

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：85306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08463

研究課題名(和文)慢性血栓塞栓性肺高血圧症における病的ずり応力の病態的意義の解明

研究課題名(英文)The role of shear stress in the pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension

研究代表者

小川 愛子(Ogawa, Aiko)

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター(臨床研究部)・独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター(臨床研究部)・分子病態研究室

研究者番号：40572748

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):慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)は、肺高血圧症の主要な原因疾患であり、指定難病である。肺動脈血管内腔が狭小化・閉塞するために肺動脈圧が上昇し、右心不全に至るが、CTEPHに対する治療薬は2剤のみであり、その効果も不十分である。代表者らは、CTEPHのカテーテル治療を改良し、世界に普及させてきた。その過程の中で、CTEPHにおける肺動脈狭窄病変における異常な「流れ」が病態進展において果たす役割に注目した。本研究では、CTEPH患者由来の細胞・血液試料を利用し、肺高血圧症研究に有用な立体培養モデルの確立や、CTEPHの病態進展に関与する血清タンパクの同定ならびにシグナル機序の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

指定難病であるCTEPHは、急性肺塞栓症後に血栓が残存・器質化して発症するとされるが、その既往のない症例が多く、発症機序は未解明である。本研究では、CTEPH患者由来血清を解析し、CTEPH特異的なバイオマーカー候補となる、CTEPH患者で増加している血清因子を複数同定した。さらに、CTEPH患者由来細胞を用いた実験により、同定した因子の一部が病態進展に直接関わる可能性が示唆され、治療標的候補となりうることを示した。また、肺高血圧症研究に有用な立体培養モデルも確立した。これは、同定した血清因子のシグナル機序解析などを含め、CTEPHの病態進展機序の解析を推進する上で有用な基盤的技術となりうる。

研究成果の概要(英文):Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is caused by thromboemboli within the pulmonary vasculature that remain unresolved, become organized, and cause narrowing of the vascular lumen. These lesions result in abnormal blood flow (e.g., altered shear stress), but the pathophysiological significance remains unclear. This research project utilized CTEPH patient-derived blood and cellular samples to analyze the role of abnormal blood flow in CTEPH pathogenesis. Multiple soluble factors elevated in CTEPH patients compared to healthy controls were identified, and its involvement in CTEPH pathogenesis was assessed using patient-derived cells. A novel 3D in vitro model was furthermore developed to assess molecular/cellular mechanisms involved in CTEPH pathogenesis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：慢性血栓塞栓性肺高血圧症 肺動脈平滑筋細胞 ずり応力

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症 (PH: pulmonary hypertension) は、肺動脈の血管内腔が狭小化・閉塞するために肺動脈圧が上昇し、右心不全に至る難治性疾患である。PH の主要な原因疾患のひとつである慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH: chronic thromboembolic pulmonary hypertension) は、指定難病である。CTEPH は、急性肺塞栓症における血栓が残存・器質化して発症するとされるが、本邦では急性肺塞栓症の既往のない症例が多く、発症機序は未解明である。根治療法は器質化血栓を外科的に除去する血栓内膜摘除術だが、難易度・侵襲度が高く、適応症例は少ない。治療薬で保険適応があるのはリオシグアトとセレキシバグの2剤のみであり、効果は限定的である。他方、もう一つの主要な PH 原因疾患である肺動脈性肺高血圧症 (PAH: pulmonary arterial hypertension) については、病態進展に寄与する分子経路の解明とともに、特異的治療薬が複数開発され、我が国における予後は劇的に改善した (Am J Cardiol 2017;119(9):1479-84 他)。同様に CTEPH の薬物治療成績を向上させるには、病態進展に寄与する分子経路の解明が重要である。

CTEPH の肺動脈内器質化血栓の形成は、肺血管リモデリングにより引き起こされる。肺血管リモデリングの本態は、肺動脈平滑筋細胞 (PASMC: pulmonary artery smooth muscle cells) の異常増殖である。肺血管リモデリングにより、血栓閉塞した中枢肺動脈のみならず、末梢肺小細動脈へと広範囲に狭窄・閉塞が進展するために PH を発症する。ゆえに、PASMC 異常増殖による肺血管リモデリングの分子機序を解明し、これを阻止すれば、CTEPH の病態進展を抑制できると考えられる。

研究代表者は世界で初めて CTEPH からの PASMC 単離法を確立し、これら PASMC の異常増殖への platelet-derived growth factor (PDGF) 経路の関与を見出した (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2009;297(4):L666-76)。また、PDGF 経路と関連の深い炎症シグナルも CTEPH における肺血管リモデリングに関与することを明らかにした (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008;295(5):L648-57)。しかし、これらのシグナル異常がそもそもどのようにして発生するのか、その機序は未解明であった。

研究代表者は、分担・松原とともに CTEPH のカテーテル治療を世界に普及させてきた (Circ Cardiovasc Interv 2012;5(6):748-55, Circ Cardiovasc Qual Outcome 2017;10(11):e004029, Eur Respir J 2017;49(6):1700718, Circ J 2018;82(5):1222-30 他)。その中で、狭窄部位を一箇所カテーテルにより機械的に拡張すると、直接治療していない末梢の狭窄も改善することを発見した (EuroIntervention 2016;12(11):e1435)。これは、狭窄により発生した異常な「流れ」、特に高いずり応力が、末梢への狭窄病変を進展させることを示唆していると考えた。ずり応力が血管壁を構成する各種細胞の表現型を変化させることは、PH 以外の血管疾患においては既知である。しかし、こうした観点からの PH 研究はまだ少なく、CTEPH に限定すれば皆無であった。特に、異常な「流れ」の、CTEPH 病態進展に深く関わる炎症シグナルの発現制御への関与については報告がなかった。

2. 研究の目的

上述の背景に基づき、本研究では、CTEPH 患者由来 PASMC を灌流培養し解析することにより、異常な流れによる PDGF 経路と炎症シグナルの制御機序を解明するとともに、患者血清の解析を並行して実施することで、CTEPH の病態進展における異常な流れの意義を明確化することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 灌流培養系を利用した解析

CTEPH 患者由来 PASMC に対し、異常な「流れ」が与える影響を解析すべく、灌流培養を行った。灌流培養を行うに際し、CTEPH 患者における異常な流れについての実測値に関する報告が存在しなかったため、患者における臨床的な血行動態測定を行い、流路設定に用いた。具体的には肺動脈内の血流速を ComboWire ガイドワイヤーにより、また同部位の血管径を Eagle Eye Platinum カテーテルによって実測し、肺動脈にかかるずり応力の強度を算出した。この臨床実測値を再現した灌流培養系を作製し、複数の CTEPH 患者由来 PASMC を灌流培養した。灌流培養した CTEPH 患者由来 PASMC を RT-qPCR や蛍光免疫染色に供し、炎症シグナルの発現や細胞の増殖率等を評価した。

(2) 三次元培養モデルを利用した解析

上述(1)の灌流培養において、CTEPH 患者由来 PASMC を単層として培養したが、リモデリングした CTEPH 肺血管病変においては、PASMC は多層性である (中膜肥厚)。細胞のシグナル特性は、自らが置かれている立体的配置によって変化することが近年報告されていることを受け、肥厚した中膜の *in vitro* モデル化を試みた。三次元培養法の一つである積層培養技術 (Nishiguchi A et al. Adv Mater 2011;23(31):3506-10, Tanaka HY et al. Biomaterials 2019;192:355-67) を利用し、PASMC を多層化し、中膜肥厚モデルの構築を

行った。さらに、構築した中膜モデルに PDGF 等の増殖因子や既存 PH 治療薬を投与することで、病態進展機序の解析や治療応答の評価へのモデルの応用可能性を探った。

(3)患者血清の解析

血行動態測定と同時に採取した CTEPH 患者血液サンプル(血清)の解析を行った。主として ELISA による血清タンパク質の発現量解析を行った。得られた知見に基づき、CTEPH 患者由来 PASM C を用いた細胞培養実験も行った。すなわち、ELISA により CTEPH 患者において健常者と比べて高値を示した血清タンパク質に着目し、それが PASM C 増殖に直接的に寄与するか評価した。siRNA や小分子阻害剤、中和抗体等を用いて、シグナル伝達機構の解析を行った。

4. 研究成果

(1)灌流培養系を利用した解析

CTEPH の病変血管で実測したずり応力は非常に高値であった。このずり応力を灌流培養により負荷した CTEPH 患者由来 PASM C の RT-qPCR 解析では、PDGF や IL6 等の炎症性サイトカインの発現亢進を示した。また、ずり応力を負荷した CTEPH 患者由来 PASM C において、増殖マーカー陽性の細胞の割合が増加することを RT-qPCR ならびに蛍光免疫染色により確認した(投稿準備中)。ずり応力への応答が知られているメカノセンサー・メカノ応答エフェクター分子の siRNA によるノックダウン実験や薬理的阻害実験を実施したが、ずり応力により誘導される炎症シグナルの増強を抑制することはできず、未知・新規の分子シグナルの関与が示唆された。今後、各種の薬理的阻害実験等を行うことにより、異常なずり応力によって誘導される炎症応答の詳細な分子機序の解明が期待される。

(2)三次元培養モデルを利用した解析

PASM C へ積層培養の原法(Nishiguchi A et al. Adv Mater 2011;23(31):3506-10)を適用して三次元的な多層化を行ったところ、多層構造を形成しうるものの、積層培養化に必要な細胞膜上の細胞外基質ナノフィルム構築に伴う工程による細胞傷害に起因する収率の低さ(<50%)が課題となった。これを打破すべく、ナノフィルム構築に伴う工程を短縮した積層培養の改良法(Tanaka HY et al. Biomaterials 2019;192:355-67)を導入した。その結果、収率の顕著な改善を認め(>90%)、安定的に PASM C の三次元的な多層化(2層~8層程度)が実現可能となった。

さらに、上述の通り作成した中膜モデルに PDGF を処置し、蛍光免疫染色に供した後に共焦点レーザー顕微鏡による観察を行ったところ、PDGF 刺激により中膜モデルが肥厚するという新規知見を得た。これに加えて、既存 PH 治療薬を投与することで、PDGF 刺激による中膜モデルの肥厚を抑制しうることを見出し、これを論文発表した(Front Bioeng Biotechnol 2020;8:482)。

構築した三次元培養モデルでは、とりわけ炎症シグナル等に関して、CTEPH 患者由来 PASM C が単層培養の場合とは異なるシグナル特性を示すという新規知見を得つつある(投稿準備中)。今後、三次元培養技術と灌流培養技術を統合した *in vitro* モデル構築ならびに解析を行うことで、CTEPH の病態進展における異常な「流れ」の意義やその詳細な機序の究明を推進する。

(3)患者血清の解析

健常者と比べて高値を示し、かつ病変部カテーテル治療による高いずり応力の改善に伴い、CTEPH 患者において血清濃度が減少するタンパク質の同定に成功した。次に、このタンパク質の肺血管リモデリングへの関与の有無を検討した。その結果、同血清タンパク質の添加あるいはその受容体の合成アゴニストの投与により、CTEPH 患者由来 PASM C の増殖が亢進することが確認できた。逆に、同血清タンパク質の受容体の小分子阻害剤ないし中和抗体の投与、あるいは受容体をコードする遺伝子の siRNA によるノックダウンによって、CTEPH 患者由来 PASM C の増殖が顕著に抑制されることが明らかとなった。興味深いことに、同血清タンパク質の受容体に対する小分子阻害剤は、健常者由来 PASM C に対しては増殖抑制効果を示さず、また、別の PH 原因疾患である PAH 患者由来 PASM C に対しても弱い増殖抑制効果しか示さなかった。以上の結果は、本研究において同定された血清タンパク質が、CTEPH の病態に特異的に寄与する肺血管リモデリング因子であることを示唆する(投稿準備中)。今後、このシグナル伝達経路を、特に異常な「流れ」との関係性に注目しながら詳細に解析することにより、CTEPH の病態進展の分子機序を究明していく。

また、炎症との関連が報告されている血小板由来マイクロパーティクルが、CTEPH 患者血清において高値であることを見出し、論文報告した(Thromb Res 2020;195:120-4)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 3件）

1. 著者名 Ogawa Aiko, Matsubara Hiromi	4. 巻 14
2. 論文標題 Should oral combination therapy be the standard of care for pulmonary arterial hypertension?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Review of Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 341-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/17476348.2020.1722641	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 Morii Chiharu, Tanaka Hiroyoshi Y., Izushi Yasuhisa, Nakao Natsumi, Yamamoto Masaya, Matsubara Hiromi, Kano Mitsunobu R., Ogawa Aiko	4. 巻 8
2. 論文標題 3D in vitro Model of Vascular Medial Thickening in Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2020.00482	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 Ogawa Aiko, Matsubara Hiromi	4. 巻 195
2. 論文標題 Increased levels of platelet-derived microparticles in pulmonary hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 120-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2020.07.030	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 Shimokawahara Hiroto, Nagayoshi Shinya, Ogawa Aiko, Matsubara Hiromi	4. 巻 37
2. 論文標題 Continual Improvement in Pressure Gradient at the Lesion After Balloon Pulmonary Angioplasty for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 1232-1239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cjca.2021.03.009	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 Shigetoshi Masataka, Hatanaka Kunihiko, Ogawa Aiko, Tabuchi Isao, Shimokawahara Hiroto, Munemasa Mitsuru, Ito Hiroshi, Matsubara Hiromi	4. 巻 79
2. 論文標題 Oxygen inhalation can selectively dilate pulmonary arteries in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension before balloon angioplasty	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 265-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2021.09.003	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 Sugiyama Yoichi, Matsubara Hiromi, Shimokawahara Hiroto, Ogawa Aiko	4. 巻 80
2. 論文標題 Outcome of mean pulmonary arterial pressure-based intensive treatment for patients with pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 432-440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2022.04.003	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 Tabuchi Isao, Ogawa Aiko, Shigetoshi Masataka, Shimokawahara Hiroto, Ito Hiroshi, Matsubara Hiromi	4. 巻 38
2. 論文標題 Low incidence of restenosis after successful balloon pulmonary angioplasty in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Intervention and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 231-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12928-022-00866-y	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6件(うち招待講演 6件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Aiko Ogawa
2. 発表標題 3D PAH Tissues
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 愛子
2. 発表標題 肺高血圧症の細胞生物学
3. 学会等名 第6回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aiko Ogawa
2. 発表標題 Recent advances in diagnosis and management of pulmonary veno-occlusive disease/pulmonary Capillary hemangiomatosis
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aiko Ogawa
2. 発表標題 BPA Techniques in Segmental CTEPH: Tips and Tricks
3. 学会等名 The International Society for Heart and Lung Transplantation ISHLTv（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aiko Ogawa
2. 発表標題 New Mechanism of Pulmonary Hypertension
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 愛子
2. 発表標題 肺高血圧症に対する新規治療薬開発に資する三次元培養モデルの開発
3. 学会等名 公益財団法人臨床薬理研究振興財団 第15回研究報告会（招待講演）
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	松原 広己 (Matsubara Hiromi) (70252955)	独立行政法人国立病院機構岡山医療センター（臨床研究部）・独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター（臨床研究部）・副院長 (85306)	

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