Kazuhiko)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90363762

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)：ヤヌスキナーゼであるJAK2のV617F変異クローン性造血は骨髄増殖性疾患の患者に高頻度に認められる。WHO肺高血圧分類の群には骨髄増殖性疾患がリストアップされているため、我々は造血幹細胞におけるJAK2-V617F変異に着目した。血液疾患を発症していない肺高血圧症患者の7.1% (5/70)にこの変異が同定され、対称群の0% (0/83)に比べて有意に高頻度であった。JAK2-V617Fマウスでは、変異クローンの好中球が肺動脈周囲に浸潤し、JAK2の下流にあるSTAT3のリン酸化を介してALK1-Smad1/5/8シグナリングの活性化から肺動脈リモデリングを促進していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症は希少疾患ではあるが、その中においても病状の進行や治療反応性には個人差がある。肺高血圧症の病態メカニズムの多様性について、ヤヌスキナーゼであるJAK (Janus Activating Kinase) 2の変異クローン性造血の視点から検討した。マウスを用いた基礎的検討では、JAK2-V617F変異クローンの好中球が肺動脈周囲に浸潤し、JAK2-STAT3のリン酸化からALK1-Smad1/5/8シグナリングの活性化を介して肺動脈のリモデリング、さらには肺高血圧症の進展に関与することを突き止めた。さらにALK1の抑制が肺動脈リモデリングや肺高血圧発症の予防になること示した。

研究成果の概要(英文)：Mutant clonal hematopoiesis of JAK2, a Janus kinase, is frequently observed in patients with myeloproliferative disorders. Since myeloproliferative disorders are listed in group V of the WHO pulmonary hypertension classification, we focused on the JAK2-V617F mutation in hematopoietic stem cells.

We identified this mutation in 7.1% (5/70) of pulmonary hypertensive patients without hematologic disease, which is significantly more frequent than the 0% (0/83) in the symmetric group in the clinical practice.

In basic research, JAK2-V617F mutant (gain-of-function) mice, neutrophils from the mutant clone infiltrate the peri-pulmonary artery and promote pulmonary artery remodeling from activation of ALK1-Smad1/5/8 signaling via phosphorylation of STAT3, which is downstream of JAK2.

研究分野：循環器病態学(肺循環)

キーワード：肺高血圧症 重症度 治療反応性 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

- (1) かつては難治性疾患の代表であった肺高血圧症も、種々の肺血管拡張薬の開発や慢性血栓に対するカテーテル治療の開発などにより、近年ではその予後が劇的に向上している。その一方で、病状の進行や治療に対する反応が個々の患者により異なることも認識されるようになった。従来、治療介入を始めるタイミングや治療密度が大きな要因と考えられていたが、それ以外に患者側の体質的な要因も影響している可能性がある。肺高血圧症を惹起する要因として、BMPR2 の遺伝子異常などが報告されているが、すべての患者に関して明らかになっているわけではない。肺高血圧症の発症要因に関する患者側の多様性が明らかになれば、より詳細な病型分類と治療の選択が可能となり、肺高血圧症診療の進歩に寄与すると考えられた。
- (2) 新しい切り口として、我々は造血幹細胞の JAK2 遺伝子変異に着目した。JAK2 は非受容体型チロシンキナーゼであるが、V617F 変異では、一塩基置換 (G1849T) により JAK2 蛋白質の 617 番目のバリン (V) がフェニルアラニン (F) に変異した結果、チロシンキナーゼ活性の抑制ができなくなり、恒常的な JAK2-STAT シグナル伝達の活性化を来す。真性多血症、本態性血小板血症、骨髓線維症といった骨髓増殖性疾患の過半数の患者の血液細胞から JAK2-V617F の変異クローンが確認されている。WHO 肺高血圧症分類の 5 群の中に骨髓増殖性疾患が挙げられているが、その発症メカニズムは不明であった。遺伝子解析技術の進歩により、血液疾患を認めない健常人においても、骨髓増殖性疾患で認められる遺伝子変異が血液細胞に出現するクローン性造血の存在が明らかになり、循環器疾患との関連も指摘され始めているが、血液細胞における JAK2-V617F 変異と肺高血圧症との関連についてはこれまで明らかではなかった。

2. 研究の目的

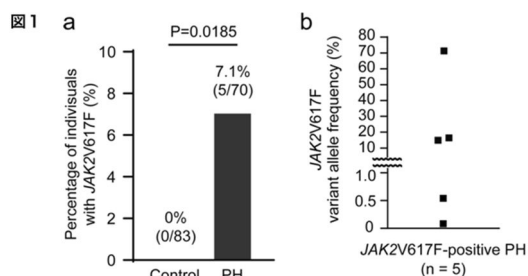
- (1) 肺高血圧患者の血液細胞における JAK2-V617F 変異クローンの存在をスクリーニングし、その頻度を明らかにするとともに、臨床像と治療経過について詳細に検討する。
- (2) 基礎的研究として、本学の輸血・移植学講座が保有している JAK2-V617F 遺伝子変異マウスを用いて肺高血圧症の病態について病理学および遺伝子学的解析を行う。

3. 研究の方法

- (1) 肺高血圧患者のうち、WHO 分類 1 群の肺動脈性肺高血圧症 (PAH) と 4 群の慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) を主な対象とし、その診断と治療については日本循環器学会の肺高血圧症治療ガイドライン 2018 に準拠した。本学附属病院の肺高血圧専門外来にて適切な鑑別診断後に上記肺高血圧症と診断された場合、本研究に登録すると同時に、PAH では各種肺血管拡張薬による治療を、CTEPH では抗凝固薬と病型に応じて開胸手術 (肺動脈血栓内膜摘除術) あるいはカテーテル治療 (バルーン肺動脈形成術) を行った。各患者の末梢血液から DNA を抽出し、アリル特異的リアルタイム PCR 法により、JAK2-V617F 変異の有無およびアレルバーデン値を解析した。JAK2-V617F 遺伝子変異を有する頻度や臨床病態像について検討した。
- (2) 本学の輸血・移植学講座で保有している JAK2-V617F 遺伝子変異マウスを用いて肺高血圧の病態について基礎的検討を実施した。JAK2-V617F マウスは、骨髓において骨髓球系と巨核球系の細胞が優位に増殖し、骨髓増殖性腫瘍の表現系を呈する。このマウスを 10% の低酸素状態に 2 週間曝露して肺高血圧症モデルを構築した。コントロールとしては野生型の littermates を用いた。心エコー法や右心カテーテル法にて肺循環血行動態を評価した。また、解剖学的評価として心臓、肺、肝臓、脾臓、骨髓を摘出し重量を測定した。肺高血圧に伴う右室肥大の程度については Fulton index (右室重量/左室+心室中隔重量) および右室体重比で評価した。さらに、肺や心臓に関しては組織病理学的な検討として、Elastica Masson 染色にて線維組織を、また α -SMA に対する免疫染色により末梢肺動脈の李明変性 (筋性変化) を評価した。

4. 研究成果

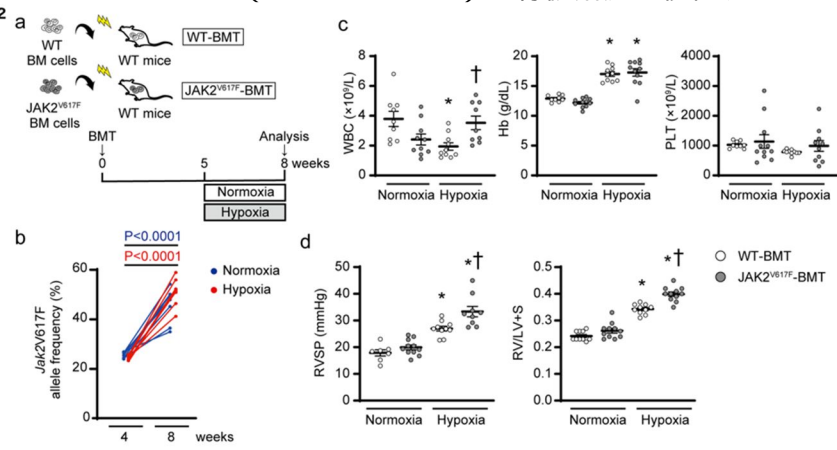
- (1) 当学附属病院で診療している肺高血圧患者 70 例のうち 7.1% (5/70) に JAK2-V617F クローン製造血を認め、これは健常対象群 (0/83) よりも有意に高頻度であった (図 1a)。JAK2-V617F を有する肺高血圧症患者のうち、6 割 (3/5) は JAK2-V617F バリエントアレル頻度 2% 以上を有する、いわゆる clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) の状態



を呈していた (図 1b)。これらの患者はすべて WHO 肺高血圧分類 4 群の CTEPH の症例であった。一方、アレール頻度の低い残り 4 割 (2/5) は第 1 群の肺動脈性肺高血圧症であり、JAK2-V617F クローン性造血は複数のタイプの肺高血圧と関連することが示唆された <文献 1 >。

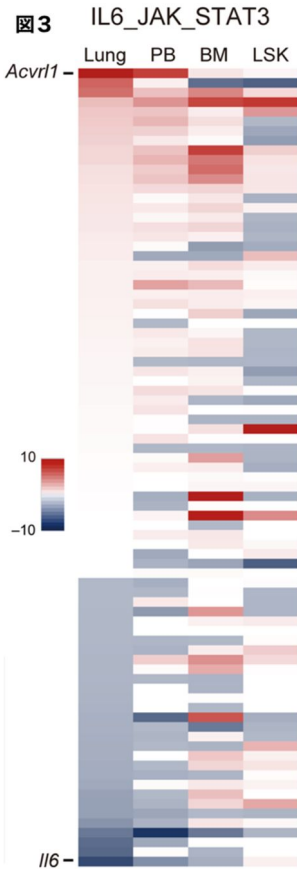
- (2) 動物モデルを用いた基礎的検討として、JAK2 遺伝子変異マウスを用いて JAK2-V617F クローン性造血と肺高血圧症との因果関係を明らかにする実験を行った。JAK2-V617F 変異を有するトランスジェニックマウス (JAK2^{V617F} マウス) の骨髓細胞を移植するモデル (JAK2^{V617F}-

BMT) では、JAK2-V617F 血球クローンは経時的に増加したが、末梢血の白血球、赤血球および血小板数からは血液疾患の表現型を来さず、CHIP の特徴を呈



していた。骨髓移植 4 週間後、10%の低酸素曝露を行う低酸素誘導型肺高血圧モデルにおいて、JAK2^{V617F}-BMT マウスは野生型マウスの骨髓細胞を移植されたレシピエントマウス (WT-BMT) と比較して、右室収縮期圧および右室肥大の程度が増加しており、肺高血圧症の増悪が認められた (図 2)。さらに肺組織の組織学的検討では、JAK2^{V617F}-BMT マウスの肺細小動脈の中膜肥厚および筋性化が進行し、肺動脈リモデリングの進行が認められた。さらに、肺動脈周囲に浸潤した好中球数の増加が認められ、好中球由来エラスターゼの活性化および好中球関連ケモカインの増加を伴っていた。JAK2-V617F 変異は好中球の肺動脈周囲への遊走・浸潤を促進させ、肺動脈リモデリングを進行させることが明らかとなった <文献 1 >。

- (3) JAK2-V617F 好中球が肺動脈リモデリングに強く関与しているという結果を受け、骨髓幹細胞から肺の好中球へと分化する各段階における遺伝子プロファイルを調べるため、JAK2^{V617F} マウスの肺、末梢血、骨髓における好中球の RNA シークエンス解析を行った (図 3)。JAK2^{V617F} マウスではいずれの分化段階でも JAK-STAT3 経路の亢進を認めた。さらに、造血幹細胞から肺好中球に分化するに従い、ALK1 をコードする *Acvr11* 遺伝子の発現が進行性に増加していた <文献 1 >。ACVRL1 (ALK1) は膜貫通型セリン/スレオニンキナーゼ受容体であるが、遺伝性肺動脈性肺高血圧症においても原因遺伝子の一つに挙げられていることから、肺高血圧症における ALK1 の役割が示唆されている。我々の実臨床においても ACVRL1 遺伝子異常を持つオスラー病合併の肺動脈性肺高血圧症の患者を経験しており、その臨床的特徴をケースレポートとして報告した <文献 2 >。
- (4) JAK2-V617F 変異では SATA3 リン酸化を介して、ACVRL1 プロモーターの活性化から ACVRL1 遺伝子発現を増加することが示されたため、ALK1 の阻害によって JAK2-V617F による肺高血圧症の病態を改善できるかどうか検討したところ、ALK1 阻害薬を投与された JAK2^{V617F} マウスでは非投与群のマウスと比較して、肺動脈周囲の好中球数およびエラスターゼ活性の有意な低下を認め、肺動脈リモデリングの改善から肺高血圧症の発症と進展を抑制することが明らかになった <文献 1 >。
- (5) クローン性造血の保因者を同定することは個別化医療の新しいアプローチと考えられる。肺高血圧症患者において、血液細胞の JAK2-V617F 変異の存在を同定し、ALK1 を阻害することは新たな治療選択に繋がる可能性がある。



<引用文献 >

1. Kimishima U, Misaka T, et al. Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension with ALK1 upregulation in lung neutrophils. *Nat Commun.* 2021;12:6177.
2. Yokokawa T, Sugimoto K, et al. Pulmonary Hypertension and Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Related to an ACVRL1 Mutation. *Intern Med.* 2020;59:221-227.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Kimishima Yusuke, Wada Kento, Minakawa Keiji, Kaneshiro Takashi, Yoshihisa Akiomi, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 3
2. 論文標題 Clonal Hematopoiesis and JAK2V617F Mutations in Patients With Cardiovascular Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: CardioOncology	6. 最初と最後の頁 134 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacc.2021.01.001	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 Kimishima Yusuke, Misaka Tomofumi, Yokokawa Tetsuro, Wada Kento, Ueda Koki, Sugimoto Koichi, Minakawa Keiji, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Oshima Motohiko, Koide Shuhei, Shide Kotaro, Shimoda Kazuya, Iwama Atsushi, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 12
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension with ALK1 upregulation in lung neutrophils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-021-26435-0	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 Yokokawa Tetsuro, Sugimoto Koichi, Kimishima Yusuke, Misaka Tomofumi, Yoshihisa Akiomi, Morisaki Hiroko, Yamada Osamu, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 59
2. 論文標題 Pulmonary Hypertension and Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Related to an <i>ACVRL1</i> Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 221 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3625-19	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 Sugimoto Koichi, Yoshihisa Akiomi, Nakazato Kazuhiko, Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Kunii Hiroyuki, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 61
2. 論文標題 Significance of Pulmonary Vascular Resistance and Diastolic Pressure Gradient on the New Definition of Combined Post-Capillary Pulmonary Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 301 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.19-476	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Misaka Tomofumi
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis and cardiovascular disease: hematopoietic JAK2V617F mutations in cardiovascular remodeling
3. 学会等名 The 38th Annual Scientific Meeting of the Japanese Section of the International Society for Heart Research (ISHR) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yokokawa Tetsuro
2. 発表標題 Hematopoietic CALR frameshift mutation exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sugimoto Koichi
2. 発表標題 Serum level of membrane type 1-matrix metalloproteinase inversely co-relates with right ventricular systolic pressure and mean pulmonary artery pressure in pulmonary hypertension
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kimishima Yusuke
2. 発表標題 Small hematopoietic clones with JAK2V617F causally lead to pulmonary hypertension through neutrophil selective migration and maturation from the precursors in the lungs
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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	杉本 浩一 (Sugimoto Koichi) (30404867)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	
研究分担者	三阪 智史 (Misaka Tomofumi) (50793080)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	横川 哲朗 (Yokokawa Tetsuro) (80748773)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	

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