

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790982

研究課題名（和文）

肺高血圧における神経堤由来細胞の関与とエンドセリン受容体拮抗薬の新しい作用機序

研究課題名（英文） Role of neural crest-derived cells in the pathogenesis of pulmonary hypertension and new mechanisms of an endothelin receptor antagonist.

研究代表者

大橋 啓之 (Hiroyuki Ohashi)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70397511

研究成果の概要（和文）：

神経堤由来細胞を P0-Cre を用いて追跡可能である慢性低酸素暴露肺高血圧マウスモデルにおいて、肺動脈圧の上昇、右室肥大、末梢肺動脈の筋性化などの肺動脈性肺高血圧の所見が示された。肺血管病変構成細胞の一部に神経堤由来細胞が関与する事が免疫組織学的に示された。エンドセリン受容体拮抗薬が、慢性低酸素暴露肺高血圧モデルにおいて、肺動脈圧の上昇、右室肥大、末梢肺動脈の筋性化などの肺動脈性肺高血圧の抑制作用を有することが示された。薬剤効果と神経堤由来細胞の動態は現在の課題である。

研究成果の概要（英文）：

P0-Cre mice, in which P0-Cre positive neural crest-derived cells can be traced in vivo, were exposed to chronic hypobaric hypoxia for 3 weeks. In this model, we could demonstrated the typical findings consistent with pulmonary arterial hypertension, including increased pulmonary artery pressure, right ventricular hypertrophy, and muscularization of small perioheral pulmonary arteries. In this model, we could demonstrated immunohistochemically that some pulmonary vascular cells are neural crest-derived. In this model, we could show that an endothelin receptor antagonist ameliorated pulmonary artery pressure, right ventricular hypertrophy, and muscularization of small pulmonary arteries. We are currently investigating the kinetics of neural crest-derived cells in pulmonary vessels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児循環器

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺高血圧、エンドセリン、作用機序、マウス、低酸素暴露、血管病変、炎症、
内皮機能障害

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧は、原発性ないし先天性心疾患、膠原病などに関連して二次性に発症する難治性疾患で、新たな治療法開発には更なる病態解明が重要である。そこで、幾つ

かの理由から、肺高血圧性血管病変形成における神経堤由来細胞の役割を解明し、肺高血圧治療薬であるエンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンの肺血管病変における神経堤由来細胞動態への影響を検討する事が本研究

の全体構想である。

肺高血圧性血管病変において、内皮細胞のアポトーシス、機能障害、血管新生、マクロファージの浸潤、平滑筋細胞の増殖、収縮性亢進、壁細胞の分化増殖、外膜における線維芽細胞増殖の関与が報告されてきた。我々のグループは、内皮機能低下、その下流の cGMP、血管収縮亢進、プロテアーゼ、平滑筋のフェノタイプ変化の肺高血圧への関与を動物モデル (Mitani Y. *Circulation* 1997, Mitani Y. *FASEB J* 2000, Mitani Y. *Eur Respir J.* 2000, Mitani Y. *J Appl Physiol* 2002, Sawada H, Mitani Y. *Chest* 2007, Mitani Y. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008)、患者検体 (Mitani Y. *Thorax* 1999, Mitani Y. *Eur Respir J* 2001) を用いて報告してきた。最近、生後に血管が形成される過程 (neovascularization) において、既存の血管からの芽出する血管新生 (angiogenesis) のみならず、胎児期のみ現象と信じられていた流血中の内皮前駆細胞細胞などによる脈管形成 (vasculogenesis) も関与する事が知られる。そこで我々は、肺高血圧における骨髄幹細胞動態に着目し、蛍光色素 eGFP を発色する遺伝子改変マウス由来骨髄を移植した慢性低酸素暴露肺高血圧マウスにおいて、骨髄由来非血球系幹細胞が肺血管内皮細胞に、骨髄由来血球系幹細胞が血管周囲のマクロファージに分化する事を認めた。さらに、エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンが、骨髄由来内皮前駆細胞の取り込みを促進し、骨髄由来マクロファージの浸潤を抑制する事を認めてきた (日本小児循環器学会 2008、American Heart Association 2008)。しかし、体血管疾患で確認されている骨髄由来平滑筋細胞は認められず、血管平滑筋、壁細胞の由来における体循環と肺循環の違いが推測された。

従来から神経堤細胞は心臓流出路、大動脈

弓、中心肺動脈、房室弁形成など心血管発生に重要な細胞として広く知られる。最近、平滑筋、周細胞、心筋幹細胞、神経、心臓弁間質細胞が神経堤由来細胞である場合が報告され、神経堤細胞の生後の幹細胞としての役割が注目される。一方、従来から肺動脈の発生においては、①中心肺動脈から芽出する angiogenesis の機序で末梢に進展する事、②肺末梢において、血管系前駆細胞が集合、融合する vasculogenesis の機序で末梢肺動脈を形成する事、③両者の肺動脈が融合するという過程を経ることが報告されてきている (Susan KS et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22: 157-165, 2000)。しかし、神経堤由来細胞が、末梢肺血管周囲の周細胞に分化するか否か、周細胞から遊走、分化して形成されると報告される末梢肺血管の筋性化など肺高血圧性血管病変へ関与するか否かはこれまで報告されていない。また、神経堤細胞において、エンドセリン A, B 受容体が発現する事、エンドセリンが神経堤細胞の遊走、分化に関わる事、エンドセリン A 受容体欠損マウスでは、神経堤由来細胞が形態形成に関わる大動脈弓、心臓流出路、房室弁、肺動脈の奇形を来す事が知られ、エンドセリンは神経堤細胞に関わる病態に重要な役割を果たす。しかし、エンドセリン拮抗薬ボセンタンが、神経堤由来細胞の肺血管病変への関与を調節するか否かは明らかではない。

最近、我々は神経堤由来細胞を特異的に追跡できる遺伝子改変マウス P0-Cre/Rosa26R (神経堤細胞特異的にレポーター遺伝子 LacZ が発現) を用いて慢性低酸素暴露肺高血圧モデルを作成した。また、前述の骨髄移植慢性低酸素暴露肺高血圧マウスにおいて、エンドセリンは壁細胞の遊走、分化によりなるとされる末梢肺血管の筋性化を抑制する事を証明している (日本小児循環器学会総会

2008) (Kato T, Mitani Y et al. American heart Association 2008)。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、神経堤由来細胞の分化を追跡できる P0-Cre/LacZ マウスを用いてマウス肺高血圧モデルを用い、神経堤由来細胞が肺血管病変にどのように関与するかを、LacZ 染色および多重蛍光染色を用いた共焦点レーザー顕微鏡による解析で明らかにする事、さらにボセンタンの肺高血圧性血管病変における神経堤由来細胞動態への影響を検討する事である。

3. 研究の方法

研究体制は、代表研究者が直接実験を行うに際して、それぞれの分野の研究協力者の援助ないし話し合いの下でなされる状況を確認する。すなわち、P0-Cre/Rosa26R マウスの作成とその評価は、同施設小児科の三谷義英博士、肺高血圧モデルの作成、血行動態肺血管病変の評価は、同施設麻酔科の丸山一男博士、共焦点顕微鏡による解析は、同小児科リサーチアソシエートの加藤太一博士の協力を得、代表研究者が実験を施行し統括する。

平成 21 年度

1 P0-Cre/Rosa26R マウス (神経堤由来細胞が特異的に発現するマウス) の作成

神経堤細胞に特異的に発現する protein 0(P0) promoter 下に Cre を付けた遺伝子を発現するマウスと LoxP-LacZ を発現するマウスを掛け合わせにより作製し、そのマウスでは P0 を発現する神経堤細胞がレポーター遺伝子 LacZ 発現細胞として追跡できる。これを用いて、心臓、胸部大動脈、胸腺、下顎骨、胸腺、中心肺動脈と肺の周細胞、肺血管病変で発現する事を確認している。このマウスは

共同研究者の熊本大学教授山村研一博士から既に提供されており、遺伝子型の確認は、既報の従い PCR 法により行う。(三谷義英博士の協力)

2 慢性低酸素マウス肺高血圧における肺高血圧の作成と病変の評価

生後 7 週から 0.5 気圧の低気圧チャンバー (当研究室備品) で 21 日間飼育し、マウスを評価後に屠殺する。肺高血圧と肺血管病変の評価は、直接右室の穿刺により右室圧測定、屠殺後の右室/左室重量比測定を行い、肺血管病変の評価として、本来血管平滑筋を持たない肺泡や肺胞管レベルの末梢肺動脈での血管平滑筋を持つ血管の割合 (末梢血管での筋性血管出現率) で求める。(Mitani Y, Maruyama K et al. Circulation 1997;96(2):689-97) (Zaidi SH, Rabinovitch M et al. Circulation. 2002;105(4):516-21) (Mitani Y, Rabinovitch M. J Appl Physiol. 2002;93(5):1770-8) (Jiang B, Mitani Y, Maruyama K. Chest. 2004;125(6):2247-52) (Jiang BH, Mitani Y, Maruyama K. Lung. 2007;185(5):303-8.) (Sawada H, Mitani Y, Maruyama K et al. Chest 2007;132(4):1265-1274) (Mitani Y, Maruyama K et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2008;136(1):142-9.) (Kato T, Mitani Y et al, American Heart Association 2008) (丸山一男博士の協力)

3 神経堤由来細胞の肺血管での分布と肺血管構成細胞、血管周囲神経への分化の評価

神経堤細胞特異的な P0 発現が LacZ 染色により評価できることから、組織染色による評価を行う。組織染色では、肺組織断片を 2%パラフォルムアルデヒドないし 0.2%グルトアルデヒドを含む PBS で固定し、Bluo-Gal (GIBCO-BRL) を含む溶液で染色する。また多

重染色には、抗 LacZ 抗体による免疫染色を行い、血管内皮細胞は抗 CD31 抗体、血管平滑筋は抗 α -アクチン抗体、線維芽細胞は抗ビメンチン抗体(ビメンチン陽性、CD31 陰性)、周細胞は抗 NG 2 抗体を用いて染色し、当科備品の焦点レーザー顕微鏡(Fluoview FV1000, Olympus)により評価する。また神経堤由来細胞が血管周囲神経に分化し、血管収縮特性に関わる可能性も考慮して神経系も評価し、Neurofilament M、synapsin 1 をマーカーとして用いるほかに、血管拡張をもたらす神経細胞で陽性になるとされる CGRP および、血管収縮をもたらす神経細胞で陽性になるとされる NPY でも染色する。

肺血管病変部位において神経堤由来細胞がどの細胞に分化してどの程度関与しているかを、各細胞系列のマーカーで陽性となった細胞のうちの、抗 LacZ 抗体陽性率を算出した上で、コントロール群における正常肺血管での値と比較することにより、定量的に評価する。この評価法は骨髄由来細胞の病変部位への関与を定量評価する際にこれまで用いてきた方法である (Kato T, Mitani Y, et al. American heart association 2008)。(加藤太一博士の協力)

平成 22 年度

4 P0-Cre/Rosa26R 慢性低酸素暴露肺高血圧マウスにおけるボセンタンの効果の検討

低酸素暴露の有無、ボセンタン (Actelion) (bosentan sodium salt 30mg/kg/day, days 0-21 連日腹腔内投与)ないし生食連日投与の 4 群で評価した。低酸素暴露肺高血圧マウスにおいて、本研究と同量の bosentan sodium salt が肺高血圧を改善することをすでに報告し (2008 年日本小児循環器学会)、現在論文作成中である。21 日間の飼育後、上記の方法で、右室圧測定、右室

/左室+心室中隔重量比の測定、肺血管病変の評価を行う。(三谷義英博士、丸山一男博士の協力)

5 ボセンタンの効果と神経堤由来細胞動態の検討

上記の 4 群のマウスにおいて、平成 21 年度と同様に、組織固定後 LacZ 染色を行い、切片を作成して組織を観察する。同様に神経堤由来細胞がどのような細胞系列に分化して病変に関与しているかを蛍光抗体を用いた多重免疫染色を行った上で、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、肺血管病変部位における神経堤由来細胞の関与を平成 21 年度に記載した方法と同様の定量評価を行う。さらに平滑筋などの apoptosis (TUNEL 法、アネキシン V 染色、活性化 caspase3 染色) との関係も免疫染色により検討する。仮にボセンタン投与が神経堤由来細胞動態に有意な影響を及ぼさない場合は、神経堤由来細胞の免疫染色を主体として研究を総括する。(加藤太一博士の協力)

4. 研究成果

① 神経堤由来細胞の分化を追跡できる P0-Cre/LacZ マウスを作成し、慢性低酸素暴露肺高血圧モデルを作成した。神経堤由来細胞が肺血管病変にどのように関与するかこの検討の為に、多重蛍光染色を用いた共焦点レーザー顕微鏡による解析を行った。

本肺高血圧モデルにおいて、右室圧上昇、右室肥大、末梢肺血管の筋性化を確認した。多重染色には、抗 LacZ 抗体、血管内皮細胞は抗 CD31 抗体、血管平滑筋は抗 α -アクチン抗体、線維芽細胞は抗ビメンチン抗体(ビメンチン陽性、CD31 陰性)、周細胞は抗 NG 2 抗体を用いて染色した。また神経系細胞のマーカー Neurofilament M、synapsin 1、血管拡張性神経細胞のマーカー CGRP、血管収

縮性神経細胞のマーカーであるNPY発現を検討した。LaxZは一部の末梢平滑筋細胞に発現し、神経系細胞にも発現を認めた。

②P0-Cre/LacZマウスを用いた低酸素暴露肺高血圧マウスへのエンドセリン受容体拮抗薬の効果

0.5 気圧の慢性低酸素暴露3週間で肺動脈圧の上昇、右室肥大、末梢肺動脈の筋性を認めた。ボセンタンの連日腹腔内投与を行い、肺動脈圧低下、右室肥大改善、末梢肺動脈の筋性化指標の低下を認めた。現在、多重染色により、神経堤由来細胞肺血管病変への関与へのボセンタンの効果を検討中である。上記を集計し、現在投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件、内 査読 4 件)

1 Mitani Y, Ohashi H, Takabayashi S, Shimpo H, Komada Y.

Acute effect of sildenafil on hypoxemic patients (excluding those with Eisenmenger syndrome) with incurable congenital heart disease and disturbed pulmonary vasculature in the mid-term follow-up

Int J Cardiol. 2011 Jan 21;146(2):273-4.

2 Yonekawa T, Mitani Y, Ohashi H.

Three-dimensional echocardiographic imaging of a giant eustachian valve in an infant with reversed cyanosis.

Pediatr Cardiol. 2010 Oct;31(7):1114-5.

3 Sugino N, Mitani Y, Ohashi H, Hayakawa H, Hosoki K, Takabayashi S, Shimpo H, Komada Y.

Dynamic right ventricular outflow tract obstruction due to a swinging echolucent

cyst on interventricular septum in a 4-year-old girl.

Circulation 2010 Mar;121(12):e250-e251

4 Mitani Y, Ohashi H, Sawada H, Ikeyama Y, Hayakawa H, Takabayashi S, Maruyama K, Shimpo H, Komada Y.

In Vivo Plaque Composition and Morphology in Coronary Artery Lesions in The Adolescents and Young Adults Long After Kawasaki Disease: A Virtual

Histology-Intravascular Ultrasound Study
Circulation. 2009 Jun 2;119(21):2829-36.

[学会発表] (計 4 件)

1 Impact Of Public-Access Defibrillation At School On The Outcome After Out-Of-Hospital Cardiac Arrest Of Cardiac Origin In Elementary And Middle School Students: A Japanese Nationwide Survey
Mitani Y, Ohta K, Ichida F, Nii M, Arakaki Y, Ushinohama H, Ohashi H, Yodoya N, Tateno S, Sato S, Suzuki T, Higaki T, Iwamoto M, Yoshinaga M, Sumitomo N.

American Heart Association, Chicago, 2010. 11. 16

2 Detection of coronary intimal lesions by multi-detector CT in young adults long after Kawasaki disease: Comparison with virtual histology-intravascular ultrasound

Ohashi H, Mitani Y,

The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society, Urayasu, Japan, July 2010. 7. 7

3 Bosentan promotes incorporation of

bone marrow-derived endothelial cells but inhibits infiltration of macrophages into pulmonary vascular lesions in mice exposed to chronic hypoxia: A novel concept of bosentan therapy in pulmonary hypertension

Kato T, Sawada H, Maruyama J, Ikeyama Y, Ohashi H, Masuya M, Miyata E, Nakamura S, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. American Heart Association, Orland, 2009.11.17

4 In Vivo Plaque Composition and Morphology in Coronary Artery Lesions in The Adolescents and Young Adults Long After Kawasaki Disease: A Virtual Histology-Intravascular Ultrasound Study
Mitani M, Ohashi H, Sawada H, Ikeyama Y, Hayakawa H, Komada Y.

The 5th world congress of pediatric cardiology and cardiac surgery, Cairns, Australia 2009.6.24

(1)研究代表者

大橋 啓之 (Hiroyuki Ohashi)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 70397511

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :