

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08565

研究課題名（和文）肺高血圧症の肺動脈新生内膜形成の機序：肺トランスクリプトーム解析によるアプローチ

研究課題名（英文）Mechanisms of neointima formation in pulmonary hypertension: an approach using pulmonary transcriptome analysis.

研究代表者

淀谷 典子 (Yodoya, Noriko)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40525367

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）：血管病変の異なるラットPAHモデルの肺におけるトランスクリプトームを比較解析し、標的遺伝子の同定を試みた。解析から、発現の異なる遺伝子(DEG)を選出し、さらに共通して変化するDEGにおいて共発現遺伝子の加重遺伝子ネットワーク解析を実施し、肺高血圧の新生内膜形成に関連する候補標的遺伝子を同定した。解析の結果、細胞接着分子A、炎症関連分子Bを同定した。炎症関連分子B欠損ラットを作成し、その表現型解析を行った。分子Bノックアウトラットでは、モノクロタリン誘発ラットの生存率が低下し、高度の肺血管病変を認めた。分子Bは血管平滑筋の増殖、分化状態維持に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧（PAH）は、予後不良の難治性の病態であり、近年のプロスタサイクリン系、エンドセリンレセプター拮抗薬、ホスホジエステラーゼ5型阻害薬などの治療薬の開発により予後の改善が認められるが、これら薬剤の血管病変退縮効果は示されておらず、生涯にわたり治療を継続する必要があり、医療経済的な負担も大きな課題である。PAHの閉塞性血管病変の退縮に至る新たな機序に基づく治療の開発へ繋がる成果であり、将来的に、本疾患を罹患する患者さんへの大きな利益となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to identify target genes by comparative analysis of transcriptomes in the lungs of rat PAH models with different vascular lesions. From the analysis, differentially expressed genes (DEGs) were selected, and a weighted gene network analysis of co-expressed genes in commonly altered DEGs was performed to identify candidate target genes related to neointima formation in pulmonary hypertension. As a result, cell adhesion molecule A and inflammation-related molecule B were identified. Inflammation-related molecule B-deficient rats were generated and phenotypically analyzed. Molecule B knockout rats showed reduced survival and severe pulmonary vascular lesions in monocrotaline-induced rats. Molecule B was shown to be important in maintaining the proliferative and differentiation state of vascular smooth muscle.

研究分野：小児循環器学、肺循環、新生児学

キーワード：肺高血圧 トランスクリプトーム 創薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

### 肺動脈性肺高血圧の病変形成機序

肺動脈性肺高血圧 (PAH) は、予後不良の難治性の病態であり、近年のプロスタサイクリン系、エンドセリンレセプター拮抗薬、ホスホジエステラーゼ 5 型阻害薬などの治療薬の開発により予後の改善が認められるが、これら薬剤の血管病変退縮効果は示されておらず、疾患治癒のためには閉塞病変退縮に向けた新たな治療標的が必要である。2000 年、BMP 受容体遺伝子 BMPR 2 が PAH の責任遺伝子と同定され (Lane KB, 2000)、疫学研究では BMPR 2 遺伝子異常保持者のうち PAH を発症するのは約 20% であり (Newmann JH, 2001)、PAH 発症には遺伝子異常と環境的因子の連関が推定されるなど病態理解は大きく進んだ。PAH は、病理組織学的に肺動脈の内膜と中膜の肥厚、叢状病変 (plexiform lesion) などの肺動脈閉塞病変で特徴づけられる。PAH の閉塞性血管病変には、alpha-smooth muscle actin (aSMA) 陽性細胞が存在するが、新生内膜病変で異常増殖する細胞の由来や内膜病変形成に至る分子機序は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、血管病変退縮に向けた治療標的の開発を目指し、特に新生内膜形成に至る分子機序の同定を試みる。

本研究では、肺動脈性肺高血圧 (PAH) の血管病変において、特に新生内膜形成に関わる遺伝子制御を明らかにし、新生内膜をターゲットとした新規治療の開発を目指す。

ヒト PAH 類似の新生内膜病変を呈するラット PAH モデルと新生内膜形成のないラット PAH モデル (慢性低酸素) の肺におけるトランスクリプトームを比較解析し、標的遺伝子を同定する。

候補遺伝子の肺血管病変での発現をラット肺組織で確認する。

培養血管平滑筋細胞で候補遺伝子の発現量を抑制し、機能変化を解析する。

## 3. 研究の方法

### ラットモデルの作成

慢性低酸素 (CHx) モデル: 7 週齢の Sprague-Dawley (SD) ラットを低気圧性低酸素 (1/2 気圧、10% 酸素相当) チャンバーにて 3 週間暴露して作成する。

ヒト PAH 類似ラット肺高血圧モデル: Sugen/Hypoxia (SU/Hx) モデルの作成は既報の方法 (Abe K, 2010) による。7 週齢の SD ラットに血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体阻害剤 SU5416 (20mg/kg, Cayman) または vehicle (Carboxy methyl cellulose 溶液) を皮下投与し、続いて低気圧性低酸素 (1/2 気圧、10% 酸素相当) に 3 週間暴露する。その後正常酸素に戻し、2 週間、5 週間、10 週間後に評価を行う。コントロールとして Vehicle + 正常酸素、Vehicle + 低酸素、および SU5416 + 正常酸素群 (それぞれ 10 匹) を検討する。

### 肺組織のトランスクリプトーム解析による候補遺伝子の同定

正常酸素コントロール、CHx、SU/Hx のラットモデル (Sugen 投与後 3 週間、5 週間) の肺組織から、RNA を抽出し、Microarray (Affymetrix Rat Gene arrays) にてトランスクリプトームデータを得、発現量のことなる遺伝子 (differentially expressed genes, DEG) を同定する。NCBI/ GEO データベースから取得したヒト PAH のトランスクリプトームデータ (GSE24988, Mura M, 2012; GSE53408, Zhao YD, 2014) から DEG を同定する。共通して変化する DEG において共発現遺伝子の加重遺伝子ネットワーク解析 (Weighted Gene Co-Expression Network Analysis, WGCNA) を実施し、肺高血圧の新生内膜形成に関連する候補標的遺伝子を同定する。

### 肺高血圧の評価、組織採取、血管病変の評価

肺高血圧モデルを作成後に、上記のごとく決められたタイムポイントにて麻酔下で心エコー (Vevo3100, -70MHz Probe) を用いて、心拍出量、左心機能、肺高血圧の評価。各実験最終時点では、内頸静脈より、圧モニター下でカテーテルを留置し、肺動脈圧、右心室圧、大動脈圧を測定し、心肺組織を摘出する。右心室 / 左心室重量比から右室肥大を評価する。 (Mitani Y, Maruyama K, 1997, Sawada H, 2007) その後、気管切開下の人工呼吸下で開胸し、右肺門部を絹糸で結紮、右肺を肺葉毎に切除し、蛋白室・RNA 解析用に凍結する。右室切開により生理食塩水で脱血還流し、メタノールカルノアで還流固定し、パラフィン切片、凍結切片を作製する。

### 病変部位での標的遺伝子発現の評価

標的遺伝子産物の発現を、コントロール、CHx、SU/Hx (3 週、5 週、8 週) の肺組織で免疫染色を行い評価する。細胞種の同定は vWF (abcam) aSMA (Sigma) ラット CD68 (ED-1, Millipore) 抗体を用いに行い評価する。免疫染色は化学発色と蛍光 2 重染色により、既報の方法で行い、光学顕微鏡または共焦点顕微鏡で観察する。 (Sawada H, 2007, Otsuki S, 2013) また、肺組織から RNA を抽出し (RNAeasy mini, Qiagen) 標的遺伝子 mRNA レベルを RT-qPCR 法 (TaqMan Gene Expression Assays) にて解析する。

### 肺動脈平滑筋細胞の分離培養とタンパク質遺伝子発現解析

コントロールと CHx、SU/Hx ラットから、平滑筋を培養し、候補遺伝子の発現を評価する。細胞培養は主肺動脈分岐部以降の抹消ラット肺動脈を摘出し、内膜、外膜組織を除去後、1 mm<sup>2</sup> の小

切片とし、explant 法にて分離する。培養は、D-MEM/F-12 / 10%ウシ血清にて行い、2～5代の細胞を用いる。細胞種の同定は、alpha -SMA (Sigma)、Calponin 抗体(Abcam)を用いて蛍光抗体法にて行う。それぞれ培養した肺動脈平滑筋細胞の PDGF-BB (10ng/ml, R&D system) による増殖を BrDU assay(Merck)ならびに PCNA(Cell Signaling)、Ki67(Atlas antibody)による蛍光抗体法により評価する。TNF-alpha による炎症刺激時のサイトカイン発現レベル( IL-1, IL-6, MCP-1, RANTES, GM-CSF) を ELISA (R&D system) にて評価し、コントロールと比較する。同様に細胞から RNA を抽出し、mRNA レベルを RT-qPCR 法にて解析する。細胞内シグナル機序に関して、p38MAPK, NF-kB の活性化を、抗リン酸化 p38 または I-kappaB 抗体( Cell Signaling Technology) を用いたウエスタンブロット法により評価する。

#### 候補遺伝子の発現量抑制によるラットとヒト肺動脈平滑筋細胞機能解析

候補遺伝子の siRNA (Silencer Select siRNA, Thermo Fisher Scientific) を lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific)によりラットならびにヒト肺動脈平滑筋細胞(Clonetics, CC2581)に導入しノックダウンし、その影響を上記の細胞機能アッセイにより評価する。

#### ラットモデルの作成と表現型の解析

トランスクリプトーム解析、病変での発現の評価、細胞レベルでの機能解析にて、候補遺伝子をさらに同定し、in vivo での評価のため、標的遺伝子 ノックアウト (K/O) ラットを作成し、肺高血圧の表現型解析を行う。標的遺伝子 K/O ラットは、大阪大学実験動物学教室(真下知士准教授)にて作成(Mashimo T, 2010、Mashimo T, 2013)し F0 個体を当施設に搬送する。挿入欠損 (InDel) を確認した個体を K/O とし、野生型をコントロールとして上述の、肺高血圧モデルを作成し標的遺伝子 K/O により内膜病変形成が抑制されるか否かを検討する。

## 4 . 研究成果

上記の方法で作成した、ラットモデルの肺組織のトランスクリプトーム解析から、細胞接着分子 (分子 A)、炎症性ケモカイン (分子 B) が標的として同定された。分子 A は、ラット肺血管病変で発現の増強が確認された。今後、ノックアウトラットの作成を検討している。分子 B については、そのレセプター欠損ラットを作成し、肺高血圧の病態の解析をおこなった。レセプター欠損ラットでは、肺高血圧の軽減が観察され、さらに、分離培養した肺動脈血管平滑筋では、増殖の低下、分化マーカーの発現などに変化が見られ、レセプター欠損が新たな治療標的となりうることを示す結果であった。これらのことから、本研究による実験結果から、炎症を標的とした PAH 治療に新たな臨床的な洞察を得た

## 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 4件）

1. 著者名 Ito Toshikazu, Zhang Erquan, Omori Ayaka, Kabwe Jane, Kawai Masako, Maruyama Junko, Okada Amphone, Yokochi Ayumu, Sawada Hirofumi, Mitani Yoshihide, Maruyama Kazuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Model difference in the effect of cilostazol on the development of experimental pulmonary hypertension in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-021-01710-4	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 Kawai Masako, Zhang Erquan, Kabwe Jane Chanda, Okada Amphone, Maruyama Junko, Sawada Hirofumi, Maruyama Kazuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Lung damage created by high tidal volume ventilation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Pulmonary Medicine	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-022-01867-6	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 Kabwe Jane Chanda, Sawada Hirofumi, Mitani Yoshihide, Oshita Hironori, Tsuboya Naoki, Zhang Erquan, Maruyama Junko, Miyasaka Yoshiki, Ko Hideyoshi, Oya Kazunobu, Ito Hiromasa, Yodoya Noriko, Otsuki Shoichiro, Ohashi Hiroyuki, Okamoto Ryuji, Dohi Kaoru, Nishimura Yuhei, Mashimo Tomoji, Hirayama Masahiro, Maruyama Kazuo	4. 巻 23
2. 論文標題 CRISPR-mediated Bmpr2 point mutation exacerbates late pulmonary vasculopathy and reduces survival in rats with experimental pulmonary hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-022-02005-w	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 Tsuboya Naoki, Makino Hirotooshi, Mitani Yoshihide, Ito Michiko, Ohya Kazunobu, Morimoto Mari, Hanaki Ryo, Yodoya Noriko, Ohashi Hiroyuki, Sawada Hirofumi, Sugiyama Kenji, Hirayama Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Erythema and Induration of Bacillus Calmette-Guerin Scar Associated With Multisystem Inflammatory Syndrome in Children in Japan: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 849473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fped.2022.849473	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0件

〔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	丸山 一男  (Maruyama Kazuo)  (20181828)	鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授   (34104)	
研究分担者	西村 有平  (Nishimura Yuhei)  (30303720)	三重大学・医学系研究科・教授   (14101)	
研究分担者	澤田 博文  (Sawada Hirofumi)  (30362354)	三重大学・医学系研究科・講師   (14101)	
研究分担者	三谷 義英  (Mitani Yoshihide)  (60273380)	三重大学・医学部附属病院・准教授   (14101)	

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