

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591583

研究課題名(和文)胎生期における肺血管の発生機構の分子生物学的解明と新規肺血管特異的新生因子の探索

研究課題名(英文)Exploring the molecular mechanism of embryonic pulmonary vascular development

研究代表者

内田 敬子 (UCHIDA, KEIKO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50286522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期において正常な肺血管を構築する血管内皮細胞由来の新規肺血管新生因子を探索することを目的に、肺血管内皮細胞を用いたマイクロアレイ解析を実施した。発生に伴い発現量が大きく変化するTbx4とSca-1に着目し、肺組織における発現様式を定量PCR法やin situ hybridization法によって観察し、さらに、肺間葉系細胞初代培養を用いて血管新生能に対するTbx4の役割をin vitroで解析した。また、肺血管における2型イノシトール三リン酸受容体に着目し肺高血圧症における役割をノックアウトマウスを用いて個体レベルで解析し、肺高血圧症の重症化を抑制する新たなメカニズムの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore the novel factors for angiogenesis of pulmonary vessels, we performed microarray analysis using RNA extracted from pulmonary endothelial cells during development of the lungs. We focused on two genes, Tbx4 and Sca-1, whose expression levels are dynamically changed during lung development, observed their expression patterns in the lung tissue using quantitative PCR and in situ hybridization, and performed in vitro tube formation assays using primary culture of the lung mesenchymal cells in order to clarify their effects on angiogenesis of the lung vessels. In addition we analyzed the roles of inositol trisphosphate receptor type 2, that is expressed in the pulmonary arteries, for pulmonary arterial hypertension, using knockout mice. Our results will provide new insight into the mechanism of exacerbation in pulmonary arterial hypertension.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺血管 発生 肺高血圧

## 1. 研究開始当初の背景

陸上生物は肺呼吸を行い、肺胞近辺を走行する毛細血管内の血液と肺胞内の空気との間(血液 空気関門)でガス交換することにより生命活動に必要な酸素を得ている。肺の原基である肺芽は内胚葉由来の前腸から分岐し、胚子期、偽腺状期、細管期、終末囊期、肺胞期を経て成熟する(マウスではそれぞれ胎生9日、胎生9-16日、胎生16-17日、胎生18日から出生時、出生後に相当する)。ガス交換の場となる末梢の肺血管は肺芽の周囲にある中胚葉由来の原腸間葉系細胞から発生し、終末囊期において、将来肺胞となる終末囊に毛細血管が接して血液 空気関門が確立する。酸素を運搬する場である血管系は、血球血管芽細胞が血管内皮細胞に分化して原始血管叢を形成し(脈管形成)その後、既存の血管から新たに管腔を形成する過程(血管新生)を経て完成する。血管壁は、血管内皮細胞とその外側にある壁細胞から構成される。血管新生の過程では、血管内皮細胞のリモデリングと壁細胞の動員によって成熟し、それらの細胞間接着で安定化する。成熟後も、低酸素下など病的状態では、両者の接着は再度不安定化し、血管内皮細胞が遊走し血管透過性が亢進して、血管新生が生じる。今まで、胎生期および生後の病的状態における血管新生は体血管を対象に研究されてきた。一方、先天性心疾患に伴う肺血管低形成や肺動静脈奇形、主要大動脈肺動脈側副動脈などの肺血管異常は、しばしば小児循環器診療で遭遇し、難治性である。しかし、肺血管特異的な血管新生機構や体血管に影響せず肺血管に特異的に作用する肺血管新生因子に関する研究はほとんど行われてこなかった。

今日まで、主に体血管の血管新生過程における血管内皮細胞の安定化および不安定化を制御する分子群は、細胞膜上の受容体とそのリガンドを中心に数多く単離されている。その中でも特に、Thrombin の受容体 PAR-1、PAF receptor、Bradykinin receptor は Gq 結合型 G 蛋白共役型受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)であり、血管内皮細胞の不安定化の一部は、ホスホリパーゼ C の活性化により細胞内  $IP_3$ - $IP_3R$ - $Ca^{2+}$ 系を介して惹起されることが報告されている。ホスホリパーゼ C の活性化によって生じる  $IP_3$  は、生体内の様々な細胞で細胞内セカンドメッセンジャーとして働く。 $IP_3$  は細胞内の  $Ca^{2+}$ ストアである小胞体上に存在する  $IP_3R$  に結合し  $Ca^{2+}$ を細胞質内へと放出させる。 $IP_3R$  には、1型、2型、3型の3種のサブタイプが存在し、 $IP_3$ - $IP_3R$ - $Ca^{2+}$ 系は、卵の受精時や神経系のシナプス可塑的現象など、多くの生体機能に重要な役割を担っている。我々のグループは、1型  $IP_3R$  が主に小脳・大脳に発現して脳の高次機能に関与すること(Matsumoto, Nature, 1996)、2型、3型  $IP_3R$  が唾液腺や膵臓の外分泌に(Futatsugi, Science, 2005)、1型、

2型  $IP_3R$  が心臓発生に(Uchida, PLoS ONE, 2010)、遺伝的相補性を持って機能することを、ノックアウト(KO)マウスの解析から明らかにしてきた。さらに、我々は、現在まで、おもに  $IP_3R$  の心臓血管発生における役割に関する基礎的研究に従事してきた。3種の  $IP_3R$  の単独 KO マウスでは、特別な発生異常は認められなかったが、1型2型  $IP_3R$  および1型3型  $IP_3R$  ダブルノックアウト(DKO)マウスの解析で、(1)1型2型  $IP_3R$ DKO マウスにおける胎盤内の形態異常(胎盤迷路の領域の狭小化と胎仔血管の拡張)、(2)1型2型  $IP_3R$ DKO マウスにおける胎仔全体の血管発生異常を確認した。どちらも脈管形成は起こるが血管新生に異常をきたしており、 $IP_3R$  は胎生期の血管新生の過程で機能していると言える。さらに、今回我々は、2型  $IP_3R$  が肺組織の中で肺動脈に特異的に発現するという結果を得、本研究の着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胎児期において正常な肺血管を構築する血管内皮細胞由来の新規肺血管新生因子を探索することである。 $IP_3$ - $IP_3R$ - $Ca^{2+}$ シグナル系が胎生期の肺血管新生や病的環境下の肺血管新生に重要なシグナルの一つではないかという仮定のもとに、肺血管新生過程における2型  $IP_3R$  の下流因子を決定する。同時に、今まで心血管発生の研究で構築してきた研究技術を用いて、生理的な血液 空気関門の形成に重要な肺胞上皮と血管内皮との相互作用を可能とする肺血管特異的な新規の血管新生因子を探索する。本研究は、小児循環器医がしばしば遭遇し有効な治療法が少ない肺血管低形成、肺動静脈奇形、主要大動脈肺動脈側副動脈などの肺血管異常に対して、生理的なガス交換を可能とする正常な肺血管の再生治療へ繋がる可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1)肺血管における2型  $IP_3R$  の発現様式の観察:

肺発生の各段階(胚子期・偽腺状期・細管期・終末囊期・肺胞期)に沿って、肺血管における2型  $IP_3R$  の時間・空間的発現様式を LacZ 染色と免疫組織化学法で観察する。2型  $IP_3R$  KO マウスは翻訳開始領域に LacZ 遺伝子を挿入しているため LacZ 染色で内在性の2型  $IP_3R$  の発現様式を観察しうる。血管内皮マーカーや平滑筋マーカーの染色も同時に行い、部位を特定する。

(2)肺高血圧症における2型  $IP_3R$  KO マウスと野生型マウスとの比較:

低酸素飼育またはモノクロタリンピロールの静脈注射による肺高血圧症モデルを2型  $IP_3R$  KO マウスと野生型とで作製し、心エコー解析、右心室重量測定、肺組織切片における中膜肥厚の程度を比較検討した。

(3)発生段階別肺血管内皮細胞を用いたマイクロアレイ解析:

肺血管発生が進行する胎生 14 日と生後 2 日の肺組織を酵素処理によって分散し、血管内皮細胞表面マーカー CD31 でラベルしたのち、FACS で細胞分離を行った。分離した肺血管内皮細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い胎生 14 日または生後 2 日に有意に発現の高い遺伝子群を抽出した。

(4) Sca1 陽性細胞の肺発生における発現変化の解析：

マイクロアレイ解析によって生後 2 日に比較的多く発現する分子として Sca1 に着目した。肺発生段階に合わせて肺分散細胞を FACS 解析し、Sca1 陽性細胞数を経時的に観察した。

(5) 肺発生段階における Tbx4 の発現様式：同様のマイクロアレイ解析で生後 2 日より胎生 14 日肺で有意に発現量が高い因子として Tbx4 に着目した。in situ hybridization により時間・空間的な肺組織における Tbx4 の発現様式を観察した。

(6) 胎生期肺間葉細胞の分離と初代培養法の確立と in vitro tube formation 解析：胎生 12 日から成獣までの肺間葉細胞を接着法により分離し初代培養法を確立した。各発生段階の肺間葉細胞を用いて定量 PCF 法により Tbx4 の発現量の相対的变化を測定した。胎生 13 日から採取した肺間葉細胞初代培養において RNAi を用いて Tbx4 をノックダウンしマトリゲル上に培養することで、管腔形成能が変化するか否かを観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 本研究の主な成果

2 型 IP<sub>3</sub>R の肺における発現様式と肺高血圧症へのかかり：

肺発生の各段階の肺組織切片を作製し LacZ 染色と平滑筋および血管内皮マーカーの免疫染色の共染色を行った結果、2 型 IP<sub>3</sub>R は胎生期には肺動脈中膜に(図 1)、成獣では肺動脈内膜および中膜に発現していた。そこで、2 型 IP<sub>3</sub>RKO マウスを用いて低酸素曝露による肺高血圧モデルを作製したところ、IP<sub>3</sub>R は、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ血管トーンを増強させる可能性があるにもかかわらず、2 型 IP<sub>3</sub>RKO マウスにおいて、肺高血圧の増悪(右室左室重量比の上昇、心エコーにおける肺高血圧所見の増悪、肺組織切片における肺動脈中膜肥厚の増悪(図 2))が観察された。肺組織における cGMP 濃度は 2 型 IP<sub>3</sub>RKO マウスにおいても低酸素曝露による肺高血圧モデルで上昇しており、血管内皮機能は保持されていると考えられた。

生後肺組織における Sca1 陽性細胞の増加：胎生 14 日肺と生後 2 日肺から採取した CD31 陽性細胞を用いたマイクロアレイ解析より得た、生後 2 日に有意に発現が高い Sca1 に着目した。各発生段階の肺から分散した細胞を用いた FACS 解析より、出生後から成獣にかけて Sca1 陽性細胞数は非常に大きく増加するという結果を得た。

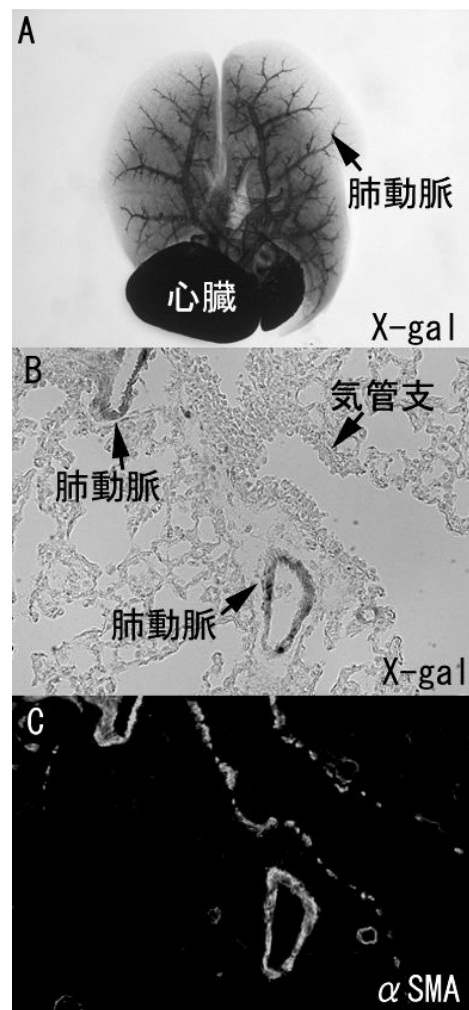


図 1 2 型 IP<sub>3</sub>RKO マウス肺の Xgal 染色 (A,B)と抗 smooth muscle actin 抗体染色 (C)

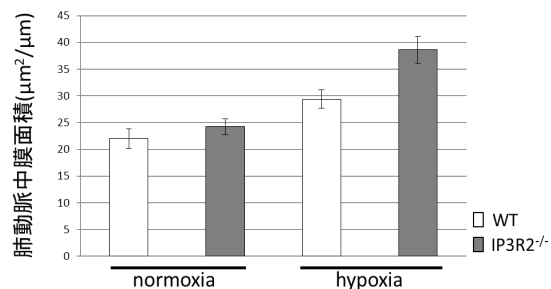


図 2 低酸素曝露肺高血圧モデルにおける肺動脈中膜面積の比較

胎仔肺間葉組織における Tbx4 の役割：

次に、とは逆にマイクロアレイ解析で胎生 14 日に有意に発現が高い Tbx4 に着目した。in situ hybridization により、肺組織に特異的かつ肺組織内では肺末梢血管の原基である肺間葉組織に Tbx4 の発現が認められた。肺間葉細胞初代培養をマトリゲル上に培養して観察される管腔形成能は Tbx4 のノックダウンを行っても有意な変化は認められなかった。

(2)本研究の国内外の位置づけとインパクト  
肺動脈中膜における2型 IP<sub>3</sub>Rの肺高血圧進展に対する抑制作用：

我々の2型 IP<sub>3</sub>RKO マウスは LacZ 遺伝子を翻訳開始領域に挿入しているため、感度よく内在性の発現領域を明確にすることが可能である。今まで解析されてこなかった2型 IP<sub>3</sub>Rの肺動脈中膜における特異的な発現は、本研究で得た新規の所見である。さらに、一般に細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルは肺動脈のトーンスにもリモデリングにも肺高血圧の増悪因子と考えられており、細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルを増強する分子の一つである2型 IP<sub>3</sub>Rを欠損させると肺高血圧は軽減すると予想していたが、予想に反して、2型 IP<sub>3</sub>RKO マウスでは低酸素曝露による肺高血圧症が増悪していた。これは、細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルは肺高血圧の進展を抑制する機構にも関与するという新たな機構の可能性が示唆された。

正常な肺血管を構築する血管内皮細胞由来の新規肺血管新生因子の探索 -Sca1 と Tbx4 :

肺発生における偽腺状期の胎生 14 日と肺胞期の生後 2 日において、Tbx4 と Sca1 がそれぞれ有意に発現が高いという新規の結果を得た。これらが肺組織に発現していることはすでに報告があるが、肺発生段階で発現量に変化することについては報告がない。Sca1 は胎生期に発現が非常に低く、生後の肺胞期に、肺成熟、すなわちガス交換を行う血液 空気 閉門の形成と成熟に Sca1 が関与する可能性が示唆される。Tbx4 は胎生 14 日頃に肺間葉組織に非常に高い発現が認められ、成獣肺では非常に低値となる。胎生期肺間葉細胞で Tbx4 の発現を抑制しても管腔形成能には変化はなく血管新生には関与しない可能性がある。

### (3)今後の展望

2型 IP<sub>3</sub>Rの肺高血圧症進展の抑制機構の解明：

今後は、細胞内 Ca<sup>2+</sup>を上昇させる分子の一つである2型 IP<sub>3</sub>Rが、いかに肺高血圧の進展を抑制するのか分子レベルで解明することを試みる。具体的には、野生型および2型 IP<sub>3</sub>RKO マウスの肺動脈平滑筋細胞の初代培養を用いて、どのような細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を引き起こしているかを比較検討する。特に細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入が低酸素曝露肺高血圧モデルで増強していると報告があり、store-operated または receptor-operated Ca<sup>2+</sup> entryを野生型とKOマウスで比較する予定である。肺高血圧の進展には、血管トーンスの増強と血管リモデリングが大きく関わっており、肺動脈標本による肺動脈トーンスの測定や、肺血管における細胞増殖とアポトーシスの程度を、肺組織切片を用いた細胞増殖マーカーによる免疫染色や TUNEL 染色で解析する。

新規肺血管新生候補因子としての Sca1 と

Tbx4 の機能

Sca1 陽性細胞数が増加する成獣肺組織から FACS を用いて分取し培養した CD31<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>細胞と CD31<sup>+</sup>Sca1<sup>-</sup>細胞とを比較して血管新生能に差があるか否かを *in vitro* tube formation assay や migration assay で解析する。

Tbx4 が肺間葉組織で発現が増加する時期は、肺発生の偽腺状期すなわち肺間葉組織で末梢血管が形成される時期である。Tbx4 が未分化な肺間葉組織から血管内皮の原基への分化に機能するか否かを、肺間葉細胞初代培養または ES 細胞の血管内皮細胞への分化実験系を用いて解析する。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Nakazawa M, Uchida K, Aramaki M, Kodo K, Yamagishi C, Takahashi T, Mikoshiba K, Yamagishi H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are essential for the development of the second heart field. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 査読有り, 51 巻, 2011 年, 58-66. 10.1016/j.yjmcc.2011.02.014.

[学会発表](計 3 件)

内田敬子、山岸敬幸 . 肺高血圧症の進展におけるイノシトール三リン酸受容体の役割 . 日本小児肺循環研究会, 2014 年 2 月 1 日, 東京 .

Uchida K, Yamagishi H. Placental Expression of Type 1 and 3 Inositol Trisphosphate Receptors is Required for the Extra-embryonic Vascular Development. *Weinstein Cardiovascular Development Conference 2013*, 2013 年 5 月 16 日 ~ 18 日, Tucson, Arizona, USA.

山岸敬幸、内田敬子 . 心臓における IP<sub>3</sub> レセプターの新たな機能 . 日本生理学会, 2012 年 3 月 29 日, 長野 .

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 敬子 (KEIKO UCHIDA)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号：50286522

### (2) 連携研究者

山岸 敬幸 (HIROYUKI YAMAGISHI)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：40255500