

令和元年6月18日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05298

研究課題名(和文)炎症性シグナルと血管保護シグナルによる肺高血圧症発症の制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular pathogenesis of pulmonary hypertension via inflammatory cytokines

研究代表者

中岡 良和 (NAKAOKA, YOSHIKAZU)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：90393214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は肺動脈末梢の小動脈(細小動脈)レベルで中膜・内膜の狭窄・閉塞を来して肺動脈圧の上昇から右心不全に至る厚労省指定難病である。我々は、炎症性サイトカインのinterleukin-6(IL-6)やIL-21がPAHモデルマウスの系で重要な役割を担うことを2015年に報告した。本研究で、マウスより重症のPAH病態を呈すラットの系を用いて、野生型とIL-6欠損ラット、IL-21受容体欠損ラットを比較することで、PAH重症化にIL-6とIL-21シグナルがともに重要な役割を担うことを世界に先駆けて見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの遺伝子改変動物での肺高血圧症の病態研究は、低酸素誘発性肺高血圧症モデルマウスの系で遺伝子欠損マウスを用いて主に行われてきた。本研究ではCRISPR/Cas9システムを用いて、炎症性サイトカインのIL-6やIL-21受容体をノックアウトして、現在の最も重症な肺高血圧症モデルであるSugen5416/低酸素重症肺高血圧症モデルラットの系で、IL-6欠損、IL-21受容体欠損の効果を検討した。その結果、炎症性サイトカインの阻害によって肺高血圧症の重症化は顕著に抑制されて、炎症性サイトカイン阻害は新しい肺高血圧症に対する治療法の開発に繋がると期待されて、臨床的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe disease which causes stenosis and occlusion in the pulmonary small arteries and arterioles, leading to elevation of pulmonary arterial pressure due to unknown etiology. Since PAH patients might eventually result in right heart failure and death without adequate treatment, PAH is designated as an intractable disease by MHLW. We need to develop a novel therapeutic strategy for PAH which is distinct from the anti-PAH vaso-dilating agents. We identified IL-21 as a downstream target of IL-6 responsible for promoting the pathogenesis of HPH(PNAS.112: E2677, 2015). In this study, we tried to validate the effect of either IL-6 blockade or IL-21 blockade on the pathogenesis of PAH in a more severe animal model, namely the Sugen5416(Su)/Hypoxia/Normoxia (Su/Hx) rat model. We found that both IL-6 knockout and IL-21 receptor knockout rats showed significant resistance to severe PAH compared with control wild-type rats.

研究分野：循環器内科学、血管病学

キーワード：肺高血圧症 肺動脈性肺高血圧症(PAH) 炎症 炎症性サイトカイン インターロイキン6 インターロイキン21 血管リモデリング

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は肺動脈末梢の小動脈(細小動脈)レベルで特異的に内膜・中膜の肥厚・閉塞を来して、肺動脈圧の上昇から右心不全に至る可能性のある厚生労働省指定難病である。近年、PAHの治療ではプロスタグランジン I₂、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬などの肺動脈平滑筋細胞の収縮・弛緩の不均衡を標的とした肺血管拡張薬による治療が保険承認・導入されて、予後は著明に改善している。しかし、PAHのサブグループの1つである膠原病性 PAH の予後は依然として不良であり、PAHで肺血管拡張薬の治療の効果が不十分な unmet medical needs は未だ存在する。また、現在の PAH に保険適応のある薬剤は全て平滑筋の収縮・弛緩を標的としており、平滑筋の収縮・弛緩と作用機序の異なる新しい PAH に対する治療薬が必要である。

PAH の発症には遺伝的背景に加えて、「炎症」などの環境因子による刺激が必要と考えられる。interleukin(IL)-6 は様々な炎症性疾患の病態形成に関わることが報告される炎症性サイトカインである。PAH 病態形成の鍵を握るサイトカインとして、これまで多くの報告がなされていた。PAH 患者の血清中で炎症性サイトカインの中で、特に IL-6 が高値の場合は予後が有意に悪い(Soon E, *et al. Circulation*. 2010; 122(9):920-7)。また、肺胞上皮特異的 IL-6 過剰発現マウスは PAH を自然発症するのみならず、低酸素曝露性肺高血圧症モデル(Hypoxia-induced PH: HPH)を作製すると PAH 病態が著明に増悪する(Steiner MK, *et al. Circ Res*. 2009;104(2):236-44)。以上より、IL-6 は PAH 病態形成の鍵であることが報告されていたが、その下流の分子機構は不明であった。

我々は HPH マウスの肺で、IL-6 が肺細小動脈の内皮細胞、平滑筋細胞で強く産生されること、そして HPH マウスに抗 IL-6 受容体抗体(MR16-1)を投与するとコントロールに比べて HPH 病態が著明に抑制されることを見出した。また、HPH マウス肺で IL-6 依存性のエフェクター細胞として働く Th17 細胞が増加して、Th17 細胞が主に産生する IL-21 が肺マクロファージを M2 マクロファージへ極性化することで肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進することを明らかにして、以上の結果を 2015 年に報告した(*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(20): E2677-86. 図 1)。



図 1. PAH 病態形成と IL-6/IL-21 シグナルの関係

この HPH マウスモデルは、右室収縮期圧 (RVSP: 正常値 15-20mmHg) が 30-35 mmHg に上昇する中等症 PAH モデルであり、肺の細小動脈と小動脈の中膜肥厚のみ誘導するが、亜閉塞性病変を来さない点が問題点として存在する。我々は上記の論文報告において、MR16-1 による IL-6 阻害や IL-21 受容体欠損 (IL-21RKO) マウスにおける IL-21 阻害は低酸素で誘導される中膜肥厚 (筋性化) を抑制することを明らかにしたが、重症 PAH 患者で見られる重症の病理像である新生内膜増殖や叢状病変の形成と血行動態の重症化が IL-6 や IL-21 などのサイトカインシグナルの阻害により防ぐことが可能かは明らかでなかった。今後、重症 PAH 患者に対して炎症性サイトカインと標的とした治療法の開発を考える上では、重症 PAH モデル動物で IL-6 や IL-21 シグナルを阻害する効果の検討が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

IL-6 や IL-21 を標的とした抗サイトカイン療法の有効性をヒトの重症 PAH 患者で検討する臨床試験を将来行うためには、PAH 重症病態におけるこれらのサイトカインの役割を明らかにする必要がある。そこで、本研究は PAH 病態重症化における IL-6/IL-21 シグナルの役割を解明することを目的として行った。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムによる IL-6KO ラットと IL-21RKO ラットの作製
CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-6KO ラットと IL-21RKO ラットを作製した。

CRISPR/Su/Hx/Nor モデルにおける野生型 (WT) ラットと KO ラットでの PAH 表現型の比較・検討

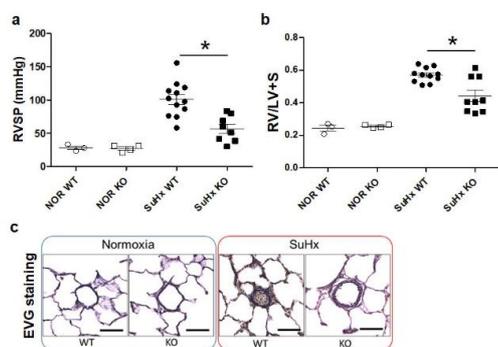
ヒトの重症 PAH 患者では、病理学的に中膜肥厚だけでなく、内膜増殖病変・叢状病変のような亜閉塞性 / 閉塞性の病理像が見られる。ヒト重症 PAH に酷似する病理像と病態を呈するモデル動物として、Sugen5416 /Hypoxia/Normoxia (Su/Hx/Nor) ラットがある [4]。Su/Hx/Nor モデルは VEGFR2 阻害薬 (Su) を皮下注後、ラットを 3 週間低酸素曝露 (Hx; 10%O₂) して、更に 5 週間正酸素曝露 (Nor; 21%O₂) することで、RVSP が体血圧を凌駕するレベルまでに上昇して、病理学的にも叢状病変や新生内膜増殖などの病理像を誘導すると報告されている (Abe *et al. Circulation*. 2010;121(25):2747-54)。Su/Hx/Nor モデルラットを WT と IL-6KO および IL-21RKO ラットで計 8 週間の負荷により作製して、イソフルラン

麻酔と人工呼吸器管理下で頸静脈アプローチによる右心カテーテル実験を施行して血行動態測定 (RVSP 測定など)を行った。右心カテーテル終了後に、心臓や肺などの組織を採取して右心室/左心室 + 心室中隔重量比 (Fulton 比) を算出して、さらに肺組織標本を作製後に肺小動脈リモデリングを評価した。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 システムによる IL-6KO、IL-21RKO ラットの作製：CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-6KO ラット、IL-21RKO ラットを作製した。IL-6KO については、LPS 腹腔内投与後の IL-6 発現誘導の有無を ELISA にて確認して、IL-21RKO については肺組織での IL-21R 蛋白質発現の欠損をウェスタンブロットによって確認して遺伝子欠損の確認を行った。

Su/Hx/Nor モデルにおける野生型 (WT) ラットと KO ラットでの PAH 表現型の比較・検討：まず、野生型ラットで Su/Hx/Nor モデルを計 8 週間かけて作製した後、右心カテーテルによる血行動態測定を施行して、更に右心肥大の程度と肺血管リモデリングの評価を行った。その結果、既報 (*Circulation*. 2010;121(25):2747-54) の通りに血行動態的には RVSP が 100mmHg を超えるレベルの重症 PAH 病態を呈して、組織学的には新生内膜病変や叢



状病変を遠位肺小動脈レベル、細小動脈レベルで認めた。一方、本研究で作製した IL-6KO ラット、IL-21RKO ラットで Su/Hx/Nor モデルを作製すると、野生型ラットと比して KO ラットでは Su/Hx/Nor 負荷を血行動態での RVSP の有意な改善、組織学的所見の有意な改善が見られた (図 2)。

Su/Hx/Nor モデルの各ラット群の肺から単離した細胞集団を用いて FACS 解析を詳細に行い、PAH 病態形成機構を今後明らかにする。

図 2. Su/Hx/Nor 重症 PAH モデルにおいて IL-6/IL-21 シグナルは重要な役割を担う。

- 右室収縮期圧 (RVSP) は KO ラットでは野生型より有意に低下していた。
* $P < 0.05$ (ANOVA 解析による)。
- 右室/左室 + 心室中隔重量比 (Fulton 比) は KO ラットでは野生型より有意に低下していた。
* $P < 0.05$ (ANOVA 解析による)。
- Elastica van Gieson 染色による肺血管リモデリングの検討。(Bar = 50µm)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

- Park HS, Kim HZ, Park JS, Lee J, Lee SP, Kim H, Ahn CW, Nakaoka Y, Koh GY, Kang S. Beta Cell-Derived Angiotensin-1 Regulates Insulin Secretion and Glucose Homeostasis by Stabilizing Islet Microenvironment. *Diabetes*. 2019 Feb 6. pii: db180864. doi: 10.2337/db18-0864. [Epub ahead of print] (査読有)
- Terao C, Yoshifuji H, Matsumura T, Naruse TK, Ishii T, Nakaoka Y, Kirino Y, Matsuo K, Origuchi T, Shimizu M, Maejima Y, Amiya E, Tamura N, Kawaguchi T, Takahashi M, Setoh K, Ohmura K, Watanabe R, Horita T, Atsumi T, Matsukura M, Miyata T, Kochi Y, Suda T, Tanemoto K, Meguro A, Okada Y, Ogimoto A, Yamamoto M, Takahashi H, Nakayama S, Saito K, Kuwana M, Mizuki N, Tabara Y, Ueda A, Komuro I, Kimura A, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Genetic determinants and an epistasis of *LILRA3* and HLA-B*52 in Takayasu arteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Dec 18;115(51):13045-13050. doi: 10.1073/pnas.1808850115. Epub 2018 Nov 29. (査読有)
- Kim KH, Nakaoka Y, Augustin HG, Koh GY. Myocardial Angiotensin-1 Controls Atrial Chamber Morphogenesis by Spatiotemporal Degradation of Cardiac Jelly. *Cell Reports*, 23, 2455-2466, May 22, 2018 (査読有)
- Nakaoka Y*. Response to: 'Aortic ulceration in a tocilizumab-treated patient with Takayasu arteritis' by Liebling *et al Ann Rheum Dis*. Feb 2018, *annrheumdis-2018-214239*; DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-214239 (査読有)
- Nakaoka Y*. Response to: 'Efficacy and safety of tocilizumab in patients with refractory Takayasu arteritis' by Lee and Song. *Ann Rheum Dis*. 2018 Feb 10. *annrheumdis-2017-212871*; DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-212871 (査読有)
- Nakaoka Y*, Isobe M, Takei S, Tanaka Y, Ishii T, Yokota S, Nomura A, Yoshida S, Nishimoto N. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with refractory Takayasu arteritis: results from a

- randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial in Japan (the TAKT study). *Ann Rheum Dis.* 2018 Mar; 77(3):348-354. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211878. Epub 2017 Nov 30. (*corresponding author) (査読有)
7. 中岡良和. 高安動脈炎と巨細胞性動脈炎. *日本臨牀.* 77(3), 522-530, 2019
 8. 中岡良和. 心筋 内皮細胞間クロストークによる心臓の発生・恒常性維持の制御機構 - Neuregulin-1/ErbB シグナルを中心に. *実験医学.* 37(5), 751-758, 2019
 9. 中岡良和. 高安動脈炎の治療(TAKT 試験結果を含めて). *日本臨牀.* 76(Suppl. 6), 112-119, 2018 (査読無)
 10. 中岡良和. 心不全の分子機序、炎症、サイトカイン. *日本臨牀.* 76(Suppl. 9), 162-168, 2018 (査読無)
 11. 中岡良和. 大型血管炎の治療ガイドライン (高安動脈炎、巨細胞性動脈炎). *炎症と免疫.* 26(1), 25-32, 2018 (査読無)
 12. 中岡良和. トシリズマブによる大型血管炎 (高安動脈炎・巨細胞性動脈炎) の治療. *リウマチ科.* 59(4), 427-433, 2018 (査読無)
 13. 中岡良和. 高安動脈炎におけるトシリズマブの使い方と注意点. *リウマチ科.* 60(2), 139-148, 2018 (査読無)
 14. 中岡良和. 抗腫瘍薬 (チロシンキナーゼ阻害薬) による心血管障害. *循環器内科.* 83(6), 565-572, 2018 (査読無)
 15. 中岡良和. 高安動脈炎. *日本医師会雑誌(生涯教育シリーズ 92 脳血管障害診療のエッセンス)* 141(Suppl. 1), S218-220, 2017 (査読無)
 16. Yasui T, Masaki T, Arita Y, Ishibashi T, Inagaki T, Okazawa M, Oka T, Shioyama W, Yamauchi-Takahara K, Komuro I, Sakata Y, Nakaoka Y. Molecular Characterization of Striated Muscle-specific Gab1 Isoform as a Critical Signal Transducer for Neuregulin-1/ErbB Signaling in Cardiomyocytes. *PLoS One.* 2016 Nov 18;11(11):e0166710. doi: 10.1371/journal.pone.0166710 (査読有)
 17. Wang Q, Oka T, Yamagami K, Lee JK, Akazawa H, Naito AT, Yasui T, Ishizu T, Nakaoka Y, Sakata Y, Komuro I. An EP4 Receptor Agonist Inhibits Cardiac Fibrosis Through Activation of PKA Signaling in Hypertrophied Heart. *Int Heart J.* 2017 Feb 7;58(1):107-114. doi: 10.1536/ihj.16-200. Epub 2016 Nov 9. (査読有)
 18. Han S, Lee SJ, Kim KE, Lee HS, Oh N, Park I, Ko E, Oh SJ, Lee YS, Kim D, Lee S, Lee DH, Lee KH, Chae SY, Lee JH, Kim SJ, Kim HC, Kim S, Kim SH, Kim C, Nakaoka Y, He Y, Augustin HG, Hu J, Song PH, Kim YI, Kim P, Kim I, Koh GY. Amelioration of sepsis by TIE2 activation-induced vascular protection. *Sci Transl Med.* 2016 Apr 20;8(335):335ra55. doi: 10.1126/scitranslmed.aad9260.9. (査読有)
 19. Furuta K, Yoshida Y, Ogura S, Kurahashi T, Kizu T, Maeda S, Egawa M, Chatani N, Nishida K, Nakaoka Y, Kiso S, Kamada Y, Takehara T. Gab1 adaptor protein acts as a gatekeeper to balance hepatocyte death and proliferation during acetaminophen-induced liver injury in mice. *Hepatology.* 2016 Apr;63(4):1340-55. doi: 10.1002/hep.28410. Epub 2016 Jan 22. (査読有)
 20. 中岡良和. 大型血管炎に対する薬物療法. *医学のあゆみ.* 257, 319-321, 2016 (査読無)
 21. 中岡良和、有田陽. 冠動脈と冠静脈の形成機序の違い. *日本臨牀 (増刊号: 最新冠動脈疾患学(上))* 74(suppl.4), 67-73, 2016 (査読無)
 22. 中岡良和. 高安動脈炎. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科 (増刊号・耳鼻咽喉科処方マニュアル)* 88(5), 187-189, 2016 (査読無)
 23. 中岡良和. IL-6 抗体医薬による大型血管炎の治療. *循環器内科.* 80 (4); 296-303, 2016 (査読無)

[学会発表](計 21 件)

1. 中岡良和. 炎症性サイトカインの肺高血圧症病態での役割. シンポジウム 23. 第 92 回日本薬理学会 (大阪) 2019 年 3 月 16 日
2. Nakaoka Y. Novel Treatment Strategy for Large Vessel Vasculitis Using Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody. シンポジウム 3. Diagnosis and Management of Large Vessel Vasculitis: 2018-2019 Update. 第 83 回日本循環器学会 (横浜) 2019 年 3 月 29 日
3. Nakaoka Y. Novel Therapeutic Strategy for Takayasu Arteritis and Giant Cell Arteritis via Interleukin-6 Blockade. Special Session 11. Molecular Targeted Therapy against Cardiovascular Diseases. 第 83 回日本循環器学会 (横浜) 2019 年 3 月 29 日
4. 中岡良和. 大型血管炎 (高安動脈炎・巨細胞性動脈炎) に対する生物学的製剤治療の新展開. 特別企画 04 「大型血管炎治療の最前線」第 49 回日本心臓血管外科学会学術総会 (岡山), 2019 年 2 月 11 日
5. 中岡良和. Interleukin-6/Interleukin-21 Signaling Axis in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. シンポジウム 6 (PAH) 第 22 回日本心不全学会 (東京) 2018 年 10 月 11 日
6. Nakaoka Y. Interleukin-6 Blockade Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension and Large Vessel Vasculitis. 第 2 回日本循環器学会基礎研究フォーラム (奈良), 2018 年 9 月 23 日
7. 中岡良和. 肺高血圧も来す高安動脈炎 Up to date. 第 3 回日本肺高血圧・肺循環学会学術

- 集会 (大阪), 2018 年 6 月 23 日
8. 中岡良和. 大型血管炎に対する生物学的製剤治療. 特別企画シンポジウム 4. 第 62 回日本リウマチ学会 (東京), 2018 年 4 月 28 日
 9. 中岡良和. Novel Treatment for Large Vessel Vasculitis Targeting Inflammatory Cytokine Signaling. 会長特別企画「新しい時代を迎える大型血管炎の診断・治療の最前線」, 大阪国際会議場 (大阪), 2018 年 3 月 25 日
 10. 中岡良和. ステロイド治療抵抗性大型血管炎の治療. シンポジウム 6「膠原病の難治性病変」第 32 回日本臨床リウマチ学会, 神戸ポートピアホテル (神戸), 2017 年 12 月 3 日
 11. 中岡良和. 高安動脈炎と巨細胞性動脈炎の病態と治療. 第 22 回日本血管病理研究会, 東邦大学医療センター大橋病院教育棟 (東京), 2017 年 11 月 11 日
 12. Nakaoka Y, Isobe M, Takei S, Tanaka Y, Ishii T, Yokota S, Nishimoto N. Long-Term Efficacy and Safety of Tocilizumab in Patients with Refractory Takayasu Arteritis Treated Continuously Over 52 Weeks: Results from Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial and Open-Label Extension in Japan. American College of Rheumatology 2017 (ACR2017), San Diego (米国). Nov 5th, 2017
 13. 中岡良和. 大型血管炎の診療ガイドライン, 特別企画シンポジウム「血管炎治療のガイドラインを考える」. 第 61 回日本リウマチ学会総会学術集会, 福岡, 2017 年 4 月 20 日
 14. 中岡良和. 肺高血圧症における Interleukin-6/interleukin-21 シグナル軸の役割. 第 94 回日本生理学会大会シンポジウム 24「循環器疾患における神経・炎症・代謝性機序の関わりと重要性」. アクトシティ浜松 (静岡). 2017 年 3 月 29 日
 15. Nakaoka, Y. "Update on Large Vessel Vasculitis". The 18th International Vasculitis & ANCA Workshop in Tokyo. Evening seminar The University of Tokyo. Ito International Research Center (東京). March 26, 2017.
 16. 中岡良和. Interleukin-6/interleukin-21-signaling axis plays a critical role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. 第 24 回日本血管生物医学会総会シンポジウム. 長崎ブリックホール (長崎). 2016 年 12 月 10 日
 17. 中岡良和. 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム. Critical roles of interleukin-6/interleukin-21-signaling axis in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. パシフィコ横浜 (横浜), 2016 年 11 月 30 日
 18. Nakaoka, Y. et al. American College of Rheumatology (ACR) 2016 Oral presentation; Efficacy and Safety of Tocilizumab in patients with refractory Takayasu Arteritis: Results from randomized, double-blind placebo-controlled trial in Japan. ワシントン DC (米国), 2016 年 11 月 13 日
 19. 中岡良和. 炎症性シグナルに焦点を当てた肺高血圧の病態形成機構. 第 1 回日本肺高血圧・肺循環学会総会・学術集会シンポジウム. 京王プラザホテル (東京), 2016 年 10 月 2 日
 20. 中岡良和. 第 2 回 J-ISCIP(日本薬物療法学会) 学術集会. 炎症性サイトカインによる肺高血圧症の病態形成機構. 阿波観光ホテル (徳島). 2016 年 6 月 26 日
 21. 中岡良和. 大型血管炎の診療ガイドライン. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム. パシフィコ横浜 (横浜), 2016 年 4 月 21 日

〔図書〕(計 2 件)

1. 中岡良和. 日本医学出版、臨床脈管学 (編集: 日本脈管学会) 高安動脈炎. p.311-315、2017 年 12 月 30 日
2. 中岡良和. メディカルレビュー社、腫瘍循環器ガイド Onco-cardiology. (堀正二・淡田修久編) チロシンキナーゼ阻害薬による心血管障害. p.56-62、2018 年 10 月 10 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称: 肺高血圧症治療薬およびそのスクリーニング方法

発明者: 中岡良和、片岡崇弘

権利者: 中岡良和

種類: 特許

番号: 特許第 6359921 号

出願年: 平成 26 年

取得年: 平成 30 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/vascular_physiology/

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：白井幹康

ローマ字氏名：MIKIYASU SHIRAI