

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07817

研究課題名(和文) 実験的肺高血圧における周産期侵襲によるエピゲノム変化を介した分子病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epigenome-mediated mechanisms involved in experimental pulmonary hypertension induced by perinatal insult

研究代表者

三谷 義英 (Mitani, Yoshihide)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60273380

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(PAH)は、特発性、遺伝性(BMPR2)ないし二次性(炎症等)に発症する原因不明の難治性疾患である。そこで、(1)周産期低酸素のラットPAHの増悪効果と肺血管平滑筋の細胞特性とDNAメチル化の評価、(2)BMPR2欠損、MCP1受容体(CCR2)欠損のラットPAH増悪・改善効果を検討した。周産期低酸素は、ラットPAHを増悪し、肺動脈平滑筋は、DNAメチレーションに関連して、増殖性、炎症性を示した。BMPR2欠損、CCR2欠損は、各々PAHを増悪・改善し、増殖性、炎症性を増悪・抑制した。本研究は、実験的肺高血圧の病態への炎症を解する機序の関与を示し、治療応用が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAHは、特発性、遺伝性ないし種々の刺激に対して2次的に発症する小肺動脈の閉塞性病変を伴う原因不明の難治性疾患で、予後の改善、予防には病態解明が重要である。本研究により、周産期侵襲(周産期酸素)ないしCCR2を解する炎症が肺高血圧の病態に関与することが明らかとなった。本研究は、新生児医療の進歩による成人移行例の増加、周産期の介入の個別化予防の可能性、ヒトの生涯の中でエピゲノム変化の受攻期としての周産期の3点から重要であり、さらに炎症の関与を示した。肺循環に於けるDOHaD(Developmental Origin of Health and Disease)(Barker)仮説の検証となる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an intractable disease of unknown etiology that occurs in a heritable manner (BMPR2), or in response to any stimuli (inflammation, etc.). We therefore evaluated the exacerbating effects of perinatal hypoxia on rat PAH and the cellular effects and DNA methylation status in pulmonary vascular smooth muscle (PASM). In addition, we investigated the exacerbating and ameliorating effects of BMPR2-disruption or MCP1 receptor (CCR2)-disruption on PAH in rats. Perinatal hypoxia exacerbated rat PAH, and pulmonary arterial smooth muscles in such rats showed hyperproliferative and inflammatory responses associated with DNA methylation. BMPR2 disruption and CCR2-disruption exacerbate or ameliorated PAH in rats and provoked or suppressed proliferation and inflammation in cultured PASCs. This findings demonstrates the involvement of inflammation in the pathogenesis of experimental pulmonary hypertension in rats, which may have therapeutic implications.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧 エピゲノム 周産期侵襲 DOHaD仮説 炎症 動物モデル ゲノム編集 DNAメチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロジェクト1 (出生期の低酸素症が後の生活で SU5416/低酸素処置を受けたラットの閉塞性肺血管病を悪化させる): 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、小さな肺動脈の閉塞性肺血管疾患 (PVD) を特徴とする致命的な疾患である。出生期の影響が後の人生で閉塞性 PVD を悪化させるかどうかはまだわかっていない。

プロジェクト2 (CRISPR を用いた Bmpr2 ポイント変異が実験的肺高血圧症のラットにおける遅発性肺血管病を悪化させ、生存率を減少させる): 骨形成タンパク質受容体タイプ 2 (Bmpr2) 変異を持つ肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 患者は、変異を持たない患者よりも重度の血液力学的妥協を早期に示し、生存率が低い。Bmpr2 変異を伴う PAH の臨床的フェノタイプの悪化メカニズムは、マウスの進行性 PH を再現することの難しさとラットの遺伝子修飾のため、ほとんど解明されていない。

プロジェクト3 (C-C モチーフケモカイン受容体-2 のブロックはラットにおける肺高血圧症を改善し、肺血管拡張薬と相乗作用を示す): C-C モチーフケモカイン受容体 (CCR) 2 の阻害が、ラットにおける肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の発症を緩和し、関連する炎症性状態と血管機能の逆転を促進する可能性があるかどうかは不明である。通常肺血管拡張剤であるリン酸ジエステラーゼ-5 (PDE5) 阻害剤と相乗効果があるかは不明である。

2. 研究の目的

プロジェクト1: 出生期の低酸素症が PVD と生存率を悪化させるという仮説を検証した。

プロジェクト2: Bmpr2 変異が、ラットの単クロタリン (MCT) 誘発性 PH の進行性特徴に影響を与えるかどうかを検討した。

プロジェクト3: CCR2 欠損が、ラット肺高血圧の血行動態、肺血管病変、遺伝子発現への影響と、PDE5 阻害剤の相乗効果を検討した。

3. 研究の方法

プロジェクト1: SU5416 を 7 週齢時に注射し、その後 3 週間低酸素にさらすことにより、ラットに PVD を誘発し (SU5416/低酸素) 血行動態と挿血管病理所見を評価した。周産期低酸素ラット由来培養肺動脈平滑筋の動体を検討した。

プロジェクト2: Bmpr2 のエクソン 1 にモノアレリックな単一塩基挿入 (+/44insG) を CRISPR/Cas9 を用いてラットに導入し、MCT 注入後の PH、肺血管疾患 (PVD) およびリン酸ジエステラーゼ 5 型阻害剤であるタダラフィルの投与後の生存率を評価した。

プロジェクト3: CRISPR/Cas9 によって生成された Ccr2(-/-) ラットを用いて、モノクロタリン (MCT) で処置された Ccr2(+/+) または Ccr2(-/-) ラットにおける肺高血圧症 (PH)、肺血管疾患 (PVD) および生存率を解析した。PDE5 阻害剤であるタダラフィルが Ccr2(-/-) と相乗作用があるかどうかを調査した。

4. 研究成果

プロジェクト1: 7 週齢時の基準ラット (n = 12) と、15 週齢時の 4 つのラット群 (SU5416/低酸素または対照ラット、出生期の低酸素症あり/なし、各々 n = 40) で、生理学および形態学的解析を行った。ラットの出生期の低酸素症の有無にかかわらず、生存率、生理学または病理学的パラメータに影響を与えなかったが、低酸素症は SU5416/低酸素ラットで体重増加と生存率を減少させ、右室収縮圧、右室肥大、および PVD の指標を増加させた。出生期の低酸素症は、ラットの培養された肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) の増殖と炎症を促進し、DNA メチル化と関連していた。我々は、出生期の低酸素症によって引き起こされた、肺動脈性肺高血圧症の初の致命的な動物モデルを確立した。このモデルは、培養された PASMCs の高増殖性、プロ炎症性、およびエピジェネティックな変化と関連しており、閉塞性 PVD の治療と予防に洞察を提供する。

プロジェクト2: +/44insG ラットは、野生型に比べて肺での BMPR2 シグナルが低下していた。MCT 注入後 3 週間の PH および PVD は、野生型と +/44insG ラットで類似していた。しかし、MCT 注入後 4 週間の生存率は +/44insG ラットで有意に低下していた。MCT 投与後 4 週間生存したラットの中で、+/44insG ラットでは右室と左室プラス中隔の重量比 (RV/[LV + S]) および肺動脈 (PA) の中膜壁厚 (%MWT) が増加していた。免疫組織化学分析では、MCT 注入

後 3 週間、+/44insG ラットの肺では Ki67 陽性細胞を含む血管が増加し、PA では成熟した平滑筋細胞表現型マーカーが減少し、未熟なマーカーが増加していた。プロスタグランジン F2 およびエンドセリン-1 に対する PA の収縮が+/44insG ラットで有意に低下していた。タダラフィルを受けた+/44insG ラットは、野生型に比べて RV/(LV + S)、遠位 PA の%MWT、および RV 心筋線維化が有意に増加して生存率が悪化した。本研究は、Bmpr2 変異が PA 平滑筋細胞の分化抑制、遅発性 PVD、および RV 心筋線維化を促進し、MCT-PH の自然および治療後経過に有害な影響を与えることを示しており、遅い段階でのみ有意な効果を有し、遺伝性 PAH の治療結果を最適化するためにこの新しい遺伝子モデルを用いた前臨床研究が必要であることを示唆している。

プロジェクト 3 : MCT 注入後 3 週間のラットでは、Ccr2(-/-)は右室収縮圧 (RVSP)、右室肥大の指標、PVD の指標、および周血管マクロファージ浸潤を減少させた。同様に、MCT 処置されたラットの肺では、Ccr2(-/-)は炎症性サイトカイン/ケモカイン (インターロイキン-6、腫瘍壊死因子- α 、C-C モチーフケモカイン受容体 (CCL) -2、インターロイキン-1 β 、変換成長因子- β) の mRNA 発現の増加、骨形成タンパク質受容体タイプ 2 シグナル伝達の障害、および内皮細胞のアポトーシス増加、一酸化窒素シグナル伝達の低下、および肺内 PDE5 発現の減少を逆転させた。生存率の研究では、Ccr2(-/-)は MCT 処置されたラットの生存率を改善した。Ccr2(-/-)は培養された肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) における CCL2 誘導の増殖と分化を抑制した。全ゲノム RNA シーケンシング解析では、CCL2 刺激を受けた Ccr2(-/-) PASMCs で異なる発現するさまざまな遺伝子が同定された。タダラフィルの投与は、Ccr2(-/-)ラットでは PH および PVD を改善したが、Ccr2(+/+)ラットでは改善しなかった。タダラフィルは、MCT 処置された Ccr2(-/-)ラットの生存率をさらに改善した。本研究の結果は、CCR2 の阻害が PAH の発症を緩和し、異常な炎症経路と血管機能の逆転と相乗作用があることを示した。これらの結果は、CCR2 が特定の CCR2 関連炎症性フェノタイプを有する治療困難な PAH 患者および従来の肺血管拡張剤に対して反応性のある治療標的である可能性があることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kabwe JC, Sawada H, Mitani Y, Oshita H, Tsuboya N, Zhang E, Maruyama J, Miyasaka Y, Ko H, Oya K, Ito H, Yodoya N, Otsuki S, Ohashi H, Okamoto R, Dohi K, Nishimura Y, Mashimo T, Hirayama M, Maruyama K.	4. 巻 23(1)
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 Respir Res	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 Oshita H, Sawada H, Mitani Y, Tsuboya N, Kabwe JC, Maruyama J, Yusuf A, Ito H, Okamoto R, Otsuki S, Yodoya N, Ohashi H, Oya K, Kobayashi Y, Kobayashi I, Dohi K, Nishimura Y, Saitoh S, Maruyama K, Hirayama	4. 巻 323(2)
2. 論文標題 Perinatal hypoxia aggravates occlusive pulmonary vasculopathy in SU5416/hypoxia-treated rats later in life.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	6. 最初と最後の頁 L178, L192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00422.2021	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 Koyama Y, Miura M, Kobayashi T, Hokosaki T, Suganuma E, Numano F, Furuno K, Shiono J, Ebata R, Fuse S, Fukazawa R, Mitani Y	4. 巻 182(2)
2. 論文標題 A registry study of Kawasaki disease patients with coronary artery aneurysms (KIDCAR): a report on a multicenter prospective registry study three years after commencement.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eur J Pediatr	6. 最初と最後の頁 633,640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00431-022-04719-x	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 Kato T, Miura M, Kobayashi T, Kaneko T, Fukushima N, Suda K, Maeda J, Shimoyama S, Shiono J, Hirono K, Ikeda K, Sato S, Numano F, Mitani Y, Waki K, Ayusawa M, Fukazawa R,	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 Analysis of Coronary Arterial Aneurysm Regression in Patients with Kawasaki Disease by Aneurysm Severity: Factors Associated with Regression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 e22417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.121.022417	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 N, Makino H, Mitani Y, Ito M, Ohya K, Morimoto M, Hanaki R, Yodoya N, Ohashi H, Sawada H, Sugiyama K, Hirayama M.	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 Front Pediatr	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 -

1. 著者名 Kabwe JC, Sawada H, Mitani Y, Oshita H, Tsuboya N, Zhang E, Maruyama J, Miyasaka Y, Ko H, Oya K, Ito H, Yodoya N, Otsuki S, Ohashi H, Okamoto R, Dohi K, Nishimura Y, Mashimo T, Hirayama M, Maruyama K.	4. 巻 23(1)
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 Respir Res	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hironori Oshita, Yoshihide Mitani, Hirofumi Sawada, Naoki Tsuboya, Junko Maruyama, Noriko Yodoya, Hiroyuki Ohashi, Kazunobu Oya, Yuhei Nishimura, Shinji Saitoh, Kazuo Maruyama, Masahiro Hirayama
2. 発表標題 Perinatal hypoxia aggravates occlusive pulmonary vasculopathy in rats later in life: association with epigenetic changes.
3. 学会等名 Association for European Pediatric and Congenital Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihide Mitani
2. 発表標題 APSC Guideline for the management of adults with a history of Kawasaki disease. Transition of KD patients with coronary sdequelaes
3. 学会等名 Asian Pacific Society of Cardiology Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三谷義英
2. 発表標題 小児肺循環領域におけるAI応用：胸部X線によるQp/Qsと学校心電図検診によるPHの早期診断へ
3. 学会等名 第7回日本肺高血圧肺循環学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三谷義英
2. 発表標題 小児循環器領域における人工知能の応用：12誘導心電図
3. 学会等名 第58回日本小児循環器学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三谷義英
2. 発表標題 Exploring Novel Therapeutic Strategies toward PAH : Perspectives from Pediatric Cardiology
3. 学会等名 The 5th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 三谷義英	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2151
3. 書名 心疾患をもつ児童・生徒の学校管理下での取り扱い方、今日の治療指針2022年度版	

1. 著者名 三谷義英	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 502
3. 書名 川崎病、循環器疾患、最新の治療2022-2023	

1. 著者名 Yoshihide Mitani, Hirofumi Sawada	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 3
3. 書名 Molecular Mechanism of congenital heart disease and pulmonary hypertension	

1. 著者名 三谷義英	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 3
3. 書名 心室中隔欠損、心房中隔欠損、房室中隔欠損、動脈管開存、Eisenmenger症候群、内科学12版	

〔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)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	澤田 博文 (Sawada Hirofumi) (30362354)	三重大学・医学系研究科・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