

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460460

研究課題名(和文) 肺高血圧症の肺動脈構築改変機構に關与する遺伝子発現局在の解析

研究課題名(英文) Overexpression of Daam-1 on pulmonary arterial wall for the pathogenesis of human idiopathic pulmonary arterial hypertension

研究代表者

若山 恵 (WAKAYAMA, Megumi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：40230924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：特発性・二次性の肺動脈性肺高血圧症(PAH)病理剖検例と年齢を一致させた対照剖検例の肺の病理組織標本を用いてWnt/PCPパスウェイに關与する遺伝子であるWnt-11, Dvl-2, Daam-1を標的とした免疫組織染色を行い、発現部位、および発現の程度の量的評価を行った。その結果、特発性PAH例では中膜平滑筋細胞においてDvl-2が低発現でもDaam-1の発現がみられ、これは二次性PAH症例や対照例とは相対する結果であった。これらにより、Daam-1の非自律性発現によるWnt/PCPパスウェイの発現亢進が特発性PAH発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Evidence from our recent study suggests that idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) pathogenesis is related to upregulation of the Wnt/PCP pathway. We used microscopic observation and immunohistochemical techniques to identify expression patterns of cascading proteins - namely Wnt-11, Dvl-2, and Daam-1 - in pulmonary arteries.

We analyzed sections of formalin-fixed and paraffin-embedded autopsied lung tissues obtained 9 IPAH cases, 7 associated pulmonary arterial hypertension cases, and 16 age-matched controls without pulmonary arterial abnormalities, and marked expression of Dvl-2 and Daam-1 was confirmed in smooth muscle cells. In addition, Dvl-2 was depleted while Daam-1 expression was elevated in IPAH, in contrast with specimens from associated pulmonary arterial hypertension cases and controls. So it was suggested that high Daam-1 expression may upregulate the Wnt/PCP pathway and cause IPAH.

研究分野：人体病理、外科病理、真菌症の病理

キーワード：特発性肺動脈性肺高血圧症 Wnt/PCPパスウェイ Daam-1 Dvl-2 肺動脈中膜平滑筋細胞

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺動脈性肺高血圧症 (Idiopathic pulmonary arterial hypertension, IPAH) は肺動脈圧が上昇する肺血管疾患であり、根本的な治療法が存在しない進行性で予後不良の疾患である。その多くは小児患者であり、重症化した症例の治療は心肺移植に頼らざるを得ないのが現状である。その発症には種々の環境・疾患関連因子ないし遺伝子異常や多型が複合的に関わっていると推察されている (Yuan JX and Rubin LJ. *Circulation*. 2005.)。IPAHの初期には肺動脈中膜、内膜の肥厚が認められ、その後肺動脈血管構築の不可逆的な変化が生じるが、その病態形成の機序及びトリガーは未だに明らかでない。また、ヒトの病態を反映した動物モデルも確立されていない。

研究分担者らは、わが国の居住環境内から分離された真菌である *Stachybotrys(S) chartarum* の気管内反復接種によって、肺動脈壁の中膜および内膜の肥厚を特徴とするヒトのIPAHに類似した病変がマウスの肺動脈に形成されることを明らかにした (Ochiai E *et al.* *Int J Exp Pathol*. 2008)。本動物モデルでは真菌感染巣はほとんど形成されず、IPAH様の肺動脈病変のみが特徴であり、研究代表者らはこのモデルがIPAHの動物モデルとして応用可能と考え、病理組織学的解析を進めてきた。このモデルにおけるIPAH類似の肺動脈病変は可逆的であり、早期治療の可能性を示唆している。また、ヒトIPAHでは bone morphogenetic protein (BMP) receptor type 2 (Simonneau G *et al.* *J Am Coll Cardiol*. 2009) を介したパスウェイの関連が指摘されており、この一部を遮断するRhoキナーゼインヒビターが臨床的にも保存的治療効果が確認されている (Barman SA *et al.* *Vasc Health Risk Manag*. 2009)。本モデルにおいても、Rhoキナーゼインヒビターを投与することで肺動脈のリモデリングが抑制されることも明らかになっている (Nagayoshi M *et al.* *Mycopathologia*. 2011)。これらは、屋内生活環境内における真菌曝露が肺高血圧症の発症環境因子の一つである可能性を示唆する、他に類をみない実験動物モデルである。

研究代表者らはこのモデルマウスから得られた肺組織に対し、マイクロアレイ法を用いた網羅的な遺伝子発現変動解析を行い、既報を用いたヒトIPAHの遺伝子解析結果との相同性・相反性について比較検討し、ヒトIPAHにおける病態形成因子としてRhoA/ROCKパスウェイ (the Ras homolog (Rho)/Rho-Associated Coiled-Coil-Forming Protein Kinase (ROCK) pathway) の上流に位置するWnt/PCPパスウェイ (the Wnt/planar cell polarity (PCP) signaling pathway) が深く

関与している可能性を指摘した (Shimodaira K *et al.* *Respir Res*. 2012)。

この結果を踏まえて、ヒトIPAH剖検肺やモデルマウスの肺を用い、変動を示した遺伝子の発現部位や多寡について組織学的に検討することは、肺動脈病変形成機序を解明する一助となると考えられる。またIPAH発症誘因となる多因子の一つとしての真菌曝露の可能性からは、IPAHの予防法や早期治療薬開発を構築しうる可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

ヒトIPAH剖検肺およびIPAH類似モデルマウスの剖検肺を用いて、Wnt/PCPパスウェイに関わる遺伝子を標的とした免疫組織染色を行い、病理学的に両群の比較検討を行うことで、病態形成の本幹をなす肺動脈壁の肥厚に直接的・非直接的に関与する遺伝子経路とその発現部位を蛋白レベルで証明し、IPAHの新たな治療法の可能性を追求する。また、IPAH類似モデルマウスは環境由来の真菌によって引き起こされる病態であるため、病態形成に関わる環境因子の一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

東邦大学医療センター大森病院の特発性・二次性を含む肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 病理剖検例と年齢を一致させた肺動脈肥厚の無い対照剖検例の15%ホルマリン固定後パラフィン包埋された肺組織、および環境由来真菌である *S. chartarum* を経気管的に反復接種することにより作製した特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 類似の肺動脈病変を生じたモデルマウスの肺組織を用いて、Wnt/PCP Pathway 関連遺伝子を標的とする免疫組織染色を行い、発現の有無と程度について比較検討を行った。

用いたヒト剖検肺は、IPAH 9例、二次性肺動脈性肺高血圧症 7例、およびこれらの症例と年齢を一致させた対照剖検例 16例である。IPAHモデルマウスの肺組織は3例用いた。

免疫組織染色で用いた抗体は、WNT/PCPパスウェイを構成するWnt-11、disheveled-2 (Dvl-2)、およびdisheveled-associated activator of morphogenesis (Daam-1) をターゲットとした抗体であり、陽性対照となる組織切片とともに定法に従って免疫組織染色を行い、diaminobenzidine発色とヘマトキシリンによる核染色を経て、光学顕微鏡下で観察を行った。なお、肺動脈は直径100 $\mu$ mを境として小動脈と中型動脈にわけ、さらに壁の構成成分を内膜細胞、筋線維芽細胞、中膜平滑筋細胞にわけて、それぞれの抗体について発現の有無と程度について比較検討を行った。

## 4. 研究成果

ヒト剖検肺では、Dvl-2、Daam-1は肺動脈の内膜や筋線維芽細胞、中膜平滑筋細胞に陽

性を示したのに対して Wnt-11 ではいずれの部位でも陽性像は認められなかった。内皮細胞と筋線維芽細胞においては特異的な発現様式は認められなかったが、中膜平滑筋細胞では IPAH 例では中膜平滑筋細胞で Dvl-2 が低発現でも Daam-1 の発現がみられ、これは二次性 PAH 症例や対照例とは相対する結果であった。これらにより、Daam-1 の非自律性発現による RhoA/ROCK パスウェイの発現亢進が IPAH 発症に寄与している可能性が示唆された。

免疫組織学的に遺伝子の発現について量的評価を行うことは難しく、このためか IPAH の病態に関わる遺伝子について免疫組織学的に検討した研究はほとんど認められない。しかし、発現部位を目でみて確認できる点で本手法は優れており、今後マイクロアレイ解析による量的評価を加えることでさらに詳細な情報が得られる可能性がある。これらの見地から、本研究は IPAH の病態解明において重要な位置にあると考える。

さらに本結果から、Daam-1 より下流に位置する遺伝子の発現について検索する必要があると考えられ、これらの遺伝子についての免疫組織学的検索、さらにはマイクロアレイ法による解析により、より詳細な病態形成機序が判明する可能性がある。

また、IPAH モデルマウスの肺動脈においてはいずれの抗体も明確な陽性像を示しておらず、*S. chartarum* 反復投与による肺動脈病変形成に関与する遺伝子発現が WNT/PCP パスウェイより下流のパスウェイに存在するか、あるいは異なるパスウェイを介して間接的に生じる可能性が示唆された。本結果からは、*S. chartarum* は直接的には IPAH の病態形成には関わってはいないことが推測されるとともに、他の物質でも同様の病変を生じる可能性があり、それらもまた、Wnt/PCP パスウェイのさらに下流の遺伝子を発現することによって同様の病態を形成するだろうことが推測された。

## 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 4 件)

Shun Yanai, Megumi Wakayama, Haruo Nakayama, Minoru Shinozaki, isayuki Tsukuma, Naobumi Tochigi, Tetsuo Nemoto, Tsutomu Saji, Kazutoshi Shibuya. Implication of overexpression of disheveled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam-1) for the pathogenesis of human Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension (IPAH), *Diagnostic Pathology*, 2017, 12:25-35 DOI 10.1186/s13000-017-0614-7 査読有

Minoru Shinozaki, Naobumi Tochigi, Sota

Sadamoto, Somay Yamagata Murayama, Megumi Wakayama, Tetsuo Nemoto, Kazutoshi Shibuya. Technical Aspects and Applications for Developing in situ Hybridization Procedures for Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded (FFPE) Tissues for Diagnosis of Fungal infections. *Med Mycol J*. 2017, 58: E33-E37 DOI 10.3314/mmj.16-00025 査読有

Kyoko Aki, Yoichiro Okubo, Hiroshi Nanjo, Takao Ishiwatari, Yasuhiro Nihonyanagi, Naobumi Tochigi, Megumi Wakayama, Tetsuo Nemoto, Katsunori Fukutake, Minoru Shinozaki, Yasuhiro Hori, Hirotake Masuda, Kazutoshi Shibuya. Genomic Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in Japanese Patients with Invasive Aspergillosis. *Jpn J Infect Dis* 2015, 68:330-332, doi: 10.7883/yoken. JJID.2014.420 査読有

Yamamoto Y, Nemoto T, Okubo Y, Nihonyanagi Y, Ishiwatari T, Takuma K, Tochigi N, Okano N, Wakayama M, Igarashi Y, Shibuya K. Comparison between the location and the histomorphological/immunohistochemical characteristics of noninvasive neoplasms of the ampulla of Vater. *Hum Pathol* 2014 45:1910-7 doi: 10.1016/j.humpath.2014.05.013 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

矢内俊, 中山智孝, 中山晴雄, 若山恵, 篠崎稔, 津熊久幸, 栃木直文, 根本哲生, 佐地 勉, 澁谷和俊: 特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) の肺動脈病変における Wnt/PCP 関連因子の発現について. 2016、第 1 回日本肺高血圧・肺循環学会

Megumi Wakayama, Kayoko Shimondaira, Eri Ochiai, Yoichiro Okubo, Minoru Shinozaki, Kyoko Aki, Kozue Ejima, Takao Ishiwatari, Yasuhiro Nihonyanagi, Naobumi Tochigi, Aki Mitsuda, Tetsuo Nemoto, Somay Yamagata Murayama, Katsuhiko Kamei, Kazutoshi Shibuya. Pathological study of WNT/PCP signaling system inducing pulmonary arterial remodelling in mice by intratracheal injection of *Stachybotrys chartarum*. 2015, 19th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology

若山 恵, 下平佳代子, 大久保陽一郎, 石

渡誉郎、二本柳康博、栃木直文、密田亜希、根本哲生、澁谷和俊 . 肺動脈性肺高血圧症における Wnt/PCP Pathway 関連遺伝子の発現に関する免疫組織学的検討 .2015/05/01、第 104 回日本病理学会総会，名古屋市

下平佳代子、高月晋一、中山智孝、若山 恵、松浦裕行、澁谷和俊、佐地 勉 . Wnt/PCP Pathway 関連因子の特発性肺動脈性肺高血圧症の肺動脈病変における発現 . 2014/07/04、第 50 回日本小児循環器学会総会・学術集会、岡山市

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

若山 恵 (WAKAYAMA, Megumi)  
東邦大学・医学部・講師  
研究者番号：40230924

### (2) 研究分担者

澁谷 和俊 (SHIBUYA, Kazutoshi)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号：20196447

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

矢内 俊 (YANAI, Shun)  
下平 佳代子 (SHIMODAIRA, Kayoko)

篠崎 稔 (SHINOZAKI, Minoru)