

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08359

研究課題名(和文)肺血管壁肥厚を誘導する細胞周囲環境の解析と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Analysis of microenvironment and exploration of new biomarker for pulmonary arterial hypertension

研究代表者

谷野 美智枝 (Tanino, Mishie)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：90360908

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)：成人と小児肺高血圧症を対象に形態学、免疫組織化学、遺伝子学的解析を行い以下のことを明らかにした。(1)肺静脈性肺高血圧症ではFGF-FGFR経路の亢進が示唆された、(2)治療感受性を示唆する蛋白(PDE5、ER-A/B、PGI2、sGC /)の免疫組織化学染色ではPHではPHのないコントロールと比較して強く染色されたが、背景疾患別の相違は明らかではなく様々な背景疾患のPHに薬剤が有用である可能性が示唆された。(3)強皮症関連PHでは炎症ではなく線維化が主体で、造影MRIでの心筋造影異常と線維化の関連を認めた。(4)小児の二次性PHにてFOXF1やhOAS1の遺伝子異常の関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1)Immunohistochemistry for FGFR1, VEGFR2, EGFR in the lungs of pulmonary venous obstructive hypertension(PVOD) showed higher expression of FGFR compared to VEGFR and EGFR in PVOD lungs. FGF-FGFR may pathway contribute the pathogenesis of PVOD. (2)Therapy related proteins such as PDE5, ER-A/B, PGI2, sGC / expressed higher in pulmonary hypertension(PH) compared to controls, however there were no difference between Group 1-PH and Group 3-PH. These drugs contribute to dilate vessel wall in both types of PH. (3) Systemic sclerosis (Ssc) related PH showed denser fibrosis compared to SLE related PH and replacement myocardial fibrosis was demonstrated at the site of late gadolinium enhancement of MRI in Ssc patient.(4) FoxF1 mutation was detected in Alveolar capillary dysplasia related PH children and Heterozygous mutations in OAS1 were detected in infantile-onset pulmonary alveolar proteinosis with hypogammaglobulinemia. These genetic background relate to secondary PH.

研究分野：呼吸器

キーワード：肺高血圧 ニース分類 免疫組織化学染色 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症(Pulmonary Hypertension)は、原因不明の特発性や膠原病合併のほかにも肺線維症、慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患、肝硬変やなど様々な多岐にわたる内科疾患を原疾患に有する病態であり、いずれの病態においても血管病変が原因となり右心不全から両心不全により致死的になることが多い。近年、様々な血管拡張剤が開発され治療薬として使用されており、背景疾患別の薬剤選択の必要性や薬剤抵抗性などに関して臨床的に注目が集まっている。病理学的には、いずれの病態においても血管内皮細胞、平滑筋細胞の過剰増殖や血管リモデリング・過収縮、細胞外マトリクスの増加に基づく血管狭窄が特徴的であるが、これらを制御する生命予後改善薬剤は現在ない。また、近年、遺伝性肺動脈性肺高血圧症では Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)superfamily に属する Bone Morphogenetic Protein type Receptor (BMP2) や Activin Receptor-like Kinase-1(ALK-1)の遺伝子変異が明らかになり、これらの遺伝子異常が自律的な細胞増殖・細胞外マトリクスの過剰沈着を誘導していると考えられている。これらの分子及びそのシグナル伝達の亢進は癌においても腫瘍細胞の増殖や上皮間葉移行 (Epithelial to Mesenchymal Transition :EMT)などを介した腫瘍の悪性化などへの関連が報告されている。また、近年、それらの分子の誘導には腫瘍細胞周囲環境におけるサイトカインや代謝産物環境が積極的に関与していることが報告されている。一方、小児発症の肺高血圧症患者では背景疾患としての遺伝子異常に関して様々な報告があり、近年広く用いられつつある次世代シーケンス法などを用いた遺伝子解析が望まれている。

2. 研究の目的

肺血管の肥厚や閉塞は、肺高血圧症をもたらすが、特発性に加え combined pulmonary fibrosis and emphysema: CPFE を含む様々な肺疾患や膠原病、肝硬変などの消化器疾患に合併する。肺高血圧から右心不全、両心不全に進展し、手術適応から除外されるなど本病態は多くの患者にとって重要な予後因子になる。病理学的には肺血管内膜や中膜の肥厚、リモデリングによる血管の狭窄や閉塞が特徴で現在のところ3系統の血管拡張剤治療薬が使用されているが、根本的な原因である血管壁細胞増殖を制御する治療方法は確立されていない。今回は、血管成長因子を含む様々な growth factor 及びその receptor、血管拡張薬のターゲット蛋白の発現を免疫組織化学染色法を用いて評価するとともに、背景疾患別の肺病理の形態学的解析を通じて疾患特異的な蛋白やシグナルの解析を行う。さらには小児肺高血圧症例における肺病理像の形態学的解析と遺伝子学的解析を行い、肺高血圧の発症機序を明らかにする。

3. 研究の方法

臨床的に肺高血圧を合併した様々な患者肺及び希少疾患である肺動脈性高血圧症を解析対象とする。成人症例の解析には剖検症例の肺及び右心臓の病理組織及び胸腔鏡下肺生検にて採取された肺組織を用いて H&E 染色及び Elastica-Masson 染色により、細動脈、細静脈病変の形態学的解析と行うとともに肺組織及び右心室検体(剖検症例)を用いて血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞の増殖に關与する可能性がある Fibroblast growth factor receptor (FGFR), epidermal growth factor receptor (EGFR), Vascular growth factor receptor の発現と type III collagen, type IV collagen の免疫組織化学染色を行う。また、治療の選択に關与する Phosphodiesterase 5 (PDE5), Endothelin receptor A (ERA), Endothelin receptor B

(ERB), Prostaglandin I2 (PGI2)、soluble guanylate cyclase (sGC) , sGC の免疫組織化学染色を施行し、半定量的に染色性を評価した(0: 染色されない、1: 25%以下に陽性、2: 25~75%に陽性、3: 75~100%に陽性)。さらに疾患や重症度、薬剤効果との関連を比較検討した。また、小児肺高血圧症症例の解析では、患者の末梢血を用いて DNA を抽出し PCR-direct sequencing 法、Microarray-based comparative genomic hybridization を用いて遺伝子解析を行った。

4. 研究成果

(1)血管増殖因子の検討結果

生前に肺高血圧症と診断され剖検にて肺静脈性肺高血圧と診断された5症例を対象としコントロール肺と比較検討した。FGFR1 は正常肺において血管内皮細胞、気管支上皮の基底細胞、II型肺胞上皮細胞に発現を認めた。I群肺高血圧症である肺静脈性肺高血圧症では血管内皮細胞におけるFGFR1の発現が有意に増加しており、type IIIコラーゲン及びtype IVコラーゲンの陽性像を認めたが、EGFRとVEGFR2の発現は認めなかった。この結果からは肺静脈性肺高血圧症ではFGF-FGFR1 axisを介した血管内皮細胞増殖のシグナル伝達亢進が起きていることが示唆された。

(2)治療感受性蛋白の検討結果

生前に肺高血圧症と診断され剖検となった9症例を対象とした。ニース分類に基づき4症例(特発性肺動脈性肺高血圧症2例、混合結合組織病に合併した肺高血圧症1例、門脈圧亢進症に合併した肺高血圧症1例)は第1群に分類され、慢性閉塞性肺疾患1例、気腫合併肺線維症2例、特発性肺線維症2例の5例は第3群に分類された。病変部のブロック5か所のHE染色及びElastica Masson染色を施行し、血管病変を血管抵抗に関連ある100~500umの細動脈の閉塞程度を10%以下、

10~50%、50%以上の3段階に評価した。また、前小葉間隔壁静脈の閉塞の有無を評価した。これらの病変に対して現存する3系統のPH治療薬(Phosphodiesterase 5 inhibitor: PDE5I, Endothelin receptor agonist: ERA, Prostaglandin I2: PGI2)の標的タンパク質の免疫組織化学染色を行いその染色程度を3段階に半定量評価したところ、第1群と第3群の肺高血圧症のいずれの病態においても、細動脈、細静脈、毛細血管病変が散在性に見られた。また血管内膜肥厚、中膜肥厚、外膜肥厚など様々な病変を認めたが、正常血管も混在しており、形態変化を伴わない血管攣縮の病変があることが示唆された。また第1群と第3群の病変における治療ターゲット蛋白の発現は類似しており、第1群で使用されている薬剤が第3群の肺血圧にも有効である可能性が示唆された。

(3)背景疾患別特徴の解析結果

全身性エリテマトーデス(SLE)関連肺高血圧症と強皮症(SSc)関連肺高血圧症例の肺組織の比較検討を行った。SLEではSScと比較して血管炎の合併が有意にみられた、SScでは血管炎は認めず静脈病変と間質性肺炎が有意に認められた。SLEでは炎症を抑制することで肺高血圧の発症を抑制できる可能性があるが、SScでは肺実質や肺動脈及び静脈の線維化を抑制する必要があることが示唆された。また、MRIにてガドリニウム遅延造影効果を認める心筋において線維化が起きていることが確認された。

(4)小児の二次性肺高血圧症症例の遺伝子学的解析

肺動静脈奇形を背景にした肺高血圧症患者の胸腔鏡下肺生検検体では、毛細血管の異常、肺細動脈と細静脈の走行異常を認めた。末梢血を用いてDNAを抽出しPCR-direct sequencingしたところ、FOXF1のexon1にお

いて heterozygous frameshift mutation c.899T>C, p.L300RfsX79 を検出したが、Microarray-based comparative genomic hybridization では染色体欠失や染色体重複が認めなかった。

低ガンマグロブリン血症を伴う肺胞蛋白症を背景にした乳児期発症の肺高血圧症患者の同胞 3 症例 (38 週齢、36 週齢、39 週齢) と孤発症 2 症例 (39 週齢、39 週齢) の遺伝子解析を行った。SFTPB, SFTPC, ABCA3, CSF2RA, CSF2RB, GATA2 遺伝子には異常を認めなかったが、double-stranded RNA-bound form of human oligoadenylate synthetase 1(hOAS1) の遺伝子異常を認めた。同胞 3 症例では 227C>T, p.Ala76Val が認められ、孤発性では、それぞれ c.326G>A, p.Cys109Tyr と 592C>G, p.Leu198Val の異常を認めた。これらの異常は肺胞マクロファージの異常な活性化を誘導し、最終的にはサーファクタントプロテインの処理ができなくなることが原因で肺胞蛋白症を発症し二次性の肺高血圧を発症することが示唆された。FOXF1 や hOAS1 の遺伝子異常と二次性肺高血圧症の因果関係が示唆された。

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 7 件)

1. Cho K., Yamada M., Agematsu K., Kanegane H., Miyake N., Ueki M., Akimoto T., Kobayashi N., Ikemoto S., Tanino M., Fujita A., Hayasaka I., Miyamoto S., Tanaka-Kubota M., Nakata K., Shiina M., Ogata K., Minakami H., Matsumoto N., Ariga T. Heterozygous Mutations in OAS1 Cause Infantile-Onset Pulmonary Alveolar Proteinosis with Hypogammaglobulinemia. *Am J Hum Genet.* 査読有 2018 1;102(3):480-486. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.01.019. Epub 2018 Feb 15.
2. Kato M., Tanino M., Miyazaki M., Kimura T., Ishida Y., Wang L., Tsuda M., Nishihara H., Nagashima K., Tanaka S.: Clinicopathological analysis of six autopsy cases of the sudden unexpected death by infectious aortitis with tear of aorta. *Internal Med.* 査読有 2018 15;57(10):1375-1380. doi: 10.2169/internalmedicine.8976-17. Epub 2018 Jan 11
3. Noguchi A., Tsujino I., Oyama-Manabe N., Tanino M. Replacement myocardial fibrosis at the site of late gadolinium enhancement on magnetic resonance imaging in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis: An autopsy report. *Journal of Cardiol. Case Rep.* 査読有, 2017. 2(16):48-51.
4. Misa K., Tanino Y., Wang X., Nikaido T., Kikuchi M., Sato Y., Togawa R., Tanino M., Tanaka S., Kadomatsu K., Munakata M.: Involvement of midkine in the development of pulmonary fibrosis. *Physiol Rep.* 査読有, 2017. 5(16). pii: e13383. doi: 10.14814/phy2.13383.16, e13383
5. Elmansuri A.Z., Tanino M. Mahabir R., Wang L., Kimura T., Nishihara H., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Tsuda M., Tanaka S.: Novel signaling collaboration between TGF- β and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer. *Oncotarget*, 査読有, 2016.

10;7(19):27094-107. doi:
10.18632/oncotarget.8314.

6. Ohtake J., Kaneumi S., **Tanino M.**,
Kishikawa T., Terada S., Sumida K.,
Masuko K., Ohno Y., Kita T., Iwabuchi S.,
Shinohara T., **Tanino Y.**, Takemura T.,
Tanaka S., Kobayashi H., Kitamura H.:
Neuropeptide signaling through
neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors
augments antigen presentation by human
dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.*
査読有, 2015. 136(6):1690-1694. doi:
10.1016/j.jaci.2015.06.050. Epub 2015 Sep
12.
7. Ito Y., Akimoto T., Cho K., Yamada M.,
Tanino M., Dobata T., Kitaichi M.,
Kumaki S., Kinugawa Y. A late presenter
and long-term survivor of alveolar
capillary dysplasia with misalignment of
the pulmonary veins. *Eur J Pediatr.* 査読
有, 2015. 174(8):1123-6. doi:
10.1007/s00431-015-2543-3.

〔学会発表〕(計 2件)

1. **谷野 美智枝** 膠原病関連肺高血圧の病
理 基礎疾患別の特徴 第2回日本肺高
血圧・肺循環学会学術集会 シンポジウ
ム 2016年6月
2. **谷野 美智枝**, **辻野 一三**, 石田 雄介,
加藤 容崇, 王 磊, 木村 太一, 西原
広史, 田中伸哉 肺高血圧症における血
管病変の形態学的・免疫組織学的変化
第104回日本病理学会総会、2015年5月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://patho2.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷野 美智枝 (Mishie TANINO)
北海道大学・医学研究院・講師
研究者番号: 90360908

(2)研究分担者

仙葉 慎吾 (Shingo SEBBA)
北海道大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号: 40466496

辻野 一三 (Ichizo TSUJINO)
北海道大学・医学研究院・特任教授
研究者番号: 00344507

谷野 功典 (Yoshinori TANINO)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10443863

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし