

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17903

研究課題名(和文)肺高血圧症・強皮症の血管障害における、Rhoキナーゼ、BMP9/10の相互作用

研究課題名(英文) Interaction between BMP9/10 and Rho kinase in vascular abnormalities of scleroderma and pulmonary hypertension

研究代表者

遠山 哲夫 (TOYAMA, TETSUO)

国際医療福祉大学・国際医療福祉大学成田病院・講師

研究者番号：30757513

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)：GATA6を肺血管内皮細胞で欠失させると、マウスにおいて肺高血圧が誘導された。抗酸化タンパク質が減少するとともに、ミトコンドリア機能不全によりROSが産生され、酸化ストレスが亢進することが明らかになった。血管内皮細胞のGATA6発現低下は液性因子を介して、周辺の血管平滑筋細胞のGATA6の発現を低下させ、細胞の異常増殖を誘導することが示唆された。BMP10はGATA6発現を誘導するが、GATA6をノックダウンするとBMP10受容体の発現が低下した。血清BMP10濃度は全身性強皮症患者において健常人と比較して低下しており、また野生型マウスにおいて低酸素におかれるとBMP10産生が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は血管障害と皮膚および内臓の線維化、免疫異常を特徴とする自己免疫疾患であり、重症例では生命を脅かす場合も少なくない。しかし、現時点では全身性強皮症に対し十分な効果を持つ治療薬は未だなく、指定難病となっている。

本研究において、全身性強皮症患者の血清BMP10の低下が、GATA6の恒常的低下につながり、血管障害を引き起こしていることが示唆された。一方ファスジルは血管障害を改善する作用が示され、全身性強皮症の治療への大きな手掛かりとなりうる。

研究成果の概要(英文)：GATA6 deficiency in human pulmonary artery endothelial cells, which decreased antioxidants and affected mitochondrial function to increase ROS production, induced pulmonary hypertension in C57BL/6 mice, whose lungs were impaired by oxidative stress. GATA6 deficiency in vascular endothelial cells resulted in that in vascular smooth muscle cells via some humoral factors, which can account for aberrant cell proliferation of smooth muscle cells, resulting in muscularization of pulmonary arteries. BMP10 induces GATA6 expression, but in turn GATA6 expression modulated BMP10 receptor expression. Insufficient GATA6 expression deteriorated production of BMP10 receptor components like BMPR2, ActRIIB, ALK1, and endoglin. Serum BMP10 concentrations of patients with scleroderma was decreased compared to those of healthy controls. Right atrium of mice under hypoxia condition produced less amount of BMP10.

研究分野：全身性強皮症

キーワード：GATA6 BMP10 Fli1 ファスジル

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は血管障害と皮膚および内臓の線維化、免疫異常を特徴とする自己免疫疾患であり、重症例では生命を脅かす場合も少なくない。しかし、現時点では全身性強皮症に対し十分な効果を持つ治療薬は未だなく、指定難病となっている。申請者らは転写因子 Friend leukemia virus integration 1 (Fli1) の恒常的な発現低下が強皮症の線維化と血管障害、炎症・免疫異常の発症に関与している可能性を示してきた (Toyama T, et al. *Exp Dermatol*. 2017. など)。また申請者らは、転写因子 GATA6 が肺高血圧を有する全身性強皮症患者の肺の血管内皮細胞でその発現が低下していることを発見し、GATA6 血管内皮細胞特異的欠失マウスが肺高血圧を自然発症することを示した。これらの因子が相互に作用しあって全身性強皮症の病態を形成していることが推察されるが、その詳細は未だ不明である。

Bone morphogenetic protein 9/10 (BMP9/10)は TGF- β スーパーファミリーのひとつである。それぞれ肝臓、右心房から分泌されており、血管内皮細胞の恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられている。これらの受容体の一つである BMP receptor 2 (BMPR2)の遺伝子変異が家族性肺高血圧の原因であるということがわかっており、その変異をマウスモデルに導入することで、肺高血圧を再現することができる。申請者の予備実験において、BMP9/10の受容体と GATA6 の発現は相互に誘導しあっており、BMP9/10 と GATA6 は協調的に働いているという結果を得ている。これらの異常が全身性強皮症の病態に深く関与すると推察されるが、詳細は全く未知である。

低酸素条件下において、ラット、マウスなど各種肺高血圧モデルにおいて、肺高血圧の誘導が増強される。肺高血圧が進行すると、実際の患者においても低酸素状態におかれるため、実際の病態でも低酸素応答が重要な役割をになっていると考えられている。本研究において BMP10/GATA6 pathway において、低酸素が肺高血圧の病態形成についてどのような役割があるのかを検証する。

また、Rho キナーゼ阻害薬ファスジルのもつ全身性強皮症に対する疾患修飾薬への可能性を検討する。ファスジルは Rho キナーゼ阻害薬である。Rho キナーゼは F-アクチンの重合を促進することで、血管を収縮させるのみではなく、炎症性サイトカイン、TGF- β などの成長因子の発現を亢進させる。これらの知見から、ファスジルは、全身性強皮症に対する新たな治療薬になりうる可能性は十分あると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は全身性強皮症の病態において重要と考えられている Fli1、および BMP10/GATA6 がそれぞれどのように相互作用しているか解析し、ファスジルがこれらに対し疾患修飾的作用をもつかどうかを明らかにすることである。さらに低酸素応答が、肺高血圧症の病態に与える影響を検証する。全身性強皮症は線維化のみではなく、その背景に血管障害や免疫異常を伴っており、ファスジルがこれらを多面的に改善する可能性があるか、検討することが目的である。

3. 研究の方法

(1) GATA6 の発現を血管内皮細胞特異的にノックアウトさせた GATA6 ECKO マウスを用い、in vivo での GATA6 の欠損が酸化ストレスに及ぼす影響を検討した。In vitro では、ヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAEC) を用いて、GATA6 を、siRNA を用いたノックダウンを行い、ミトコンドリア機能の解析を行った。

(2) 肺高血圧合併全身性強皮症患者と特発性肺動脈性肺高血圧症の肺において、血管内皮細胞および、肺動脈血管平滑筋細胞での GATA6 の発現量を評価し、酸化ストレスを定量的に解析した。さらに、血管平滑筋細胞における GATA6 による遺伝子発現調節を検討するために、アデノウイルスを用いた形質転換を行い、RAN-sequence による解析を行った。血管平滑筋細胞の GATA6 の発現が、血管平滑筋細胞の調節を受けているかを検討するため、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞を共培養し、内皮細胞のみ GATA6 をノックダウンしたとき、血管平滑筋細胞での GATA6 発現がどのように変化するかも検討した。

(3) BMP10 が GATA6 をどのように発現誘導するのかを解析するため、BMP10 レセプターの構成要素である BMPR2、ActRIIB、エンドグリン、ALK1 を siRNA でノックダウンしたのちに、HPAEC を BMP10 で刺激し、GATA6 の発現を定量した。またこれら受容体の構成要素の発現自体が GATA6 で調節されているかどうかを確認するために、Chip アッセイを行った。また、GATA6 ECKO マウスにおける肺、肺動脈血管内皮細胞における受容体の発現を定量した。

(4) BMP10 の産生自体が全身性強皮症患者でどのように変化しているのかを ELISA を用いて解析した。

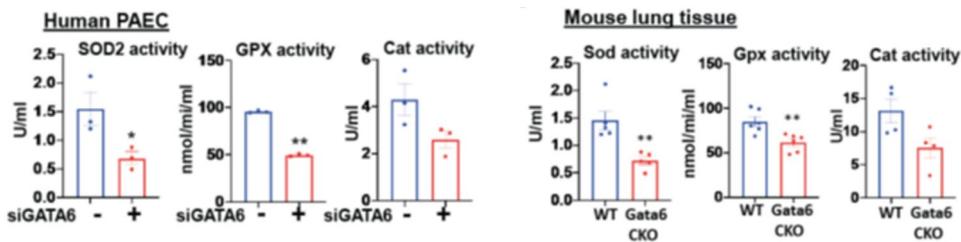
(5) 野生型マウス C57BL/6 において、10%低酸素条件下にて4週間飼育したのち、心臓、肺など組織を回収した。HPAEC は1%の低酸素チャンバーを用いて培養を行い、BMP10 にて刺激し、GATA6 の産生を RT-qPCR と western blotting にて測定した。

(6) 転写因子 Fli1 を血管内皮細胞特異的にノックアウトした Fli1 ECKO マウスを用いて、そ

の血管異常を検討した。マウス皮膚の血管構造を FITC-デキストランを尾静注することで可視化させ、評価した。血管透過性についてはマウスにエバンスブルーを尾静脈注し、マウス皮膚への血管周囲への染み出しを観察することで評価した。また、マウス皮膚の免疫染色を行った。マウス皮膚血管内皮細胞における血管リモデリングに関わる遺伝子発現を RT-qPCR を用いて定量的に解析した。

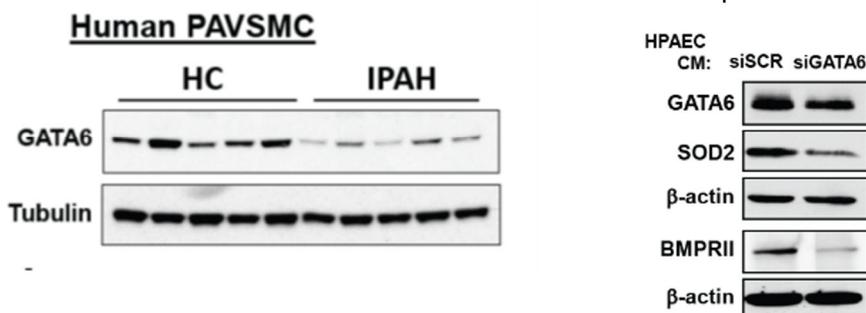
4. 研究成果

(1) 転写因子 GATA6 の欠損により、マウスモデルにおいて肺高血圧を呈することを示した。GATA6 は SOD や GPX1 などの抗酸化タンパク質遺伝子のプライマーに直接結合し、発現を制御していることを明らかにした。GATA6 の欠損による抗酸化タンパク質の発現低下により、SOD や GPX、カタラーゼの活性が下がり、酸化ストレスが引き起こされていることが明らかになった。また GATA6 の欠損によりミトコンドリアの ATP 産生やプロトンリークが低下するなど機能不全が引き起こされていることによって、ミトコンドリア由来の ROS が増加することも示された。



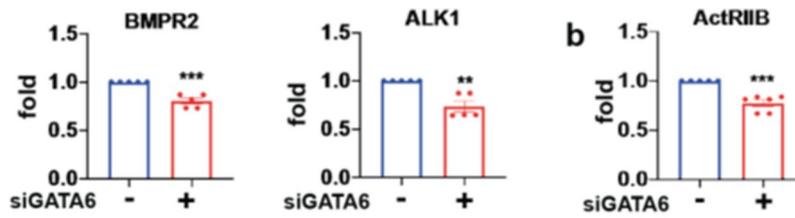
(2) 肺高血圧症合併全身性強皮症患者、および特発性肺動脈性肺高血圧症患者の肺では、血管内皮細胞とともに血管平滑筋細胞の GATA6 の発現が低下しており、それに伴い SOD2 を始めとする抗酸化タンパク質の発現も低下しており、そのため酸化ストレスが異常亢進していることが示された。さらに GATA6 は血管平滑筋細胞において増殖の抑制とアポトーシスを促していることが示された。特発性肺動脈性肺高血圧症患者由来の血管平滑筋細胞において、細胞増殖を促す PRPF4 が増加し、炎症性サイトカインの産生を促すとともに細胞増殖を負に制御する STING の発現が低下していることがわかった。GATA6 ECKO マウスにて血管平滑筋細胞の GATA6 の発現も低下しており、このことが肺高血圧の誘導に寄与していることが示唆された。In vitro において血管内皮細胞と血管平滑筋細胞を共培養することによって、血管平滑筋細胞の GATA6 の発現が低下したが、その相互作用は、細胞の非接触条件下でも起こり、液性因子によって引き起こされることが示唆された。これに伴い、血管平滑筋細胞の SOD2 など抗酸化タンパク質の発現も低下していた。

Protein expressions of PAVSMC

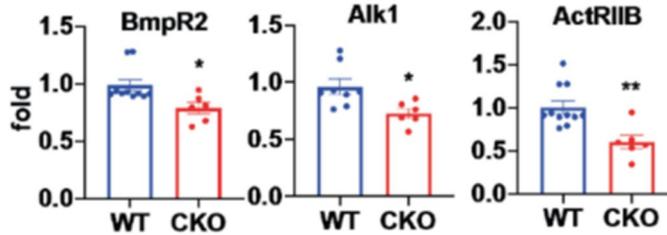


(3) GATA6 は BMP10 により発現が誘導されることを示したが、それが BMPR2、ActRIIB、ALK1、エンドグリンにより構成される受容体を經由して制御されていることを示した。また、HPAEC を siRNA で処理して GATA6 をノックダウンさせたところ BMPR2、ActRIIB、ALK1、エンドグリンの発現が低下することを明らかにした。同様に GATA6 ECKO マウスでは wild type と比較し、肺血管内皮細胞、肺組織全体において共に、BMPR2、ActRIIB、ALK1、エンドグリンの発現が低下していた。

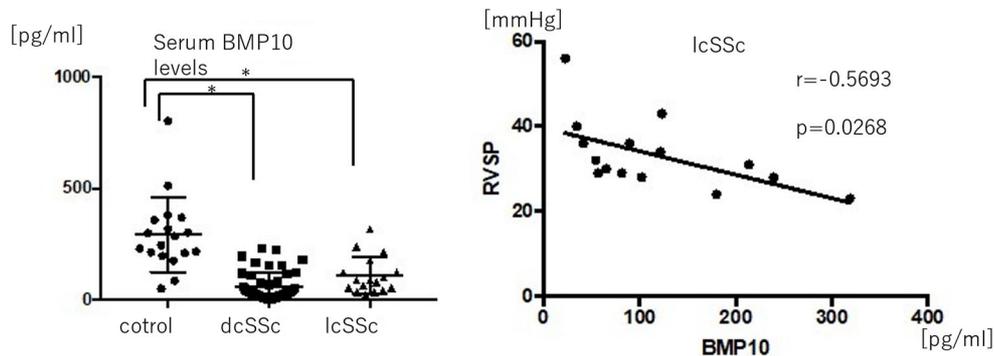
HPAEC



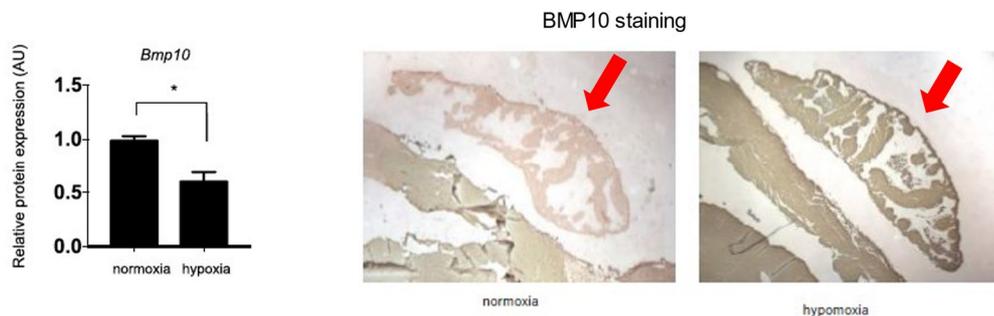
g Mouse lungs



(4) 健常者 18 人と全身性強皮症患者(diffuse cutaneous(dcSSc)41 人、limited cutaneous (lcSSc)15 人)で血清 BMP10 値を、ELISA を用いて測定した。dcSSc、lcSSc とともに血清 BMP10 値は健常者より優位に低下しており、lcSSc において、心エコーによって測定された推定右室圧 RVSP が BMP10 と逆相関することが示された。これにより全身性強皮症において BMP10 の低下が血管病変、特に肺高血圧症発症の背景にある可能性が示唆された。

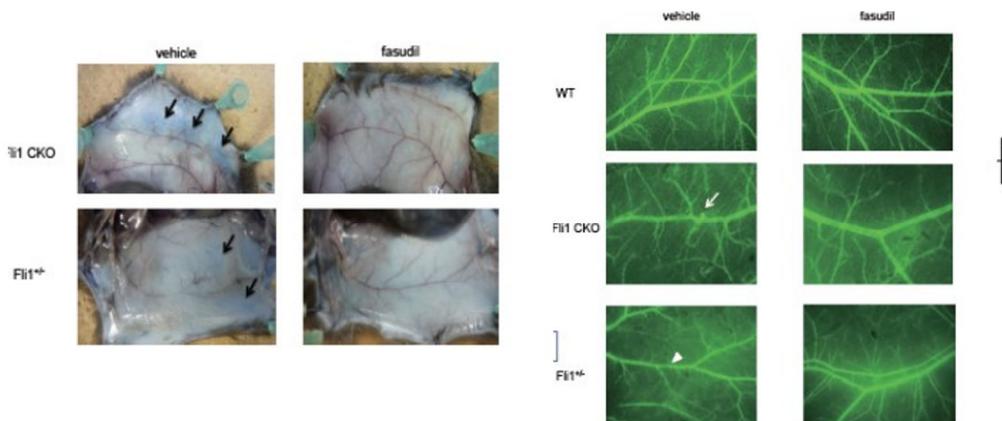


(5) 野生型マウスを 10%の低酸素で飼育したのち、BMP10 が主に産生されるといわれている右心房を摘出して、mRNA を RT-qPCR で測定し、タンパク質発現を免疫染色により評価したところ、低酸素条件下で飼育したマウスでは BMP10 の産生が低下していることが示された。HPAEC を 1%低酸素条件下で培養し、BMP10 にて刺激したところ、GATA6 の発現は低酸素条件下で低下していることが明らかになった。また BMP10 の濃度を変化させて HPAEC を刺激したところ、BMPR2、エンドグリンの発現は BMP10 の濃度が高いほど産生が亢進し、ALK1 は BMP10 の値が低いほど産生が減少することが明らかになった。これは、低酸素条件下などで BMP10 の血清濃度が下がったときに ALK1 が保護的に働くことを示唆した。



(6) Fli1 ECKO マウスにファスジルを投与したところ、ファスジルはマウス背部皮膚における微小静脈瘤や狭窄など血管構造異常を改善する作用があることが示された。さらに、Fli1 ECKO マウスで異常に亢進した血管透過性を、ファスジルが改善する作用があることが示された。また

背部皮膚を免疫染色してみると、Fli1 ECKO マウスでは VE カドヘリン、PECAM-1 といった細胞接着因子の発現が低下していたが、ファスジル投与でそれらの発現が回復していることが示された。また pericyte の被覆を SMA 染色を用いて評価したところ、Fli1 ECKO マウスでは pericyte の被覆が低下しているものが、ファスジル投与によってそれが回復していることが示された。またマウス皮膚における血管リモデリングに関わる遺伝子 Cdh5、Pecam1、Mmp9 の遺伝子発現は、Cdh5、Pecam1 では増加しており、Mmp9 の発現は低下していた。このことより基底膜をいったん壊し、細胞間接着をいったん緩めることで angiogenesis が起こるが、ファスジルが血管新生に対して抑制的に作用することが示唆された。ファスジルの投与で Fli1 の発現がどのように変化するか調べたところ mRNA、タンパク質ともに増加しており、ファスジルは Fli1 の発現を誘導することで血管に保護的に働くことが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠山 哲夫
2. 発表標題 Hypoxia causes dysregulation of BMP10/GATA6 axis in pulmonary artery hypertension
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会 第45回学術総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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