

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17204

研究課題名(和文) 肺血管内皮細胞指向性アデノ随伴ウイルスを利用した肺動脈性肺高血圧症の病態解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of pulmonary arterial hypertension using pulmonary vascular endothelial cell-directed adeno-associated virus.

研究代表者

白石 安永 (Shiraishi, Yasunaga)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 特殊環境衛生研究部門・助教)

研究者番号：30813365

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)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)のメカニズムの解明のため、肺血管内皮細胞に特異的な遺伝子改変を行いマウスにて研究を行った。アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用して肺血管内皮細胞にCtBP1と呼ばれるシグナル因子を過剰発現させる方法が用いられた。また、肺血管内皮細胞に特異的なAAVの作製と精製方法の改良も行われ、AAVの収量と純度を向上させることに成功した。CtBP1は短期的には肺動脈収縮期圧を上昇させマウスPAHの増悪因子となるが、病変は可逆的であり、病態が増悪するヒトPAHとは異なるものであった。今後別のシグナル因子の検討や異なる動物種による検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は肺動脈性肺高血圧症(PAH)の発症メカニズムを解明するために、肺血管内皮細胞に特異的な遺伝子改変を行う方法を開発した。学術的意義は、PAHの発症メカニズムに関する新たな知見を提供する点にある。この研究によって肺血管内皮細胞のシグナル因子の役割が明らかにされた。また、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子改変手法の開発も重要な貢献である。社会的意義としては、この研究によって難病であるPAHの病態解明に一步近づき、将来的には新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。また、遺伝子治療の分野においてAAVの指向性や精製方法の改良が行われたことは、難病治療などへの応用にも影響を与える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of pulmonary arterial hypertension (PAH), a specific genetic modification of pulmonary vascular endothelial cells was used in mice. Adeno-associated virus (AAV) was used to overexpress a signaling factor called CtBP1 in pulmonary vascular endothelial cells. The preparation and purification of AAV specific for pulmonary vascular endothelial cells was also improved, and the yield and purity of AAV were successfully increased. Although CtBP1 is an exacerbating factor in mouse PAH by increasing pulmonary artery systolic pressure in the short term, the lesion is reversible and different from human PAH, which is an exacerbating disease. Further studies with other signaling factors and with different animal species are needed.

研究分野：分子生物学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は、細小肺動脈の狭窄・閉塞により肺動脈血管抵抗が上昇し、右心不全をきたす予後不良な進行性の疾患である。疾患の克服には至っておらず、メカニズムの解明と、それに基づいた根本的治療法の開発が課題となっている。また、アデノ随伴ウイルス(AAV)は、安全に長期間の遺伝子発現が可能なウイルスベクターである。動物の遺伝子改変実験に限らず、近年は難病治療に対し遺伝子治療薬として利用されている。一方で臓器指向性を持たせることや作製・精製方法の改善が今後の問題点となっている。

2. 研究の目的

血管内皮細胞は血流に面しており、血液内の因子に直接影響を受ける。体血管においては血管内皮細胞がセンサーの働きをして、血液内因子により血管内皮のシグナル因子が変化する。それにより血管が機能的かつ器質的に変化する事が知られており、疾患発症の原因となっている。しかし、PAHにおいてこれまで肺血管内皮細胞に特異的なシグナル因子はほとんど研究されていない。PAHは何らかの素因に低酸素の刺激が加わることで生じると考えられており(Pugliese SC, Am J Physiol. 2014)、低酸素による代謝の変化が一定の役割を担っている。低酸素状態では細胞内のNAD⁺に比しNADHが増加するといった代謝変化が生じる。またPAHの病変細胞では癌細胞でよくみられる好氣的解糖の亢進(Warburg効果)を認め、低酸素状態になくともNADHが増加する(偽低酸素)。本研究ではPAHの発症メカニズムに低酸素による代謝変化の観点から検討する。肺血管を構成している種々の細胞のうち最初に低酸素状態に曝露するのは血管内皮細胞である。そこで、肺血管内皮細胞に指向性を有するAAVを使用することで、特異的に遺伝子改変を行い、PAH発症のメカニズムを検討する。C末端結合タンパク1(C-Terminal Binding Protein 1: CtBP1)は細胞の代謝変容を感知し活性化するシグナル因子である。NADH/NAD⁺比が上昇すると活性化し、細胞増殖や不死化、内皮細胞の間葉系細胞への転換(EndMT)を制御している(Blevins MA, Mol Cancer Ther. 2017)(Zurlo G, J Hypertens. 2018)。本研究ではマウス肺血管内皮細胞に指向性のあるAAVを用いて、肺血管内皮特異的にCtBP1を過剰発現させ、PAHに対する影響につき検討をする。

3. 研究の方法

まずこれまでの報告を基(Körbelin J, Mol Ther. 2016)にAAVの臓器指向性特定部位(カプシドタンパクの4番目のループ部)にマウス肺血管内皮特異的配列(ESGHGYF)を挿入したAAVを作製する。眼窩静脈より作製したAAVを全身投与し、肺血管内皮細胞にCtBP1を過剰発現したマウスを作製する。肺高血圧モデルは血管内皮増殖因子(VEGF)阻害薬(20mg/kgのSugen5416)を投与し低酸素チャンバー内(酸素濃度10%)で3週間飼育して作製する(Vitali SH, Pulm Circ. 2014)。右室圧の測定(ミラーカテーテル)・肺動脈や心臓の形態学的変化(HE染色、ピクルスレッド染色等)を比較検討する。

4. 研究成果

(1) アデノ随伴ウイルス(AAV)の作製方法と精製方法の改良

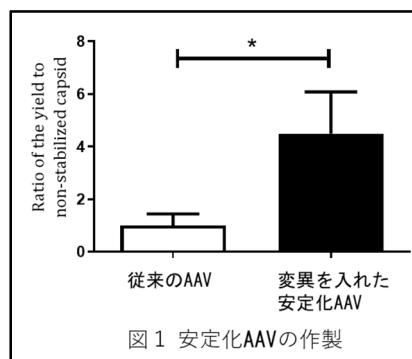
これまでの報告に基づき、マウス肺血管内皮特異的AAVをHEK293T細胞を用いて作製し、動物実験で使用する一般的な精製方法である超遠心機を用いたイオジキサノール濃度勾配遠心分離法で精製を行った。しかし特異的変異を行ったAAVは通常のAAVと比較して収量が少なく、動物実験をするうえで十分な量を得ることができなかった。そこでまず肺血管内皮特異的AAVの作製方法と精製方法の改良を行った。

安定化AAVの作製

細胞内のAAV粒子はユビキチン-プロテアソーム経路で分解されると考えられており、カプシドの特定のセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化がこの経路での分解に関与している。これらの表面に露出したアミノ酸を変異させることで、AAVが安定化しトランスダクション効率が効果的に向上することがいくつかの論文で報告されている。AAVはHEK293T細胞を用いて細胞内で生産されるため、一部は産生時に同様の経路で分解される可能性がある。そこで、これらの部位を別のアミノ酸に変異させることでAAV産生時の分解を抑制し、結果として産生量を増加させる可能性があると考えた。T491VとY730Fに変異を入れたものを安定化AAVとし、安定化変異の収量と非安定化(変異なし)カプシドの収量を比較した。これらの安定化変異は、非安定化肺血管内皮特異的AAVに比べ、収量が4.5倍増加することが判明した(図1)。

HEK293T細胞培養条件の最適化

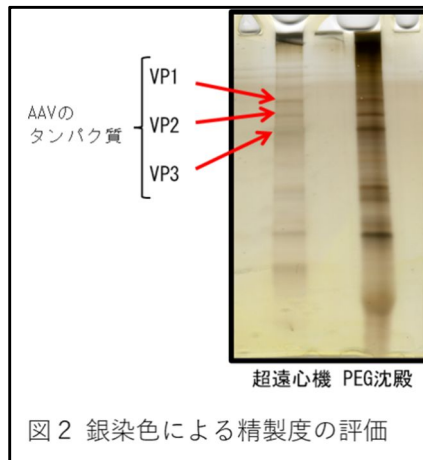
次に、培養条件や精製方法を最適化することで、ウイル



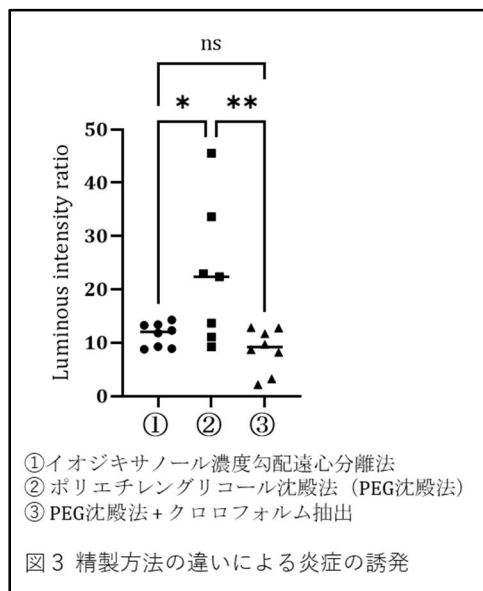
スの収量を増やすことを試みた。比較検討を行い、Reduced Serum Mediumを用いて培地内の糖濃度およびアルカリ性の環境 (pH=7.8) を維持することで収量が増加することがわかった。

AAV 精製方法の改良

AAV の一般的な精製方法である遠心機を用いたイオジキサノール濃度勾配遠心分離法は煩雑であることに加えて、精製の過程で失う AAV の量が多いことが判明した。さらに特異的変異を入れた AAV はオリジナルの AAV と比較して HEK293T 細胞外に多くが分泌されることが分かった。そこで細胞及び培養液の両方からの AAV をポリエチレングリコールによって沈殿 (PEG 沈殿) させ、通常の遠心機を用いて精製した。蛍光タンパクである mVenus を発現させたところ、むしろ PEG 沈殿で精製した AAV によるタンパク発現の方が強かった。しかしながら AAV の精製度を銀染色で確認したところ、イオジキサノール濃度勾配遠心分離法による精製した AAV と比較し、不純物が多かった (図 2)。



AAV は、元来その穏やかな炎症プロファイルにより、in vivo 遺伝子導入ベクターとして広く受け入れられている。しかしながら精製時の不純物には産生細胞の一部が混在していると考えられ、それらがマウスに投与した時に炎症をひき起こす可能性がある。すなわち本法での精製法は導入する目的タンパクの種類によらず炎症を引き起こし、動物実験の解釈に影響を与える可能性がある。NF- κ B の転写活性は、炎症において上昇することが知られている。そこで、ホタルルシフェラーゼの発現を駆動する NF- κ B 転写応答性エレメント (NTRE) に基づくレポーター遺伝子アッセイ系を設計した。肺血管内皮細胞をターゲットとした NF- κ B 検出用の AAV を作成しマウスに投与し、炎症を発光度により定量的に評価した。発光の程度は、イオジキサノール濃度勾配遠心分離法で精製した場合より PEG 沈殿法で精製した場合の方が高いことから、精製の程度が不十分であり、PEG 沈殿法で精製した AAV で炎症が誘発されたことが示唆された。そこでさらに精製度を上げるべく PEG 沈殿法にクロロフォルム抽出の工程を追加し同様の検討を行った。そうすることで NF- κ B レポーター遺伝子アッセイにより検出される炎症の程度は、超遠心分離工程を含む精製方法と同程度に改善された (図 3)。最終的に 150 mm の培養皿の HEK293T 細胞から $1.50 \times 10^{13} \pm 3.58 \times 10^{12}$ (mean \pm SEM, n=9~10) 個のマウス肺血管内皮細胞特異的な AAV を得ることができ、1 回の作製で 15 匹程度のマウスに投与できるようになった。また PAH の研究はラットで行うことが多いが、得られる量は 1 匹のラットに十分な量であった。この成果は FASEB J. 2022 Dec; 36(12): e22653. に掲載された。



(2) 肺動脈性肺高血圧症マウスの研究

C 末端結合タンパク 1 (CtBP1) を肺血管内皮細胞に発現させたマウスとコントロールマウスを用意した。10% 低酸素環境で 3 週間飼育し、肺高血圧症モデルを作製した。低酸素負荷直後の評価では、CtBP1 を肺血管内皮細胞に過剰発現させたマウスの肺動脈収縮期圧が有意に高く、肺動脈の血管壁の肥厚を認めた (図 4)。しかしながら 10% 低酸素環境から通常環境に戻して 10 週経過すると、肺動脈収縮期圧は負荷をかけていない通常のマウスレベルまで戻ってしまった。進行性に病状が悪化するヒトの PAH とはメカニズムが異なる可能性が考えられた。

(3) 今後の展望

これまでの報告においてもマウスでは、PAH の病態が可逆的であることが知られており、PAH の動物実験ではラットを用いることが多い。本研究課題では当初十分な

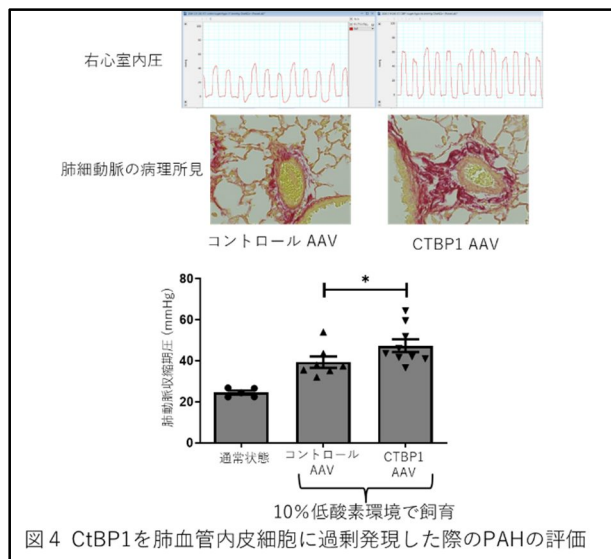


図 4 CtBP1 を肺血管内皮細胞に過剰発現した際の PAH の評価

の AAV を得ることができなかつたことと、ラットの肺血管内皮特異的 AAV は知られていなかったため、マウスを対象として検討を行った。本研究課題において、マウスの肺血管内皮の遺伝子組み換えを行えるプラットフォームは完成できたため、今後重要な因子の発見からマウス PAH モデルの開発につながる可能性がある。

さらに AAV の臓器指向性配列を変化させ、ラット肺血管内皮細胞特異的な AAV を開発することができた。本研究で開発した AAV の産生・精製方法ではラットに対しても十分量の AAV を得ることができるため、今後ラットにおいても PAH のメカニズムの解明を目指していきたい。

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 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shiraishi Yasunaga, Ishigami Norio, Kujiraoka Takehiko, Sato Atsushi, Fujita Masanori, Ido Yasuo, Adachi Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Deletion of Superoxide Dismutase 1 Blunted Inflammatory Aortic Remodeling in Hypertensive Mice under Angiotensin II Infusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 471 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10030471	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 Teratani Toshiaki, Tomita Kengo, Toma-Fukai Sachiko, Nakamura Yutaro, Itoh Toshimasa, Shimizu Hikaru, Shiraishi Yasunaga, Sugihara Nao, Higashiyama Masaaki, Shimizu Takahiko, Inoue Ikuo, Takenaka Yasuhiro, Hokari Ryota, Adachi Takeshi, Shimizu Toshiyuki, Miura Soichiro, Kanai Takanori	4. 巻 156
2. 論文標題 Redox-dependent PPAR /Tnpo1 complex formation enhances PPAR nuclear localization and signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 45 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.005	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 Sato Atsushi, Shiraishi Yasunaga, Kimura Toyokazu, Osaki Ayumu, Kagami Kazuki, Ido Yasuo, Adachi Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Resistance to Obesity in SOD1 Deficient Mice with a High-Fat/High-Sucrose Diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11071403	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 Su Hang, Mei Yu, Luo Shuangxue, Wu Haixia, He Yan, Shiraishi Yasunaga, Hu Pingping, Cohen Richard A., Tong Xiaoyong	4. 巻 179
2. 論文標題 Substitution of the SERCA2 Cys ⁶⁷⁴ reactive thiol accelerates atherosclerosis by inducing endoplasmic reticulum stress and inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 4778 ~ 4791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.15912	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 該当する

1. 著者名 Kujiraoka Takehiko, Kagami Kazuki, Kimura Toyokazu, Ishinoda Yuki, Shiraishi Yasunaga, Ido Yasuo, Endo Shogo, Satoh Yasushi, Adachi Takeshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Metabolic Remodeling with Hepatosteatosis Induced Vascular Oxidative Stress in Hepatic ERK2 Deficiency Mice with High Fat Diets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8521 ~ 8521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158521	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 Shiraishi Yasunaga, Adachi Takeshi, Cacicedo Jose M., Ido Yasuo	4. 巻 36
2. 論文標題 Development of a high yield, high quality purification process for adeno associated virus vectors that can be used in vivo without ultracentrifugation: Application to a lung endothelial cell targeted adeno associated virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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) 10.1096/fj.202200840RR	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 該当する

1. 著者名 Arai-Nakaya Yuko, Shiraishi Yasunaga, Osaki Ayumu, Miyazaki Koji, Adachi Takeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Vascular Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Suppressed Perivascular Adipose Tissue-Induced Relaxation in Spontaneous Hypertensive Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vascular Failure	6. 最初と最後の頁 8 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.30548/vascfail.6.1_8	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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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