

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461606

研究課題名(和文)炎症機序を標的とした肺動脈性肺高血圧の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Role of inflammatory mechanism in the experimental model of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

澤田 博文 (Sawada, Hirofumi)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30362354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧(PAH)患者でBMP2という遺伝子の異常が見られるがその役割は明らかではない。PAHでは実験的にも、臨床的にも炎症機序の関わりが示唆されている。BMP2の減少した肺動脈内皮細胞ではGM-CSFを含むサイトカイン産生が亢進し、病変血管での炎症細胞集積に関与し、抗GM-CSF抗体は肺高血圧を改善することを示した。また、ヒトPAHと同様の病変を形成する、新しいPAHモデルの病変部位では、炎症細胞集積、サイトカイン(IL6, MCP1, MMP9, cathepsin-S, RANTES)の上昇が確認された。これらから、炎症機序のPAHに対する治療標的としての可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Although the role of BMP2 mutation in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH) was not established, association of BMP2 mutation and inflammatory mechanisms are shown in clinical and experimental pathology of PAH. We have shown that anti GM-CSF antibody administration improved the hypoxia induced pulmonary hypertension. To further elucidate the role of inflammation in PAH, we investigated the role of inflammation in a new human PAH-like rat model induced by the vascular endothelial growth factor receptor blockade with Sugen 5416 in combination with chronic hypoxia. Compared with in controls, the number of perivascular macrophages progressively increased during the experimental period; gene expression of IL6, MCP1, MMP9, cathepsin-S, and RANTES was distinctively upregulated in lungs.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧 炎症 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

**肺動脈性肺高血圧の病変形成と炎症機序**

肺動脈性肺高血圧(PAH)は、特異性以外に先天性心疾患、新生児呼吸器疾患、門脈圧亢進症、自己免疫疾患など幅広い疾患に関連して発症する、難治性の病態である。2000年にTGFβ-superfamilyであるBMP(bone morphogenetic protein)に対する受容体遺伝子(BMPR2)が特異性PAH(IPAH)の疾患責任遺伝子と同定されたが(LaneKB, 2000, DengZ,2000)肺血管病変形成機序は未だ不明である。本症は、組織学的には内膜中膜を中心とした血管壁の構成要素の肥厚と叢状病変(plexiform lesion)で特徴づけられる。これらの血管病変形成には、血管壁を構成する、血管内皮、血管平滑筋、繊維芽細胞ばかりでなく、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球などの炎症細胞も重要な役割を担っていると考えられている。(Tuder RM, 1994; Mitani Y, 1999; Perros F,2007)さらに、PAH患者ではIL-1、IL-6、TNF-αなど血中の炎症性サイトカインの上昇が認められ、臨床的にも炎症機序の関わりが示唆されているが、(Humbert M, 1995; Soon E, 2010)炎症が血管リモデリングを来す機序は、明らかではない。最近我々は、肺移植時に摘出されたIPAH肺組織を用いた検討から、患者肺ではGM-CSFが亢進し、GM-CSFレセプター陽性細胞が病変に集積している事を見いだした。

また、我々は、モノクローリン誘発肺高血圧モデルにおいて転写因子NF-κB阻害が、炎症細胞集積と肺高血圧を抑制する事を報告し(Sawada H, 2007)炎症が治療標的となる可能性を示したが、NF-κB阻害の全身への影響のため、より特異的なメディーエータを阻害する必要があった。最近、上述の臨床肺検体での知見に加え、siRNAによりBMPR2を減少させた培養肺動脈血管内皮細胞において、TNF-α刺激時のp38MAPKリン酸化が遷延し、その結果GM-CSFの産生が促進されることを発見した(Sawada H, 2014)。GM-CSFのPAHにおける役割は、不明であるが、動脈硬化病変における内膜細胞増殖においては、GM-CSFは病変促進的に働くことが報告され、(Haghighat A, 2007, Zhu SN, 2009)また、GM-CSFは血管平滑筋増殖(Rolfe BE,1995)や骨髄からの血管内皮由来細胞の動員作用(Takahashi T, 1999)も報告される。これらの機序は、PAHでも関与が示唆されている。(Asosingh K, 2008)

ヒトPAHにおいて、その病態を規定する病変、つまり治療の標的とすべき病変は、血管閉塞性の内膜肥厚と考えられるが、(Pietra GG,2004)従来、モノクローリンモデルを含め、PAH研究に用

いられる動物モデルの血管病変は中膜肥厚が主体であり、内膜肥厚を来すモデルの報告は非常に限られていた。(Sawada H, 2007, Stenmark KR, 2009)最近報告された、血管内皮増殖因子受容体阻害剤SU5416投与と低酸素環境に暴露されたラットは、内膜肥厚や叢状病変などヒト肺動脈性肺高血圧と類似の病変を形成することが示され、治療法開発での活用が期待される。(Abe K, 2010)。これらの研究結果から、GM-CSFなどの炎症機序阻害により、内膜肥厚を伴う、肺血管病変形成を抑制/退縮できるという仮説に至り、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、肺動脈性肺高血圧(PAH)における炎症機序を標的とした前臨床研究である。PAHは、BMPR2など責任遺伝子が同定され、病態の理解が進んだが、病変形成機序は不明であり、難治性で、予後不良の疾患である。新規治療薬が導入され、予後の改善が報告されるが、治癒を見込める治療法は確立されていない。今回、ヒトPAHと類似の病変をもつ、新規ラットモデルを用い、GM-CSFの新規治療標的としての可能性を検証するため、本研究を計画した

3. 研究の方法

ラット肺高血圧(PH)モデル(SU/Hypoxia)の作成は既報の方法(Abe K, 2010)による。7週齢のSprague-Dawley(SD)ラットに血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体阻害剤SU5416(20mg/kg)またはvehicle(Carboxy methyl cellulose 溶液)を皮下投与し、続いて低気圧性低酸素(1/2気圧、10%酸素相当)に3週間暴露する。その後正常酸素に戻し、2週間、5週間、10週間後に評価を行う。コントロールとしてVehicle+正常酸素、Vehicle+低酸素、およびSU5416+正常酸素群を検討する。各実験最終時点では、内頸静脈より、圧モニター下でカテーテルを留置し、肺動脈圧、右心室圧、大動脈圧を測定し、心肺組織を摘出する。右心室/左心室重量比から右室肥大を評価する。右肺を肺葉毎に切除し、蛋白質・RNA解析用に用いた。左肺はメタノールカルノアで還流固定し、パラフィン切片、凍結切片を作製する。病変の評価は、Elastica Van Gieson 染色により行う。

4. 研究成果

BMPR2の減少した肺動脈内皮細胞では、p38MAPKの活性化がみられ、サイトカイン産生が亢進し、ヒトIPAH病変の病変血管への炎症細胞集積に関与する事さらに、抗GM-CSF抗体投与は低酸素誘発肺高血圧を改善することを示した(Sawada H, 2014)。本研究では、最近報告された、血管内皮増殖因子受容体阻害剤SU5416投与と低酸素環境に暴露された叢状病変

などヒトPAHと類似の病変を形成するモデルを用いた。本モデルの、病変部位では、平滑筋細胞形質転換と炎症細胞集積、さらに肺組織のサイトカイン (IL6, MCP1, MMP9, cathepsin-S, and RANTES) 上昇が確認された。これらの所見から、炎症機序のヒトPAHに対する治療標的としての可能性が示された。(Otsuki S, 2015、Shinohara T, 2015)

#### 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9件)

1. Vattulainen-Collanus S, Akinrinade O, Li M, Koskenvuo M, Li CG, Rao SP, de Jesus Perez V, Yuan K, Sawada H, Koskenvuo JW, Alvira C, Rabinovitch M, Alastalo TP. Loss of PPAR in endothelial cells leads to impaired angiogenesis. *J Cell Sci.* 2016 Feb 15;129(4):693-705. 査読あり
2. Yuhei Nishimura, Shota Sasagawa, Hirofumi Sawada, Erquan Zhang, Soichiro Murakami, Yoshifumi Ashikawa, Mizuki Yuge, Shiko Okabe, Koki Kawaguchi, Reiko Kawase, Yoshihide Mitani, Kazuo Maruyama, TOSHIO TANAKA. Comparative Transcriptome Analysis Identifies CCDC80 as a Novel Gene Associated with Pulmonary Arterial Hypertension. *Front. Pharmacol.*, 07 June 2016 <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2016.00142> 査読あり
3. Shinohara T, Sawada H, Otsuki S, Yodoya N, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Saitoh S, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats: early intervention in overcoming the survivin-mediated resistance to apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015 Mar 15;308(6):L523-38. 査読あり
4. Otsuki S, Sawada H, Yodoya N, Shinohara T, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Potential contribution of phenotypically modulated smooth muscle cells and related inflammation in the development of experimental obstructive pulmonary vasculopathy in rats. *PLoS One.* 2015 Feb 25;10(2): e0118655. 査読あり
5. Zhang E, Maruyama J, Yokochi A, Mitani Y, Sawada H, Nishikawa M, Ma N, Maruyama K. Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin 5HT2A receptor antagonist, ameliorates the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Anesth.* 2015 Oct;29(5):715-23. 査読あり
6. Sawada H, Saito T, Nickel NP, Alastalo TP, Glotzbach JP, Chan R, Haghghat L, Fuchs G, Januszyk M, Cao A, Lai YJ, Perez Vde J, Kim YM, Wang L, Chen PI, Spiekerkoetter E, Mitani Y, Gurtner GC, Sarnow P, Rabinovitch M. Reduced BMP2 expression induces GM-CSF translation and macrophage recruitment in

- humans and mice to exacerbate pulmonary hypertension. *J Exp Med.* 2014 Feb 10;211(2):263-80. 査読あり
7. Yamada Y, Maruyama J, Zhang E, Okada A, Yokochi A, Sawada H, Mitani Y, Hayashi T, Suzuki K, Maruyama K. Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Anesth.* 2014 Feb;28(1):26-33. 査読あり
  8. Iwasa T, Ohashi H, Kihira K, Koike Y, Otake K, Inoue M, Sawada H, Toyoda H, Komada Y. 10-year-old girl with life-threatening idiopathic systemic capillary leak syndrome: a case report. *BMC Pediatr.* 2014 May 31;14:137. 査読あり
  9. Iwashita Y, Zhang E, Maruyama J, Yokochi A, Yamada Y, Sawada H, Mitani Y, Imai H, Suzuki K, Maruyama K. Thrombomodulin protects against lung damage created by high level of oxygen with large tidal volume mechanical ventilation in rats. *Journal of Intensive Care.* 2014. 2:57 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

- (1) パネルディスカッション第52回日本小児循環器学会 2016.7.7 東京ドームホテル(東京)小児期心疾患診断における学校心臓検診の役割 -心房中隔欠損と特発性肺動脈性肺高血圧について-  
澤田博文、三谷義英、大橋啓之、淀谷典子、大槻祥一郎、小沼武司、新保秀人、早川豪俊、丸山一男、中山智孝、福島裕之、小垣滋豊、五十嵐岳宏、小野安生、土井庄三郎、市田路子、中西敏雄、山田 修、佐地 勉
- (2) American Thoracic Society International Conference, 2016.5.17, サンフランシスコ (米国) Sawada H, Ohashi H, Ohtsuki S, Yodoya N, Hayakawa H, Konuma T, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y and Mitani Y. Impact of School Electrocardiography Mass Screening on the Diagnosis of Atrial Septal Defect in Children.
- (3) シンポジウム 第4回日本肺循環学会・第3回肺高血圧学会 2015.10.3 東京ステーションコンファレンス(東京) 先天性心疾患に伴う高度PHにおける肺気道形成と血管形成の連関  
澤田博文、大橋啓之、淀谷典子、大槻祥一郎、小沼武司、新保秀人、早川豪俊、丸山一男、今中(吉田)恭子、三谷義英
- (4) シンポジウム 第50回日本小児循環器学会 2014.7.4 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)  
小児期肺高血圧克服への新たなアプローチ  
学校心臓検診による小児期特発性肺動脈性肺高血圧の早期診断と予後：全国調査研究  
澤田博文、三谷義英、中山智孝、福島裕之、

小垣滋豊、五十嵐岳宏、小野安生、市田蒨子、中西敏雄、山田 修、佐地 勉日本小児循環器学会研究委員会、日本小児肺循環研究会

〔図書〕(計3件)

- (1) 澤田博文、三谷義英、 ガス療法の使い方 小児科診療(診断と治療社)2016年7巻 共著 146 (p103-109)
- (2) 澤田博文、 Eisenmenger 症候群 今日の小児治療指針第16版(医学書院)2015年 共著 1006 (p511-513)
- (3) 澤田博文、大橋啓之、三谷義英、 心疾患に合併する睡眠障害、日常診療における子どもの睡眠障害(診断と治療社)2015年 共著 243 (p103-107)

〔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〕ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田博文 (SAWADA HIROFUMI)  
三重大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：30362354

(2) 研究分担者

丸山一男 (MARUYAMA KAZUO)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20181828

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