

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08112

研究課題名（和文）肺好中球分化へのダイナミズムと炎症を基軸とした肺高血圧症の病態解明

研究課題名（英文）Understanding the Pathophysiology of Pulmonary Hypertension Based on the Dynamics of Pulmonary Neutrophil Differentiation and Inflammation

研究代表者

君島 勇輔（Kimishima, Yusuke）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00836702

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）：JAK2V617Fクローン性造血のマウスモデルを用い、低酸素誘発性肺高血圧症マウスモデルを作成し、JAK2V617Fクローン性造血マウスではより肺高血圧症の増悪を認めることを明らかにした。肺好中球分化へのダイナミズムの過程において、JAK2V617Fは、造血幹細胞から分化するに従って、ACVRL1遺伝子発現を増加させ、これがJAK2V617Fによる肺高血圧症増悪の機序であることが示唆された。また、JAK2V617Fクローン性造血を有する患者では、ACVRL1発現増加を認めることを見出し、肺高血圧症とJAK2V617Fおよび血栓形成におけるACVRL1の意義についてさらなる研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肺高血圧症の病態に炎症細胞や炎症性サイトカインが重要な位置付けを占め、治療ターゲットとして注目されている。ある特定の分子を制御することで病態の改善に寄与することが期待され、肺高血圧症に対する分子標的薬の可能性が示唆されているが、いまだに臨床応用には至っていない。本研究では、JAK2V617FとACVRL1に注目し、肺動脈周囲肺好中球の肺動脈リモデリングにおける意義を明らかにした。これらを新規ターゲットとすることで、慢性血栓塞栓性肺高血圧症を含む肺高血圧症、および静脈血栓症の新規治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using a mouse model of JAK2V617F clonal hematopoiesis, we developed a sustained hypoxia-induced pulmonary hypertension mouse model. We demonstrated that mice with JAK2V617F clonal hematopoiesis exhibit more severe pulmonary hypertension. During the differentiation into pulmonary neutrophils, JAK2V617F progressively increased ALK1 (ACVRL1) gene expression as hematopoietic stem cells differentiated into pulmonary neutrophils. This data suggests a molecular mechanism underlying the JAK2V617F-induced development of pulmonary hypertension. Additionally, we found increased ACVRL1 expression in patients with JAK2V617F clonal hematopoiesis. We are investigating the significance of the JAK2V617F/ACVRL1 axis in chronic thromboembolic pulmonary hypertension and thrombus formation in the right heart system vessels of JAK2V617F carriers.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺高血圧症 JAK2V617F クローン性造血 ALK1 ACVRL1 静脈血栓症

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は、肺動脈の末梢動脈レベルでの異常な内膜・中膜の肥厚(肺動脈リモデリング)を特徴とし、右心不全に至る予後不良な疾患であり、病態解明に基づく新たな治療法の開発が望まれている。肺動脈血管リモデリングの過程では、構成細胞の増殖を制御する様々な情報伝達系が関与し、炎症のプロセスが重要な役割を果たす(Circ Res 2014; 115: 165-175)。炎症の主役となる好中球、マクロファージなどの免疫担当細胞は、骨髄の造血幹細胞・前駆細胞を経て動員され、末梢循環系から肺組織・肺動脈周囲へと遊走・浸潤する。骨髄-肺のダイナミックなネットワークにより、目的に合致した免疫細胞が骨髄から供給されて肺動脈リモデリングの病態形成に関与する。しかし、骨髄由来血液細胞が末梢肺動脈周囲に向かってどのように分化・誘導し、炎症細胞として活性化し、肺高血圧症の病態形成に関与していくかは未解明である。

肺動脈性肺高血圧症では、遺伝子変異を有する症例が存在し、ACVRL1 変異も重要な遺伝子変異として報告されている。ACVRL1 は、TGF β ファミリーに属するキナーゼ受容体で、Smad のリン酸化を介して転写レベルで細胞内シグナルを調節しているが、この ACVRL1 シグナリングが肺高血圧症の発症・進展を促進するか抑制するかは議論の余地がある。すなわち、ACVRL1 全身ノックアウトマウスでは肺高血圧症を自然発症する(Cardiovasc Res 2011; 92: 359-360)が、リガンド(BMP9)に対する中和抗体による ACVRL1 の阻害では、ラット低酸素曝露性肺高血圧症を改善する(Circ Res 2019; 124: 846-855)。これらの相反する結果は、細胞特異的な解析が不十分であるためと考えられ、血液細胞の ACVRL1 の役割については、全く検討されていない。一方、好中球由来エラスターゼ活性を阻害することで肺高血圧症を改善するとの報告がなされており(Nat Med 2000; 6: 698-702) 肺好中球は肺高血圧症で重要な役割を果たす。ACVRL1 が肺好中球への分化・活性化の過程で重要な役割を果たしている可能性があるが、その詳細は未解明である。

2. 研究の目的

肺高血圧症は肺動脈血管リモデリングを特徴とし、肺動脈周囲に浸潤・活性化した好中球などの炎症細胞がそのプロセスに重要な役割を果たす。骨髄-肺のダイナミックなネットワークにより、骨髄由来免疫細胞が骨髄から供給されてその病態形成に関与する。骨髄造血幹細胞から肺好中球に分化するダイナミズムにおいて、鍵となる分子を同定し、それを制御できれば新しい肺高血圧症のメカニズムとして期待でき、本研究でそれを明らかにする。

3. 研究の方法

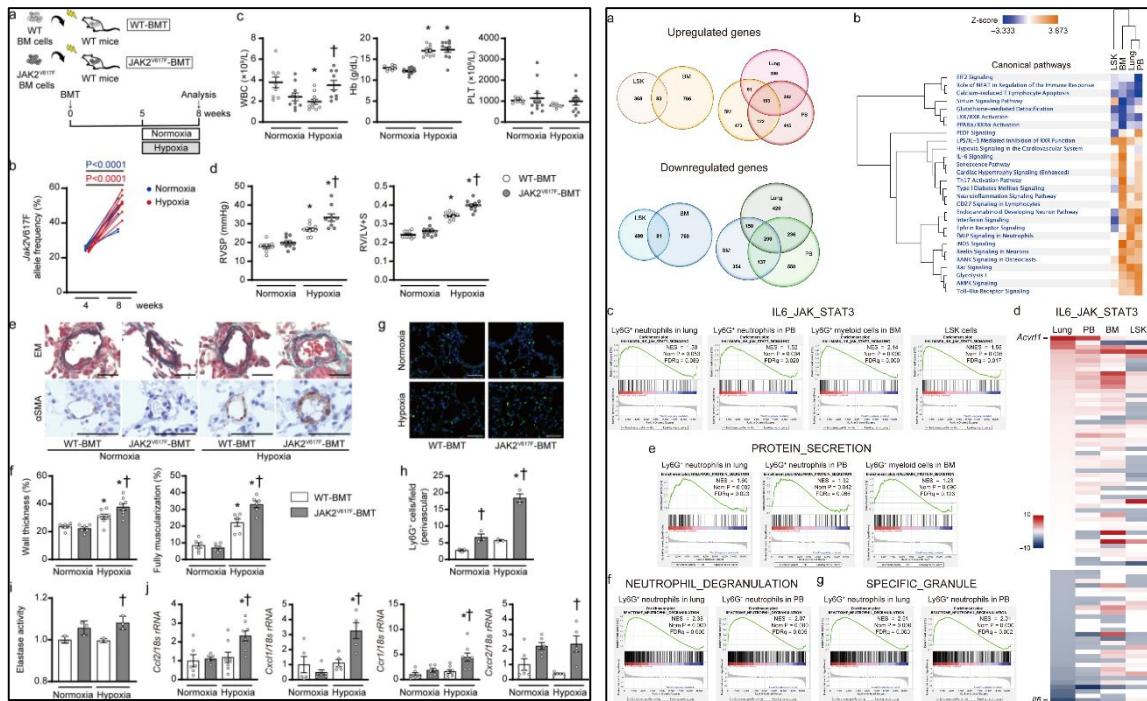
マウスに 10%持続低酸素を 3 週間暴露し、低酸素誘発性肺高血圧症マウスモデルを作成する。骨髄造血幹細胞(Lineage-c-kit+ Sca-1+抗体)、骨髄球前駆細胞(Ly6G 抗体)、末梢血液好中球(Ly6G 抗体)、肺組織における肺好中球(Ly6G 抗体)をフローサイトメトリー法により単離する。RNA を抽出して、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンスにより、骨髄球系細胞から肺好中球に至る全分化段階における遺伝子発現を網羅的に解析する。階層クラスター分析およびパスウェイ分析により、各分化レベルでの遺伝子発現の多様性を明らかにする。

JAK2V617F 変異トランスジェニックマウスをドナーとする骨髄移植により、クローン性造血のマウスモデルを作成して検討を行う。JAK2V617F と ACVRL1 の分子生物学関連性を明らかにする。

福島県立医科大学附属病院循環器内科に入院した肺高血圧患者から、末梢血液の好中球を単離し、RNA を抽出して、リアルタイム RT-PCR で ACVRL1 発現量を定量解析して、その意義を明らかにする。

4. 研究成果

JAK2V617F 変異トランスジェニックマウスをドナーとする骨髄移植により、クローン性造血のマウスモデルを作成して検討を行った。3 週間の持続的低酸素負荷により肺高血圧症を誘導したところ、JAK2V617F の骨髄を移植されたレシピエントマウスは、対照群である野生型レシピエントマウスと比較して、肺高血圧症は増悪し、病理学的な肺動脈リモデリングの増悪とともに肺動脈周囲の好中球浸潤の有意な増加や好中球エラスターゼ活性・好中球由来ケモカインの増加を認めた。好中球の走化性アッセイやコロニーアッセイでの検討から、末梢血からの好中球走化性の亢進と肺髄外造血による増殖の機序により、JAK2V617F マウスの肺組織における好中球の増加と炎症の増悪が肺高血圧症増悪における中心的なメカニズムであることが示唆された(図)。



骨髄球系細胞から肺好中球に至る全分化段階における遺伝子発現を網羅的に解析するため、RNA シークエンスを行った。結果、JAK2V617F マウスでは、造血幹細胞から肺好中球へと分化するに従って、ALK1 (ACVRL1) 遺伝子発現が増加していることが分かった(図)。JAK2V617F は STAT3 をリン酸化させるが、in silico による解析を行ったところ、ALK1 のプロモーター領域に STAT3 結合部位が示された。In vitro での検討では、JAK2V617F ノックイン細胞では野生型細胞と比較して、ALK1 プロモーター活性が有意に増加しており、これは JAK1/2 阻害薬や STAT3 阻害薬により抑制されることから、ALK1 発現は JAK2-STAT3 による転写により制御されていることを明らかにした。

そして、ALK1 を阻害することにより JAK2V617F マウスで認めた肺高血圧症の増悪が改善できるか検討したところ、ALK1 阻害薬の投与により、JAK2V617F マウスで認めた低酸素誘導性肺高血圧症の増悪は完全に抑制され、肺動脈リモデリングの改善も認めた。

肺高血圧症患者における JAK2V617F 変異クローン性造血の意義を検討した。末梢血液から DNA を抽出してアレル特異的リアルタイム PCR 法により JAK2V617F 変異検出解析を行ったところ、JAK2V617F 変異クローン性造血を有する割合は、肺高血圧症患者では 7.1% (70 人中 5 人) で、これは健康人より有意に高頻度に認められた。JAK2V617F 変異を有する肺高血圧症患者全員が、末梢血球数は正常範囲であり、JAK2V617F 変異クローン性造血が血液疾患を有しないにも関わらず、肺高血圧症の発症や進展に関与していることが示唆された。

福島県立医科大学附属病院循環器内科に入院した JAK2V617F クローン性造血を有する肺高血圧症患者から、末梢血液の白血球を単離し、RNA を抽出して、リアルタイム RT-PCR で ACVRL1 発現量を定量解析した。JAK2V617F クローン性造血を有する患者では、有さない患者と比較して、ACVRL1 発現増加を認めることを見出し、血球細胞における ACVRL1 の意義が示唆された。さらに、JAK2V617F クローン性造血を有する肺高血圧症患者のさらなる臨床像の解析を行い、慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) に限った検討では、その 11.1% に JAK2V617F クローン性造血を有することが示唆された。CTEPH は、器質化した血栓による肺動脈閉塞が主病因であるが、複合的な要素によって肺動脈リモデリングが進行する。CTEPH は、基礎疾患として深部静脈血栓症、凝固能異常が存在し、肺に反復して血栓塞栓症をきたすため、我々は JAK2V617F ここに着目して、ALK1 との関連性について現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件/うち国際共著 13件/うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Yusuke Kimishima, Tomofumi Misaka, Tetsuro Yokokawa, Kento Wada, Koki Ueda, Koichi Sugimoto, Keiji Minakawa, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Motohiko Oshima, Shuhei Koide, Kotaro Shide, Kazuya Shimoda, Atsushi Iwama, Kazuhiko Ikeda, Yasuchika Takeishi	4. 巻 12
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension with ALK1 upregulation in lung neutrophils.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26435-0	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 Kento Wada, Tomofumi Misaka, Tetsuro Yokokawa, Yusuke Kimishima, Takashi Kaneshiro, Masayoshi Oikawa, Akiomi Yoshihisa, Yasuchika Takeishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Blood-based epigenetic markers of FKBP5 gene methylation in patients with dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e021101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.121.021101	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 Tetsuro Yokokawa, Tomofumi Misaka, Yusuke Kimishima, Kento Wada, Keiji Minakawa, Takashi Kaneshiro, Akiomi Yoshihisa, Kazuhiko Ikeda, Yasuchika Takeishi	4. 巻 3
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis and JAK2V617F mutations in patients with cardiovascular disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC CardioOncology	6. 最初と最後の頁 134-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacc.2021.01.001	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 Sato Yu, Yoshihisa Akiomi, Ichijo Yasuhiro, Watanabe Koichiro, Hotsuki Yu, Kimishima Yusuke, Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Sato Takamasa, Kaneshiro Takashi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 28
2. 論文標題 Cardio-Ankle Vascular Index Predicts Post-Discharge Stroke in Patients with Heart Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 766 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.58727	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 Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Kimishima Yusuke, Wada Kento, Minakawa Keiji, Sugimoto Koichi, Ishida Takafumi, Morishita Soji, Komatsu Norio, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 106
2. 論文標題 Crucial role of hematopoietic <i>JAK2</i>; V617F in the development of aortic aneurysms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1910 ~ 1922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2020.264085	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 Sugawara Yukiko, Yoshihisa Akiomi, Ishibashi Shinji, Matsuda Mitsuko, Yamadera Yukio, Ohara Himika, Ichijo Yasuhiro, Anzai Fumiya, Sato Yu, Kimishima Yusuke, Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Yamada Shinya, Sato Takamasa, Kaneshiro Takashi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 3
2. 論文標題 Liver Congestion Assessed by Hepatic Vein Waveforms in Patients With Heart Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CJC Open	6. 最初と最後の頁 778 ~ 786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cjco.2021.02.004	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 Abe Satoshi, Yoshihisa Akiomi, Ichijo Yasuhiro, Kimishima Yusuke, Yokokawa Tetsuro, Misaka Tomofumi, Sato Takamasa, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Kaneshiro Takashi, Nakazato Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 3
2. 論文標題 Serum TRACP5b, a Marker of Bone Resorption, Is Associated With Adverse Cardiac Prognosis in Hospitalized Patients With Heart Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CJC Open	6. 最初と最後の頁 470 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cjco.2020.12.005	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 該当する

1. 著者名 Kurosawa Yuta, Shimizu Takeshi, Ando Takuya, Akama Joh, Muto Yuki, Kimishima Yusuke, Kiko Takatoyo, Sato Akihiko, Misaka Tomofumi, Yoshihisa Akiomi, Yamaki Takayoshi, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 63
2. 論文標題 The Prognostic Impact of D-Dimer on Long-Term Mortality in Patients with Coronary Artery Disease after Percutaneous Coronary Intervention	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1070 ~ 1077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.22-377	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 Akama Joh, Shimizu Takeshi, Ando Takuya, Anzai Fumiya, Muto Yuuki, Kimishima Yusuke, Kiko Takatoyo, Yoshihisa Akiomi, Yamaki Takayoshi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 63
2. 論文標題 Prognostic Value of the Pattern of Non-Adherence to Anti-Platelet Regimen in Stented Patients (PARIS) Bleeding Risk Score for Long-Term Mortality After Percutaneous Coronary Intervention	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.21-440	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 Akama Joh, Shimizu Takeshi, Ando Takuya, Anzai Fumiya, Muto Yuuki, Kimishima Yusuke, Kiko Takatoyo, Yoshihisa Akiomi, Yamaki Takayoshi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 17
2. 論文標題 Clinical usefulness of the pattern of non-adherence to anti-platelet regimen in stented patients (PARIS) thrombotic risk score to predict long-term all-cause mortality and heart failure hospitalization after percutaneous coronary intervention	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0274287 ~ 0274287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0274287	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 Tomita Yusuke, Anzai Fumiya, Misaka Tomofumi, Ogawara Ryo, Ichimura Shohei, Wada Kento, Kimishima Yusuke, Yokokawa Tetsuro, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 8
2. 論文標題 Targeting N-Myristoylation Through NMT2 Prevents Cardiac Hypertrophy and Heart Failure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 1263 ~ 1282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2023.06.006	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 Endo Keiichiro, Shimizu Takeshi, Muto Yuki, Kimishima Yusuke, Abe Satoshi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika	4. 巻 28
2. 論文標題 Acute coronary syndrome with severe coronary calcification in a patient with pseudo-pseudohypoparathyroidism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 172～175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2023.06.004	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 Misaka Tomofumi, Kimishima Yusuke, Yokokawa Tetsuro, Ikeda Kazuhiko, Takeishi Yasuchika	4. 巻 81
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis and cardiovascular diseases: role of JAK2V617F	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 3～9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2022.02.001	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yusuke Kimishima
2. 発表標題 Small hematopoietic clones with JAK2V617F causally lead to pulmonary hypertension through neutrophil selective migration and maturation from the precursors in the lungs
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Kimishima
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension through ALK1
3. 学会等名 第86回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022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	三阪 智史 (Misaka Tomofumi) (50793080)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究 分担者	池田 和彦 (Ikeda Kazuhiko) (90381392)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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