

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15309

研究課題名(和文) 遺伝子改変モデル動物での炎症性サイトカインによる「血管炎」の病態制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Vasculitis and Pulmonary arterial 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、大動脈に炎症をきたす高安動脈炎と肺動脈に炎症を来す肺動脈性肺高血圧症(PAH)のモデル動物を作製することを目的とする。interleukin-6(IL-6)とIL-21が上記疾患の病態形成で重要だと仮説をたてて、これら大動脈内皮又は肺胞上皮で過剰発現するトランスジェニック(TG)マウスの作製を試みた。大動脈内皮での過剰発現にはBMX遺伝子プロモーター下で、PAHモデルマウス系での肺胞上皮特異的過剰発現にはドキシサイクリン誘導性にSP-C遺伝子プロモーター下にIL-6とIL-21のcDNAを組み込んだTGマウス作製を進めたが、これまで各組織で十分な過剰発現が掛からず条件検討中である。

研究成果の概要(英文)： We aimed to elucidate the molecular mechanisms of intractable vascular diseases such as Takayasu arteritis (TAK) or pulmonary arterial hypertension (PAH) in this study. We tried to create the animal models of these diseases which mimic the pathologies of these diseases through overexpression of the key inflammatory cytokines in the aortic endothelium or lung epithelium. We hypothesized that inflammatory cytokines including interleukin-6 (IL-6) or IL-21 are important for development of TAK or PAH, and created the mice which harbor the TetO-mIL-6 or TetO-mIL-21 genes in C57BL6 mice for creation of PAH model mice. And, we also created transgenic mice which harbor either BMX-mIL-6 or BMX-mIL-21. Until now, we could not succeed in creating the above transgenic mice which overexpress mIL-6 or mIL-21 either in aortic endothelium or in lung epithelium. We are now adjusting the overexpression condition in the above TG mice.

研究分野：循環器内科学、血管病学、炎症性サイトカインの生物学

キーワード：炎症 サイトカイン 肺動脈性肺高血圧症 高安動脈炎 interleukin-6 interleukin-21

1. 研究開始当初の背景

血管炎の慢性炎症病態には炎症性サイトカインが様々な形で関与することがこれまで報告されている。血管炎の中で高安動脈炎は大動脈とその一次分枝をおかす未だ原因不明の大型血管炎で、疫学的には我が国に患者が約 6,000 名おり、10 代~40 代の若年女性で発症が多い厚生労働省の難病指定疾患である。高安動脈炎の治療は副腎皮質ステロイドが基本であるが、ステロイド減量の過程で再燃する症例が多く約 70%に上ると報告される (*Arthritis & Rheumat.* 56, 1000, 2007)。よって、高安動脈炎の難治例に対する治療法は未だ確立されていないことが問題点として挙げられる。

interleukin-6(IL-6)は代表的な炎症性サイトカインの 1 つで様々な炎症性疾患の病態に関与する。IL-6 受容体に対するヒト化モノクローナル抗体 tocilizumab は関節リウマチ、キャッスルマン病、若年性特発性関節炎に保険承認されて世界中の臨床現場で汎用されている。また、血清 IL-6 濃度は高安動脈炎で疾患活動性と比例して高くなることが報告されていた (*Circulation*; 100, 55, 1999)。そうした報告を踏まえて、研究代表者らは 2008 年から難治性高安動脈炎に対して tocilizumab の有効性、安全性を検討するパイロットスタディを難治性症例 4 症例に対して開始して、IL-6 阻害療法の有効性が高安動脈炎において示唆される結果を得た (*Int Heart J.* Nakaoka Y. et al. 54, 405, 2013)。その後、厚生労働科研費 (2011 年度) と日本循環器学会 TR 振興事業 (2012~2014 年度) の支援のもとで難治性症例に対する多施設臨床試験を進めて合計 11 症例に対する治療を施行して、有効性が示唆される結果も得た (Nakaoka Y. et al, *submitted*)。こうした結果を背景にして、2014 年 9 月から高安動脈炎に対する tocilizumab の治験が行われて薬事承認を目指して進行中である (Nakaoka Y. et al, *manuscript in preparation*)。一方、IL-6 シグナル阻害が高安動脈炎の治療に有効な理由は不明である。これは高安動脈炎に適切な疾患モデル動物がないため、実験的アプローチによる病態の解明が必要と考えられた。

また、研究代表者らは高安動脈炎と同様に厚生労働省の難病指定疾患である肺動脈性肺高血圧症 (PAH) のモデル動物である低酸素誘発性肺高血圧症マウスの系で tocilizumab のマウス版である抗 IL-6 受容体モノクローナル抗体 MR16-1 を用いて、そ

の HPH 病態に対する抑制効果を見出すと同時に、HPH 病態における IL-6 の下流標的サイトカインとして IL-21 を同定した (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(20), E2677-86, 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが明らかにして来た (1) 臨床的な高安動脈炎に対する IL-6 シグナル阻害療法の有効性と、(2) 実験的な低酸素誘発性肺高血圧症モデルマウスでの IL-6 シグナル阻害の有効性について、IL-6/IL-21 シグナル軸に着目して高安動脈炎と肺高血圧症の疾患モデル動物作製を試みて病態解明に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ドキシサイクリン誘導性 IL-6-TG マウス及び IL-21-TG マウスの作製: 上記の背景を踏まえて、IL-6/IL-21 のシグナル軸が肺高血圧症の病態形成の促進因子であることを肺胞上皮細胞特異的に IL-6 および IL-21 を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを Tet-On システムを用いて作製・検証することとした。まず、肺胞上皮特異的に遺伝子発現をする *Surfactant protein C (SPC)* 遺伝子のプロモーター下に *rtTA* 遺伝子を組み込んだ Tg マウス (*SP-C-rtTA-TG*) を入手した。

ドキシサイクリン (Dox) 依存性に *rtTA* により発現誘導がかけられる pTRE-Tight ベクター (Clontech 社製) のマルチクローン化サイトへとマウス IL-6 (*mIL-6*) cDNA とマウス IL-21 (*mIL-21*) cDNA を組み込んだプラスミドを作製した。これらの 2 種類のプラスミドを Tet-on Advanced HEK293 細胞に transfection して、Dox による発現誘導を掛けて IL-6 及び IL-21 の発現誘導を確認した。

pTRE-Tight-*mIL-6* 及び pTRE-Tight-*mIL-21* ベクターから線状化した DNA を理研 CLST 遺伝子改変マウス共同開発部門に送り、ES 細胞への打ち込みと TG マウス作製を外注で進めた。

(2) Dox 誘導性 IL-6-TG マウス及び IL-21-TG マウスの発現解析: 上記で作製した TG マウスでの Dox による発現誘導の確認を qRT-PCR およびウェスタンブロットで行った。

(3) 高安動脈炎モデル動物作出の試み: 背景で既述した様に臨床研究を通して IL-6 が高安動脈炎の病態で中心的な役割を担うことを明らかにして来たが (*Int Heart J.* Nakaoka et al. 54, 405, 2013)、一方で高安動

脈炎には適切な疾患モデルが無い。そこで、IL-6/IL-21 シグナル軸が高安動脈炎の病態促進に

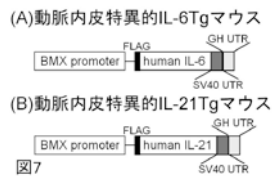
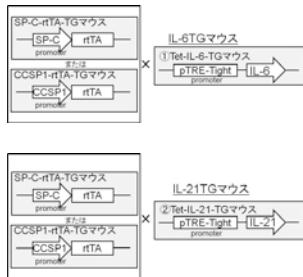


図7

関わるかについて右記 2 系統の動脈内皮細胞特異的トランスジェニック(Tg)マウスを作製して検証する(右上図)。BMX は動脈内皮細胞特異的に遺伝子発現することが報告されているので(*Mol Cell Biol.* 21, 647, 2001)、BMX プロモーター下にヒト IL-6 とヒト IL-21 の cDNA を挿入したベクターを作製して Tg マウスを作製することを試みた。

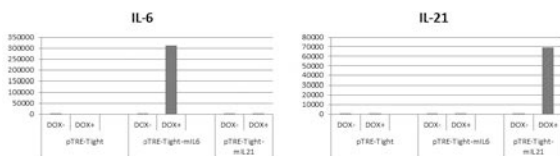
4. 研究成果

(1) ドキシサイクリン誘導性 IL-6-TG マウス及び IL-21-TG マウスの作製:



左図に示すようなダブル TG マウスの作製を目標として pTRE-Tight ベクターに mIL-6 cDNA と mIL-21

cDNA を組み込んだプラスミドを作製して、Tet-on Advanced HEK293 細胞に transfection して、Dox による発現誘導を掛けた。その結果、Dox 存在下で pTRE-Tight-mIL-6 または pTRE-Tight-mIL-21 を transfection した細胞においてのみ、IL-6 と IL21 の mRNA 過剰発現が qRT-PCR 解析で確認された(下図)。



(2) Dox 誘導性 IL-6-TG マウス及び IL-21-TG マウスの発現解析:

pTRE-Tight-mIL-6 及び pTRE-Tight-mIL-21 TG マウスとまず SP-C-rtTA-TG マウスと交配して DTG を作製して、Dox 依存性の発現誘導が肺胞上皮において見られるかを確認した。その結果、mIL-6-TG 及び mIL-21-TG マウスともに Dox 依存性の発現誘導が十分見られず、むしろ Dox 非投与下でもそれぞれの遺伝子発現がリークしている傾向が観察された。加えて SP-CrtTA-TG マウスの rt-TA の Dox 依存性活性化も十分に見られない可能性を示唆する結果が得られた。

そこでリークの少ない pTRE-Tight-mIL-6 及び pTRE-Tight-mIL-21 TG マウスラインのスクリーニングを現在進めている。また、SP-C-rtTA-TG と同様に肺胞上皮特異的に Dox 依存性発現誘導を掛けられるドライバーマウスである CCSP1-rtTA-TG マウスを入手して、上記の TG と交配を進めて Dox 依存性に IL-6 及び IL-21 の過剰発現が肺胞上皮特異的に見られる TG ラインの確立を目指している。

(3) 高安動脈炎モデル動物作出の試み: 現在までに BMX-mIL-6-TG 及び BMX-mIL-21-TG マウスをそれぞれ 2 ラインずつ確立したが、大動脈において何れも IL-6, IL-21 の過剰発現を得ることが出来なかった。BMX 遺伝子プロモーターに異常がないかを検討中である。

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 9 件)

1. 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 (*corresponding author) (査読有)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
 5. Cherif M., Caputo M, Nakaoka Y, Angelini G, Ghorbel M. Gab1 Is Modulated by Chronic Hypoxia in Children with Cyanotic Congenital Heart Defect and Its Overexpression Reduces Apoptosis in Rat Neonatal Cardiomyocytes. *BioMed Research International*. 2015 (2015), Article ID 718492 (8 pages)
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/718492>. Epub 2015 May 19. (査読有)
 6. 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. doi: 10.1073/pnas.1424774112. Epub 2015 May 4. (*corresponding author) (査読有)
 7. Arita Y, Nakaoka Y*, Otsuki M, Higuchi K, Hashimoto-Kataoka T, Yasui T, Masaki T, Ohtani T, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K, Komuro I, Sakata Y. Cytokine storm after cessation of tocilizumab in a patient with refractory Takayasu arteritis. *Int J Cardiol*. 2015 Mar 28;187:319-321. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.399. (*corresponding author) (査読有)
 8. Terao C, Matsumura T, Yoshifuji H, Maejima Y, Nakaoka Y, Takahashi M, Amiya E, Tamura N, Nakajima T, Origuchi T, Matsukura M, Kochi Y, Ogimoto A, Yamamoto M, Takahashi H, Nakayama S, Saito K, Wada Y, Narita I, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Omura K, Atsumi T, Tanemoto K, Miyata T, Kuwana M, Komuro I, Tabara Y, Ueda A, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Takayasu arteritis and ulcerative colitis-high concurrence ratio and genetic overlap. *Arthritis & Rheumatol*. 2015 May; 67(8): 2226-2232. doi: 10.1002/art.39157. (査読有)
 9. Kizu T, Yoshida Y, Furuta K, Ogura S, Egawa M, Chatani N, Hamano M, Takemura T, Ezaki H, Kamada Y, Nishida K, Nakaoka Y, Kiso S, Takehara T. Loss of Gab1 adaptor protein in hepatocytes aggravates experimental liver fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 308(7):G613-24, 2015. doi: 10.1152/ajpgi.00289.2014. Epub 2015 Jan 23 (査読有)
- [学会発表] (計 12 件)
1. 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」; 肺高血圧症における Interleukin-6/interleukin-21 シグナル軸の役割. 中岡良和. 2017 年 3 月 29 日 アクトシティ浜松
 2. The 18th International Vasculitis & ANCA Workshop in Tokyo. Evening seminar "Update on Large Vessel Vasculitis" Nakaoka Y. 26 March, 2017; Ito International Research Center The University of Tokyo.
 3. 第 24 回日本血管生物医学会総会 シンポジウム; Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis plays a critical role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. 中岡良和. 2016 年 12 月 10 日 長崎ブリックホール
 4. 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. 中岡良和. 2016 年 11 月 30 日 パシフィコ横浜
 5. 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. Nakaoka Y, et al. 2016 年 11 月 13 日 ワシントン DC(米国)
 6. 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；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。中岡良和。2016年10月2日 京王プラザホテル（東京）
7. 第2回 J-ISCPC(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。中岡良和。2016年6月26日 阿波観光ホテル
 8. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会シンポジウム；大型血管炎の診療ガイドライン。中岡良和。2016年4月21日 パシフィコ横浜
 9. 第21回日本遺伝子治療学会学術集会（血管生物医学会合同シンポジウム・血管生物学のフロンティア）
「Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension」中岡良和。2015年7月25日 大阪国際会議場
 10. 日本NO学会アフタヌーンセミナー
「炎症制御で血管病を治療する」中岡良和。(2015年6月27日千里ライフサイエンスセンター)
 11. 日本血管生物医学会春季特別シンポジウム「Angiopoietin-1 derived from myocardium is essential for coronary vein formation in the developing heart」中岡良和。(2015年5月13日大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂)
 12. 日本循環器学会 会長特別企画シンポ・心臓の発生と再生「The Role of Angiopoietin-1 in Coronary Venogenesis in the Developing Heart」中岡良和。(2015年4月25日、大阪国際会議場)

〔図書〕（計4件）

1. 循環器病研究の進歩。中岡良和、「炎症性シグナルによる肺高血圧症の病態形成機構」p.74-80、協和企画（株）、2016年
2. Annual Review 2016 循環器。中岡良和他、「冠動静脈形成の分子機構」p.30-37。；中外医学社、2016年
3. 発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）～遺伝子異常の解析から新規治療の臨床・開発まで～。中岡良和他、「PNHの肺高血圧症」p.120-133、医薬ジャーナル社、2015年
4. 循環器用語ハンドブック（第3版）中岡良和他；メディカルレビュー社、2015年

〔産業財産権〕

特になし

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ

http://10.1.2.47/res/divisions/vascular_physiology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中岡 良和 (NAKAOKA YOSHIKAZU)
国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号：90393214

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

白井 幹康 (SHIRAI MIKIYASU)
国立循環器病研究センター・研究所・特任
研究員
研究者番号：70162758

保仙 直毅 (HOSEN NAOKI)

大阪大学大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10456923

(4) 研究協力者

なし