

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17227

研究課題名(和文)肺高血圧症の血管炎症におけるMyI9を介したCD69陽性細胞進展機構の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of MyI9-mediated CD69-positive cell progression in vascular inflammation of pulmonary hypertension.

研究代表者

栗山 祥子 (Kuriyama, Sachiko)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30773626

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)：申請者は、肺動脈性肺高血圧症(PAH)の慢性血管炎症における、CD69の機能リガンドであるミオシン軽鎖(MyI9)の関与に着目した。MyI9分子は炎症反応に伴って血小板から放出され、血管内で網目構造を形成し、CD69を発現した炎症細胞を組織内に誘導する因子として働くと考えられている。本研究では、PAHモデル動物の肺血管内皮障害部位および微小血栓形成部位において、MyI9網目構造が正常群と比して有意に形成されていることを証明した。肺微小血管内皮細胞の慢性低酸素曝露刺激にて、MyI9/12発現が増強した。以上より、MyI9が肺高血圧症の病態形成に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は致死的な難治性疾患であり、その詳細な病態が解明されていない難病である。治療薬は血管拡張薬が主体であり、主病態である血管内腔の閉塞の改善を標的とした治療法はない。今回申請者は、PAHの特徴的な求心性内膜増殖病変を有する動物モデルにおいて、血管内皮障害部位および微小血栓形成部位において、活性化CD4陽性T細胞に発現するCD69の機能リガンドであるミオシン軽鎖(MyI9)がPAHの病態進展に関与することを新たに明らかにした。この検証により、PAHの主病態の形成にアプローチする新たな機構が示され、今後、新規の治療標的となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The applicant focused on the involvement of myosin light chain (MyI9), the functional ligand of CD69, in the chronic vascular inflammation of pulmonary arterial hypertension (PAH). This is thought to act as a factor that induces CD69-expressing inflammatory cells to enter the tissue. In this study, we demonstrated that MyI9 reticular structures were significantly formed at sites of pulmonary vascular endothelial injury and microthrombus formation in PAH model animals compared to the normal group. MyI9/12 expression was enhanced by chronic hypoxic exposure of pulmonary microvascular endothelial cells. These results suggest that MyI9 is involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension.

研究分野：呼吸器内科学分野

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 肺血管内皮細胞 低酸素曝露 CD69 血管炎症 肺微小血管内皮細胞 微小血栓 MyI9

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

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、治療抵抗例には肺移植も必要となる難治性疾患である。慢性ウイルス感染症や膠原病に高率に合併することから、「血管の慢性炎症」が病態進展に関与することが知られているが、詳細な機構については未だ明らかでない。本研究では、PAHの血管炎症における活性化CD4陽性T細胞に発現するCD69と、その機能リガンドであるミオシン軽鎖(MyI9)の関与に着目した。MyI9分子は炎症反応に伴って血小板から放出される因子であり、血管内でMyI9網目構造を形成し、CD69を発現した炎症細胞を組織内に誘導する因子として働くと考えられている。申請者は、PAHの微小血栓や血管内皮細胞障害の部位において、CD69陽性の活性化CD4陽性T細胞が、血小板から形成されるMyI9網目構造をプラットフォームとして血管内から炎症組織へ移行し、PAHの血管炎症とリモデリングの原因となると仮説を立てた。

2. 研究の目的

PAHにおける血管炎症の病態にMyI9がどのように関与しているかを解明し、新規治療標的としての可能性を検証することを目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

in vivoの検証

VEGF受容体阻害薬(SU5416)と3週間の慢性低酸素曝露によって作成した、PAHの特徴的な求心性内膜増殖病変を有するSugen5416+低酸素曝露モデル(SuHxモデルマウス)を用い、MyI9の関与について、血行動態の測定と右心不全の重症度、組織学的評価、MyI9の発現について、それぞれ経時的に定量評価した。血行動態は右心カテーテル検査で測定し、右心不全の重症度については右室/左室+中隔の重量比で評価した。

組織学的評価としては、肺組織のHE染色、EVG染色を行い、肺血管の筋性化、内腔の狭窄の程度を定量的に測定した。また、MyI9、 α -SMAの多重免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡および超高解像度顕微鏡によってMyI9網目構造の形成を評価し、血管の筋性化についても更なる検討を行った。

また、MyI9の定量的評価として、フローサイトメトリー法を用い、MyI9のmRNAと蛋白の発現量をqPCR法、ウエスタンブロット法で評価した。

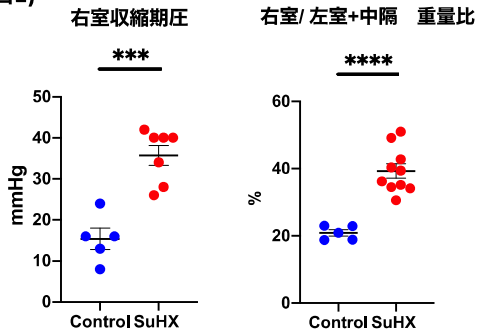
in vitroの検証

肺微小血管内皮細胞を用い、1%低酸素環境に48時間曝露させ、慢性低酸素環境でのMyI9のmRNAと蛋白の発現量に対する影響をqPCR法、ウエスタンブロット法で評価した。

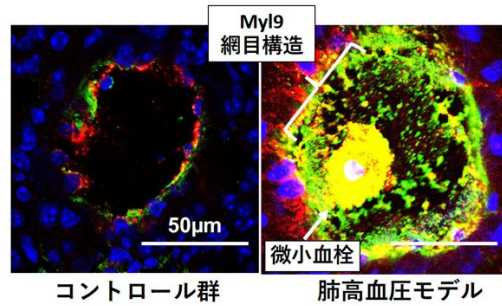
4. 研究成果

*in vivo*の検証では、まず作成したSuHxモデルマウスの検討を行なった。コントロール群と比較して、SuHxマウスの右室収縮期圧は優位および右心不全の重症度は有意に上昇しており、PAHの病態を再現していると考えられた(図1)。組織学的評価として、炎症細胞浸潤は明らかではないものの、SuHxモデルの内皮障害部位および微小血栓形成部位において、MyI9網目構造が正常群と比して有意に形成されていることを証明した(図2)。また、SuHxモデル肺のCD31+/CD45-細胞において、MyI9の発現が正常群と比較して有意に増強していることが確認された。また、SuHxモデル肺のCD31+/CD45-細胞において、MyI9の発現が正常群と比較して有意に増強していることが確認された(図3)。

(図1)

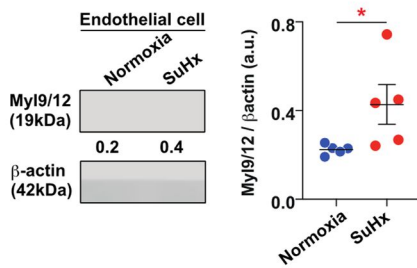


(図2) 肺高血圧モデルの肺血管内で Myl9が特殊な網目構造を形成している

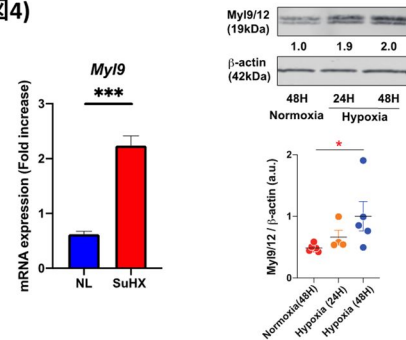


*in vitro*の検証では、ヒト肺微小血管内皮細胞の慢性低酸素曝露刺激にて、Myl9/12 発現が有意に増強していることを qPCR、ウエスタンブロット法で確認した(図4)

(図3)



(図4)



まとめ、今後の実験計画

今回の実験で、SuHx モデルの病的肺血管の血管内に Myl9 網目構造が形成されていること、また Myl9 は低酸素刺激で発現が増強することが確認された。

より詳細なメカニズムを検証するために、Myl9 の網目構造の形成が肺高血圧症の病態に果たす役割についてさらなる検討を進める。さらに Myl9 が肺高血圧症の治療標的になりうるか、抗 Myl9 抗体を投与し、治療効果を確認する予定である。また、肺微小血管内皮細胞の内皮間葉転換を誘導し、Myl9 の挙動について検討する予定である。加えて、ヒト PAH の保存血清を用い、後方視的解析を行い、Myl9 値が肺高血圧症の病態のバイオマーカーになりうるかについても検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------