

令和元年6月20日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16033

研究課題名(和文)炎症による内皮機能障害を背景とする肺高血圧病態の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a treatment for pulmonary arterial hypertension focusing on inflammatory endothelial dysfunction

研究代表者

稲垣 薫克 (Inagaki, Tadakatsu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：20638366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺動脈性肺高血圧症(PAH)において、PAHの発症ならびに右心不全の発症には肺および冠動脈血管における炎症性内皮機能障害が関与しているという仮説を重症PAHモデル(SuHx)を用いて検証した。SuHxラットでは右冠動脈の血管機能低下がみられたが、エンドセリン受容体拮抗薬による治療により有意に改善した。また、CRISPR/Cas9の系で作成したIL-6ノックアウト(KO)ラットではSuHxモデルのPAH病態が著明に改善することを見出した。以上のことから、右心不全の発症には冠動脈の内皮機能障害が関与し、炎症シグナル阻害が難治性PAHに対する有望な新規治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では肺高血圧症における肺血管リモデリングおよび右冠動脈の異常収縮には炎症を背景とする血管内皮機能障害が関与するかについて、肺高血圧症における炎症性シグナルの分子機序から明らかにすることを目的とし、既存の治療薬に適応しない重症疾患患者に対する新たな治療法の確立を目指すものであった。本研究により、IL-6阻害がこれまでの既存の薬剤に適応しない重症肺高血圧症患者に対して右心不全の予防や予後改善にまで発展する可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the severe PAH model (SuHx) to test the hypothesis that the onset of PAH and right heart failure involve inflammatory endothelial dysfunction in the lung and coronary blood vessels. In SuHx rats, Endothelium-dependent vasodilator responses were significantly attenuated in the middle and small arteries in the right coronary artery of SuHx rats. Endothelin receptor antagonist treatment recovered the endothelium-dependent vasodilator responses, improved the inflammatory state of the right ventricle and restored cardiac function. We also created IL-6 knockout (KO) rats using CRISPR/Cas9 genome editing. IL-6KO rats showed significant resistance to PAH. These results suggest that endothelial dysfunction of coronary arteries is involved in the onset of right heart failure, and that inhibition of inflammatory signals may be a promising new treatment for refractory PAH.

研究分野：生理学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 肺血管リモデリング 右心不全 Interleukin-6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は予後不良の疾患であり、その病態は肺動脈の攣縮と器質的病変に由来し、肺動脈病変は血管構成細胞の異常増殖をともなう血管リモデリングにより形成され、肺血管床の低下を引き起こすことにより右心不全と重篤な低酸素血症が死因となる。肺血管リモデリングには、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞などの構成細胞の増殖を制御するさまざまな増殖因子やサイトカイン、およびそれらの情報伝達系異常が関与していると考えられている。近年、炎症性サイトカインの Interleukin-6 (IL-6)を肺胞上皮特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスが PAH を自然発症することや (ref 1)、PAH 患者の血清中で IL-6 が高値の場合は、予後が悪化することが報告されている (ref 2)。申請者らはこれまでに、低酸素性肺高血圧 (HPH) マウスモデルを用いて、肺の微小循環における IL-6 シグナル阻害が PAH 病態形成を抑制することを示してきた (ref 3)。HPH マウスモデルは重症肺高血圧症患者にみられる肺血管内皮の異常増殖といった病変を形成せず、中膜の肥厚のみを呈する比較的軽度から中等度の PAH モデルである。これに対し、血管内皮細胞増殖因子阻害剤 (Su5416) と低酸素負荷を用いることにより、ヒト肺高血圧症に類似した肺血管の内膜肥厚や叢状病変を呈する SuHx ラットモデルが開発された (ref 4)。しかしながら、肺血管リモデリングおよび右心不全発症における炎症性シグナルの関与について、この重症 PAH モデルを用いた検討はなされておらず、PAH の重症化および右心不全の発症における炎症シグナルの役割については不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、PAH の発症、ならびに肺高血圧に続発する右心不全の発症には肺および冠動脈血管における炎症性内皮機能障害が関与しているという仮説を検証するため、炎症シグナル阻害やエンドセリン受容体拮抗薬による PAH の治療によって、肺および冠動脈の機能障害を改善する可能性を明らかにすることを目的とした。目的達成のために、重症 PAH モデル (SuHx) ラットを対象に、1) 微小血管造影法による血管機能評価および血管内皮機能関連因子の分子生物学的評価をおこなうことにより、肺血管リモデリングおよび右心不全発症における炎症性シグナルの分子機序について検討し、2) PAH 治療薬の投与や炎症シグナル阻害をおこなうことにより、PAH 病態が改善するのかについての検討をおこなった。

3. 研究の方法

1) 重症肺高血圧症モデルラットでの肺および右心室における炎症性内皮機能障害の評価

SuHx ラットモデルにおける肺高血圧病態の評価

SD ラット (雄、6-8 週齢) を正常群、および SuHx 群に分け、SuHx 群は VEGFR2 阻害薬である Su5416 をラットに単回皮下投与 (20 mg/kg) した後に 3 週間低酸素 (10%O₂) に曝露して、その後 5 週間正酸素に戻した後に、それぞれ血行動態解析および組織学的解析により肺高血圧病態の評価をおこなった。

SuHx ラットモデルにおける右冠動脈血管機能評価

放射光実験施設 SPring-8 での微小血管造影法 (ref 5) による右冠動脈の in vivo 血管機能評価を上記の正常群および SuHx 群においておこなった。

2) 炎症性シグナルの阻害による肺高血圧の新規治療法の開発

PAH 病態と内皮機能連関における ET-1 受容体拮抗薬 (ERA) の効果の検討

正常ラットおよび SuHx 処置したラットに対して、vehicle 群、ERA のマシテンタン投与群をそれぞれ作製した。上記のように作成した SuHx ラットを薬剤投与 5 週目で無作為に 2 群に分け、マシテンタン (30mg/kg/day) または vehicle の混餌食を 3 週間投与した。モデル作成から 8 週後に血行動態解析、組織学的解析を行って、PAH 病態形成を比較検討した。また、ERA 処置が右冠動脈血管機能に及ぼす影響について上記 (1) - と同様の評価をおこなった。

炎症性シグナル阻害による PAH の新規治療法の開発に向けた検討

CRISPR/Cas9 の系によるゲノム編集技術を用いて IL-6KO ラットを作成して、重症肺高血圧ラットモデルを適用し、肺高血圧病態における炎症性サイトカインシグナル阻害の影響を検討した。

4. 研究成果

1) 重症肺高血圧症モデルラットでの肺および右心室における炎症性内皮機能障害の評価

SuHx ラットモデルにおける肺高血圧病態の評価

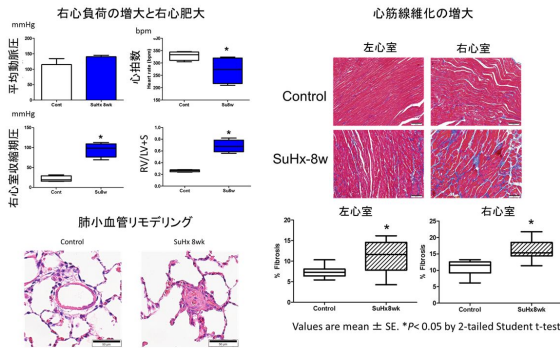


図1. SuHxモデルにおける肺高血圧病態の評価
SuHxモデルでは肺血管において内膜肥厚による血管閉塞が生じ右心室後負荷が体血圧レベルにまで増加する事が確認された。

初めに、SuHx ラットモデルの作成と肺高血圧病態の解析を血行動態および肺・心臓における組織化学的解析により行った(図1)。その結果、先行研究の結果と一致して(ref 6)モデル作成の5週後では血管の内膜病変が顕著に生じ、8週後では叢状病変に良く似た血管病変が出現することが確認された。次に、PV-loop解析による右心機能の評価を行った。その結果、SuHx ラットにおいて右心特異的な機能低下が右心室駆出率の低下、右心室拡張時間の延長から明らかとなった(図2)。

次に、肺血管病変の形成に炎症細胞が関与していることを明らかにするため、まず始めにモデル作成8週後の肺における炎症細胞動態の検討をFACSにより行ったが、市販されているラットに対する抗体の種類が少ないといった問題から、SuHxモデルで特異的に増加する細胞を見出すことはできなかった。そのため、qRT-PCRによる細胞種特異的な遺伝子発現の解析をおこなった。その結果、SuHx群の肺では内膜病変が形成され始めるモデル作成から5週以降に免疫細胞関連遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった(図3)。

SuHx ラットモデルにおける右冠動脈血管機能評価

SPRing-8での右冠動脈造影により、SuHxラットではアセチルコリンや一酸化窒素依存性の血管拡張応答が、特に末梢血管において有意に減弱することが明らかとなった(図4)。本研究の結果から、重度肺高血圧患者の右心不全発症には右冠動脈血管拡張機能の低下が関与する事が示唆された。

2) 炎症性シグナルの阻害による肺高血圧の新規治療法の開発

PAH病態と内皮機能連関におけるET-1受容体拮抗薬(ERA)の効果の検討

エンドセリン-1(ET-1)は肺をはじめとする全身の臓器に発現し、血管内皮細胞や炎症細胞などから分泌され、PAH病態に関与することがよく知られている(ref 7)。近年のSERAPHIN研究では、新規ERA治療薬のマシテンタンがイベントと死亡を主要エンドポイントとした長期試験において、はじめてPAHの予後を改善する事が示された(ref 8)。そこでSuHxモデルにおけるマシテンタンの治療効果について、肺高血圧病態、右心機能、右冠動脈血管機能および右心室における炎症関連遺伝子発現に着

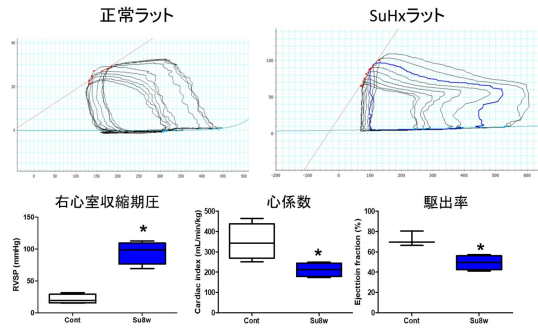


図2. SuHxラットにおける右心機能評価
SuHxモデルでは右心室収縮期圧の著明な増加、心係数の低下、駆出率の低下といった右心機能の有意な低下が確認された。

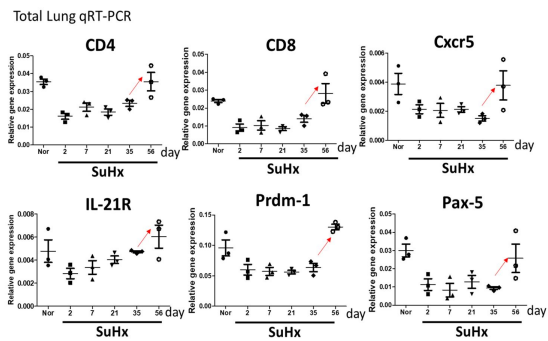


図3. SuHxモデル作成の5週以降の内膜病変形成過程で免疫細胞関連遺伝子発現が肺で増加する。

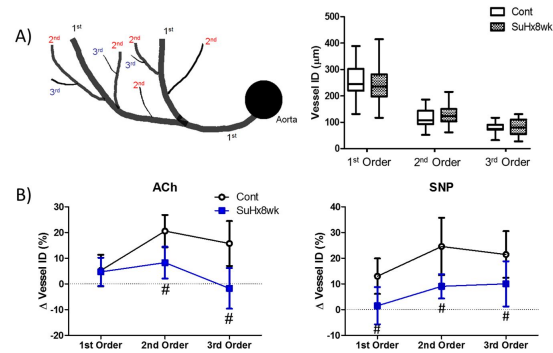


図4. SuHxラットにおける右冠動脈血管造影による血管機能評価
ラット右冠動脈分岐における血管径の分布(A)。アセチルコリン(ACh)およびニトロプルシドナトリウム(SNP)による血管拡張機能評価(B)。

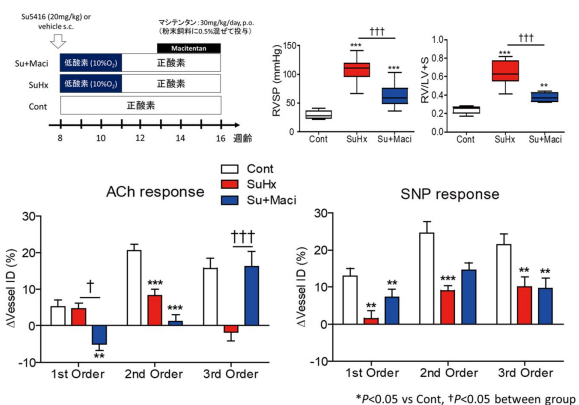


図5. ERAによるSuHxラットの肺高血圧病態改善効果
3週間のマシテンタン投与により、SuHxラットの肺高血圧病態が有意に改善し、右冠動脈における内皮依存的血管拡張応答も末梢血管において有意に回復した。

目して検討をおこなった。

その結果、3週間のマシテンタン投与により、SuHxモデルのPAH病態が著明に改善した(図5)。またMRIによる右心機能評価において、SuHxラットでは右心室駆出率の有意な低下が観察されたが、マシテンタン投与群では正常レベルまで有意に回復した。さらに、右冠動脈造影実験の結果から、SuHxラットで観察された内皮依存性および非依存性血管拡張機能の低下が、治療により末梢動脈において内皮依存性血管拡張機能の有意な改善がみられた(図5)。

また、SuHxラットの右心室におけるIL-6やVCAM-1などの炎症関連遺伝子発現の上昇においても、治療により正常レベルまで回復することが明らかとなった。

以上のことから、エンドセリン受容体拮抗薬によるPAH治療により、冠動脈の血管拡張機能が回復することにより、右心機能の低下が抑制できる可能性が示唆された。

炎症性シグナル阻害によるPAHの新規治療法の開発に向けた検討

炎症シグナルの一つであるIL-6が肺高血圧病態形成に与るかを明らかにするため、CRISPR/Cas9の系でIL-6KOラットを作成した。作成したラットに対しLPSを腹腔内投与し、4時間後に採血および肺組織を採取した。ELISAによる血中IL-6濃度の検討および肺組織のStat3のリン酸化の検討をWestern Blottingにより行い、IL-6の欠損を明らかにした(図6)。作成したIL-6KOラットにおいて、SuHxモデルのPAH病態が抑制されるかについての検討を現在も継続しておこなっており、現在までにPAHの発症およびその重症化にはIL-6が関与し、IL-6阻害がPAHの新規治療法として期待できることが示唆されている。

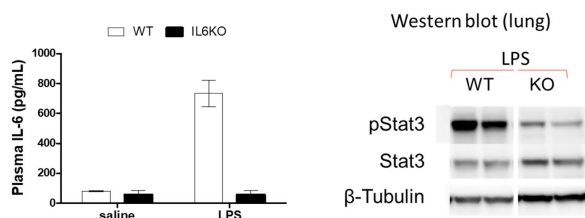


図6. IL-6KOラットにおけるLPS誘発IL-6シグナルの欠損

作成したIL-6KOラットにおいて、SuHxモデルのPAH病態が抑制されるかについての検討を現在も継続しておこなっており、現在までにPAHの発症およびその重症化にはIL-6が関与し、IL-6阻害がPAHの新規治療法として期待できることが示唆されている。

<引用文献>

1. Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2009 Jan 30;104(2):236-44.
2. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010 Aug 31;122(9):920-7.
3. Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawa S, Sawa Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata Y, Nakaoka Y. Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 19;112(20):E2677-86.
4. Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, Voelkel NF, McMurtry IF. Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res*. 2007 Mar 30;100(6):923-9.
5. Chen YC, Inagaki T, Fujii Y, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Edgley AJ, Umetani K, Zhang Y, Kelly DJ, Yoshimoto M, Nagai H, Evans RG, Kuwahira I, Shirai M, Pearson JT. Chronic intermittent hypoxia accelerates coronary microcirculatory dysfunction in insulin resistant Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016 Aug 1;311(2):R426-39.
6. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010 Jun 29;121(25):2747-54.
7. Miyagawa K, Emoto N. Current state of endothelin receptor antagonism in hypertension and pulmonary hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2014 Oct;8(5):202-16.
8. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, Jansa P, Jing ZC, Le Brun FO, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BK, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G; SERAPHIN Investigators. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013 Aug 29;369(9):809-18.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

1. Takeshita H, Yamamoto K, Nozato S, Takeda M, Fukada S, Inagaki T, Tsuchimochi H, Shirai M, Nozato Y, Fujimoto T, Imaizumi Y, Yokoyama S, Nagasawa M, Hamano G, Hongyo

- K, Kawai T, Hanasaki-Yamamoto H, Takeda S, Takahashi T, Akasaka H, Itoh N, Takami Y, Takeya Y, Sugimoto K, Nakagami H, Rakugi H. Angiotensin-converting enzyme 2 deficiency accelerates and angiotensin 1-7 restores age-related muscle weakness in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 査読有, 2018 Oct;9(5):975-986. Doi:10.1002/jcsm.12334
2. Pearson JT, Collie N, Lamberts RR, Inagaki T, Yoshimoto M, Umetani K, Davis P, Wilkins G, Jones PP, Shirai M, Schwenke DO. Ghrelin Preserves Ischemia-Induced Vasodilation of Male Rat Coronary Vessels Following α -Adrenergic Receptor Blockade. *Endocrinology*. 査読有, 2018 Apr 1;159(4):1763-1773. Doi:10.1210/en.2017-03070
 3. Pearson JT, Yoshimoto M, Chen YC, Sultani R, Edgley AJ, Nakaoka H, Nishida M, Umetani K, Waddingham MT, Jin HL, Zhang Y, Kelly DJ, Schwenke DO, Inagaki T, Tsuchimochi H, Komuro I, Yamashita S, Shirai M. Widespread Coronary Dysfunction in the Absence of HDL Receptor SR-B1 in an Ischemic Cardiomyopathy Mouse Model. *Sci Rep*. 査読有, 2017 Dec 22;7(1):18108. Doi: 10.1038/s41598-017-18485-6.
 4. Torii M, Fukui T, Inoue M, Kanao S, Umetani K, Shirai M, Inagaki T, Tsuchimochi H, Pearson JT, Toi M. Analysis of the microvascular morphology and hemodynamics of breast cancer in mice using SPring-8 synchrotron radiation microangiography. *J Synchrotron Radiat*. 査読有, 2017 Sep 1;24(Pt 5):1039-1047. Doi:10.1107/S1600577517008372.
 5. Takeshita H, Yamamoto K, Nozato S, Inagaki T, Tsuchimochi H, Shirai M, Yamamoto R, Imaizumi Y, Hongyo K, Yokoyama S, Takeda M, Oguro R, Takami Y, Itoh N, Takeya Y, Sugimoto K, Fukada SI, Rakugi H. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Sci Rep*. 査読有, 2017 Feb 8;7:42323. Doi: 10.1038/srep42323
 6. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Inagaki T, Shishido T, Shirai M, Pearson JT. Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有, 2017 Jan 1;312(1):H60-H67. Doi:10.1152/ajpheart.00471.2016.

[学会発表](計 15件)

1. Inagaki T, Ogo T, Nakaoka Y. Critical Roles of Interleukin-6/Interleukin-21-Signaling Axis in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. 第83回日本循環器学会学術集会, 2019.
2. Inagaki T, Nakaoka Y. Macitentan reverses impaired coronary vasodilator function in severe pulmonary hypertensive rats. the23rd Annual Scientific Meeting of International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy, 2018.
3. 中岡 良和、稲垣 薫克. 炎症性サイトカインの肺高血圧症病態における役割. 第3回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会, 2018.
4. 稲垣 薫克、森 啓悦、中岡 良和. 肺高血圧症での冠動脈内皮機能障害はマシテンタンで改善される. 第3回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会, 2018.
5. 森 啓悦、稲垣 薫克、石橋 知彦、岡澤 慎、正木 豪、中岡 良和. プリスタンを用いた新しい膠原病性肺高血圧症モデル作製の試み. 第3回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会, 2018.
6. Ishibashi T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y. Cre-mediated recombination in hematopoietic lineage cells of smooth muscle cell-specific targeted Cre mice. The16 Korea - Japan Joint Symposium on Vasucular Biology. 2018.
7. Okazawa M, Inagaki T, Ishibashi T, Masaki T, Mori H, Asano R, Nakaoka Y. TrkB might have a role for right ventricular homeostasis under chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム, 2018.
8. Ishibashi T, Inagaki T, Mori H, Masaki T, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y. Cre expression in hematopoietic cells of smooth muscle cell-targeted Cre recombination mice. 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム, 2018.
9. Mori H, Inagaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Masaki T, Asano R, Nakaoka Y. Pristane might be useful for creating a novel model of CTD-PAH in mice. 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム, 2018.
10. 森 啓悦、稲垣 薫克、石橋 知彦、岡澤 慎、正木 豪、浅野 遼太郎、熊ノ郷 淳、中岡 良和. A novel mouse model of PAH reflecting inflammation and fibrosis. 第23回日本血管病理研究会, 2018.
11. Inagaki T, Tsuchimochi H, Pearson JT, Mori H, Schwenke DO, Umetani K, Shirai M, Nakaoka Y. Macitentan reverses impaired right coronary vasodilative function in SuHx rat. 第1回日本循環器学会基礎研究フォーラム, 2018.
12. Inagaki T, Tsuchimochi H, Pearson JT, Mori H, Schwenke DO, Umetani K, Shirai M, Nakaoka Y. Macitentan reverses impaired right coronary vasodilative function in SuHx

- rat model of severe pulmonary arterial hypertension. 第 82 回日本循環器学会学術集会, 2018.
13. Inagaki T, Tsuchimochi H, Pearson JT, Mori H, Schwenke DO, Umetani K, Shirai M, Nakaoka Y. Macitentan treatment ameliorate impaired right coronary vasodilative function in SuHx rat model of severe pulmonary arterial hypertension. 第 95 回日本生理学会大会, 2018.
14. 稲垣 薫克、土持 裕胤、Pearson James、梅谷 啓二、白井 幹康、中岡 良和. 肺高血圧による右心不全には右冠動脈血管機能低下が関与する. Molecular Cardiovascular Metabolic Conference 2017, 2017.
15. Inagaki T, Tsuchimochi H, Pearson JT, Schwenke DO, Umetani K, Shirai M, Nakaoka Y. Impaired right coronary vasodilative function in pulmonary hypertensive rat assessed by in vivo synchrotron microangiography. The 8th TAKAO International Symposium, 2017.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：正木 豪、森 啓悦、福島 康江.

ローマ字氏名：Takeshi Masaki, Hiroyoshi Mori, Yasue Fukushima.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。