

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07852

研究課題名(和文) フォンタン循環における肺動静脈瘻の機序解明

研究課題名(英文) The mechanism of pulmonary arteriovenous fistula in the Fontan circulation

研究代表者

川村 順平 (Kawamura, Junpei)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：70838656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺動静脈瘻を有する Glenn 後患者(G-PAVM患者)で他の患者より2倍以上高いレベルを示した血清miRNAを選択した。miR-25-3pは、Glenn後群の肺動脈血清において、他の2群(無治療のチアノーゼ性心疾患群、フォンタン後群)よりも有意に発現が上昇した。HMVEC-Lにおける*in vitro*の実験で、miR-25-3p mimicをトランスフェクションしたHMVEC-Lでは、PHLPP2の発現が有意に低下し、HIF-1 およびVEGF-Aの発現レベルは、低酸素刺激後、PHLPP2/Akt/mTORシグナル依存的に上昇し、低酸素条件下でHMVEC-Lの血管新生、増殖、遊走を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動静脈瘻(Pulmonary Arteriovenous Malformations: PAVMs)は、低酸素血症を引き起こす致命的な合併症であり、単心室症のGlenn手術後に発生したPAVMs(G-PAVMs)は深刻な問題である。本研究成果で、miR-25-3pがPHLPP2/Akt-mTORシグナルを通じて、血管内皮細胞におけるHIF-1 /VEGF-A発現を亢進させ、G-PAVMsの一因であることを証明した。miR-25-3pを制御することがG-PAVMsの治療へ発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Serum miRNAs that showed more than 2-fold higher levels in post-Glenn patients with pulmonary arteriovenous fistula (G-PAVM patients) than in other patients were selected. miR-25-3p was significantly upregulated in pulmonary artery serum in the post-Glenn group than in the other two groups (untreated cyanotic heart disease group and post-Fontan group). *In vitro* experiments in HMVEC-L transfected with miR-25-3p mimic showed that the expression of PHLPP2 was significantly decreased and the expression levels of HIF-1 and VEGF-A were significantly decreased after hypoxic stimulation in a PHLPP2/Akt/mTOR signaling-dependent manner increased, promoting angiogenesis, proliferation, and migration of HMVEC-L under hypoxic conditions.

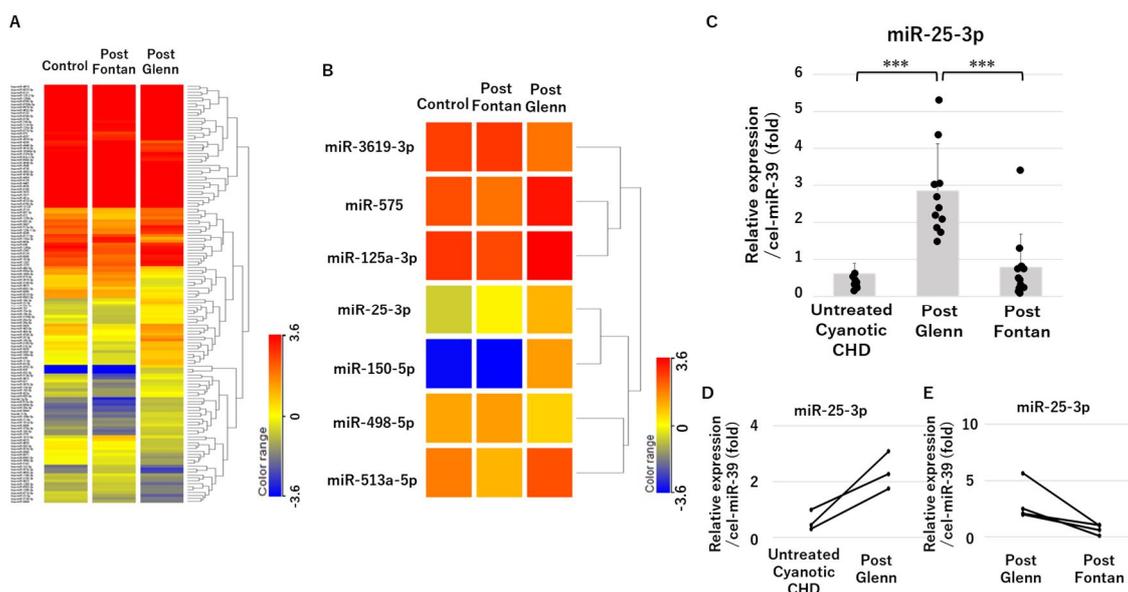
研究分野：小児科学

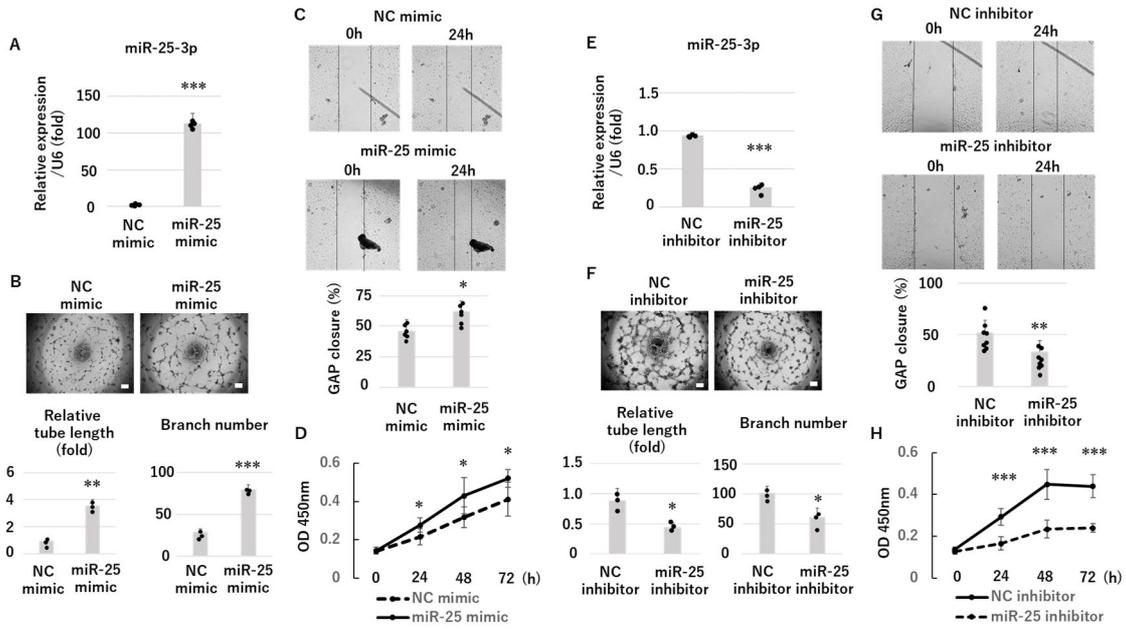
キーワード：肺動静脈瘻

背景: チアノーゼ性先天性心疾患(CHD)におけるグレン手術後の肺動静脈奇形(G-PAVM)の詳細な機序は依然として不明である。

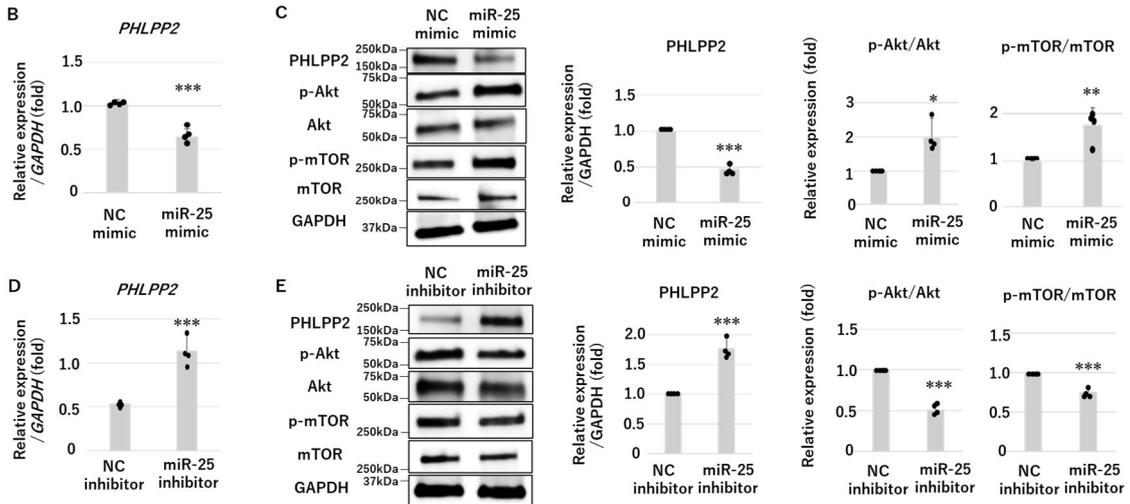
方法: マイクロアレイ in situ ハイブリダイゼーションを行い、G-PAVM を有する小児患者(0~6歳)、その他のチアノーゼ型CHD、およびG-PAVM を有さないフォンタン術後の血清のmiRNA(マイクロRNA)プロファイルを評価した。さらに、miR-25-3p mimic、miR-25-3p inhibitor、またはPHLPP2 siRNA をトランスフェクトしたヒト肺微小血管内皮細胞(HMVEC-L)のチューブ形成、遊走、増殖を調べ、低酸素刺激後のHIF-1 α /VEGF-A シグナル伝達を調べた。

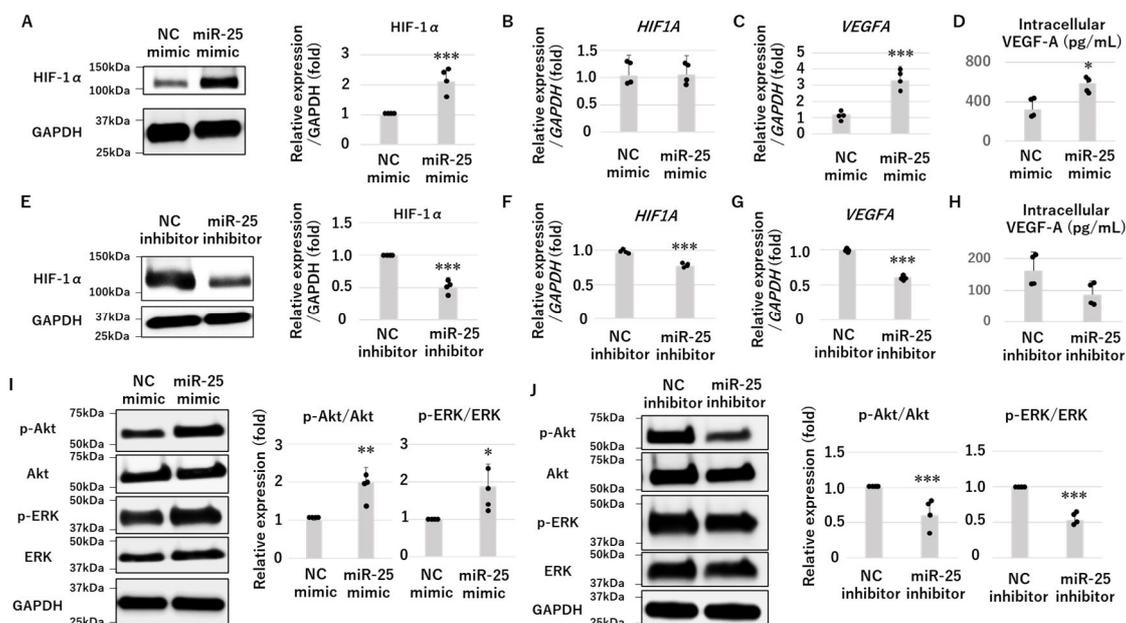
結果: G-PAVM 患者で他の患者より2倍以上高いレベルを示した血清miRNAを選択した。miR-25-3pは、グレン後群の肺動脈血清において、他の2群(無治療のチアノーゼ性CHD群、フォンタン後群)よりも有意に発現が上昇した。また、3-4名の同一患者における無治療チアノーゼ性心疾患群とグレン後群、グレン後群とフォンタン後群でも同様の傾向を示した。我々は、PHLPP2がmiR-25-3pの直接的な標的であることを同定した。PHLPP2の発現は、miR-25-3p mimic をトランスフェクションしたHMVEC-Lでは、コントロール細胞と比較して有意に低下した。HIF-1 α および VEGF-A の発現レベルは、低酸素刺激後、PHLPP2/Akt/mTOR シグナル依存的に、miR-25-3p mimic をトランスフェクションしたHMVEC-Lでコントロール細胞に比べて上昇した。miR-25-3pは低酸素条件下でHMVEC-Lの血管新生、増殖、遊走を促進した。miR-25-3p inhibitorを用いた実験では、PHLPP2/Akt/mTORシグナル依存的にHIF-1 α および VEGF-A の発現が低下し、低酸素条件下でHMVEC-Lの血管新生、増殖、遊走を減少させた。





A PHLPP2 gene 5'CUGUGAAGUGUAUGUGUGCAAUA3'
 hsa-miR-25-3p 3'AGUCUGGCUCUGUUCACGUUAC5'





考察：我々は、循環 miR-25-3p が G-PAVM 患者の PA 血清サンプルにおいて特異的に上昇していることを見出した。我々は、miR-25-3p が HMVEC-L の PHLPP2 をダウンレギュレートし、Akt/mTOR/HIF-1 α 軸の活性化を介して VEGF/VEGFR 軸を活性化することによって異常な血管新生を引き起こし、低酸素条件下での血管新生につながることを示した (図)。

PHLPP は、Ras 相互作用ドメイン、plekstrin homology ドメイン、ロイシンリッチリピートドメイン、PDZ ドメイン結合モチーフを機能ドメインとして含むプロテインホスファターゼである。PHLPP には 2 つのアイソフォーム、PHLPP1 と PHLPP2 があり、Akt を 473 番セリンで脱リン酸化し、Akt セリン-スレオニンキナーゼとプロテインキナーゼ C アイソフォームを制御する。PHLPP2 はまた、mTOR (mechanistic target of rapamycin) 活性をダウンレギュレートするか、mTOR のリン酸化を阻害することができる。関節リウマチにおける血管新生は、線維芽細胞様滑膜細胞における PI3K-AKT-mTOR-HIF-1 α 経路を介して引き起こされるという報告がある (*Front Pharmacol.* **12**, 696802 (2021))。がんにおいては、mTORC1 は HIF-1 α の翻訳、転写活性、および 4E-BP1、S6K1、STAT3 が関与する VEGF-A シグナル伝達を促進する (*Oncogene.* **34**, 2239-50 (2015), *J Biol Chem.* **282**, 20534-43 (2007), *Nature.* **442**, 779-85 (2006))。低酸素は PHLPP2 mRNA の転写抑制を阻害し、次いで PHLPP2 タンパク質の減少を引き起こし、HIF-1 α /VEGF 軸の安定化と活性化をもたらす。血管内皮細胞における自己分泌型 VEGF は、内皮細胞自体に作用し、細胞の移動と血管の恒常性維持を促進する (*Cell Physiol Biochem.* **41**, 1346-1359 (2017), *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 3794-9 (2009), *Cell.* **130**, 691-703 (2007)) 48-50。持続的な低酸素曝露は、PHLPP2 の抑制と HIF-1 α を介した VEGF の緩やかな自己分泌につながる可能性があるため、我々のデータは、G-PAVM 患者の低酸素状態において、PHLPP2 を抑制する miR-25-3p レベルの増加が、さらなる肺血管新生につながる

ることを示唆している。

PHLPP2 が動静脈奇形に影響するという報告はない。miR-25-3p が微小血管内皮細胞において PHLPP2 を阻害するという事実は、新しい発見であり、G-PAVM のメカニズムを解明する上で重要である。miR-25-3p をサイレンシングすると、PHLPP による血管新生の抑制が増強されることから、miR-25-3p は G-PAVM 患者の治療における新たな重要な因子となる可能性がある。

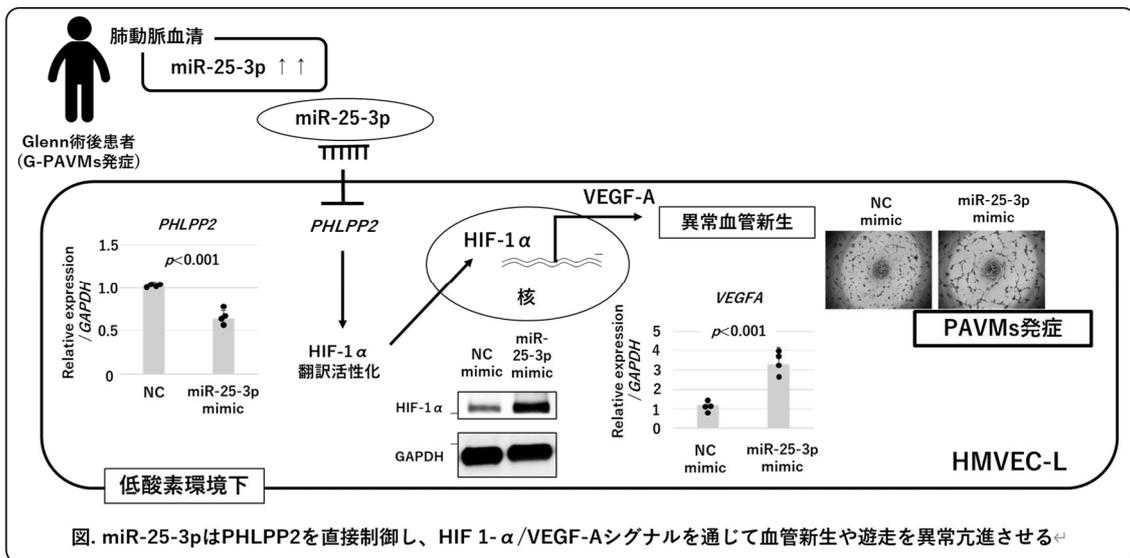


図. miR-25-3pはPHLPP2を直接制御し、HIF-1 α /VEGF-Aシグナルを通じて血管新生や遊走を異常亢進させる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川村 順平、下園 翼、高橋 宜宏、中江 広治、上野 健太郎、岡本 康裕
2. 発表標題 miR-25-3p は低酸素曝露下のヒト肺微小血管内皮細胞においてHIF 1- の発現を亢進させ、Glenn術後に肺動静脈瘻を引き起こす
3. 学会等名 日本小児循環器学会
4. 発表年 2023年

〔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	上野 健太郎 (Ueno Kentaro) (20644892)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	

	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
研究協力者	山口 宗一 (Yamakuchi Munekazu)	鹿児島大学医歯学総合研究科・血管代謝病態解析学・准教授 (17701)	

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