

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K19101
研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧症モデルマウスにおける内皮間葉転換の肺血管リモデリングへの作用
研究課題名(英文) EndMT contributes to the formation of pulmonary vascular endothelial lesion in PAH
研究代表者
西村 倫太郎 (Nishimura, Rintaro)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：00756091
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症の特徴とされる内膜病変を形成するSugen5416+低酸素暴露(Su+Hypo)モデルにおいて、フローサイトメトリーや免疫組織染色によりEndMTの定量化・局在の検討を行ったところ、低酸素暴露単独モデルのSMA+/CD31+CD45- cells(内皮マーカーが残存したEndMT)が一過性に微増するのみであるのに対し、Su+Hypoモデルにおいては持続的に増加した。遺伝子改変マウスを用いた細胞追跡実験では、内皮マーカーが消失するEndMTは両モデルで認めており、内膜病変形成には内皮機能を維持したPVECsのEndMTが関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の肺動脈性肺高血圧症(PAH)の治療薬は過剰な肺血管収縮を標的とした肺血管拡張薬であるが、肺血管を構成する細胞群の異常増殖や形質変化に伴う機能不全が病態形成に深く関与し、新たな治療標的となり得る。内皮間葉転換(EndMT)は間葉系細胞の供給源として作用するのみではないと考えられる。PAHにおいてEndMTが直接的な間葉系細胞増殖に寄与するのか、機能的に作用しAngiogenesis等を誘導するのかを検討することで、内膜病変を中心としたPAHの病態メカニズムが明らかになり、ひいては新規治療法の開発に結び付けることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Endothelial to mesenchymal transition (EndMT) is defined as the acquisition of mesenchymal characteristics by the endothelium. It has been implicated in pathogenesis and progression of pulmonary arterial hypertension (PAH). Exposure to Sugen/Hypoxia induced cell proliferation and expression of progenitor cell markers such as CD133 in pulmonary vascular endothelial cells (PVECs). Moreover, partial EndMT cells (SMA+/CD31+CD45-) were significantly increased in this model compared with hypoxic mice, although complete EndMT cells which lose characteristics of PVECs were confirmed equally in both models. The partial EndMT cells represent feature of progenitor cells prominently. These cells could contribute to the pathogenesis of PAH, especially in intimal lesion.

研究分野：肺循環疾患

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 内皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺動脈性肺高血圧症(PAH)の病態

PAH は肺血管の機能的・構造的変化(過剰な肺動脈収縮、内膜・中膜肥厚等による肺動脈リモデリング)により肺血管抵抗の上昇を来す難治性疾患であり、治療としては肺血管拡張薬が主体であるが、リモデリング抑制も重要な治療標的となりうる。血管構造や機能の維持に重要な役割を担う肺血管内皮細胞(PVECs)の機能不全や線維芽細胞・平滑筋細胞等の間葉系細胞の活性化がリモデリングに関与する (Morrell et al. J Am Coll Cardiol. 2009)。PVECs の機能不全は過剰な細胞増殖や不完全な Angiogenesis を誘導するとされ、ヒト PAH 内膜病変の特徴の一つである叢状病変が形成される (Mandegar et al. Microvasc Res. 2004)。各肺血管構成細胞間にはクロストークが存在し、細胞の形質変化や分泌因子を介した作用が病態に関与するとされるが、メカニズムは解明されていない。

(2) 組織発生・線維化疾患における EndMT

間葉系細胞の起源は、(1)組織常在性間葉系細胞の増殖、(2)骨髄由来細胞の遊走・分化とされてきたが、新たに(3)非間葉系細胞の形質変化が認識されている (McAnulty et al. Int J Biochem Cell Biol. 2007)。内皮細胞が間葉系細胞へ転換する内皮間葉転換 (EndMT) は線維化疾患へ関与し (Piera-Velazquez et al. Am J Pathol. 2011)、プレオマイシン投与マウスでは、肺の線維芽細胞のうち 16% が内皮細胞由来であった (Hashimoto et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010)。EndMT の研究は線維化疾患中心に進められ、免疫組織染色による EndMT の証明や Tgf シグナルにおける制御メカニズムの解析が主体であった。近年では Angiogenesis 等の線維化以外への関与も報告され、間葉系細胞の供給源以外にも周辺細胞の活性化等の役割が示唆されるが、その機序は不明である。

(3) 肺高血圧症動物モデルにおける肺血管構成細胞の動態

PAH の古典的動物モデルである低酸素暴露モデルでは、肺血管内膜の形態的变化に乏しいが (Stenmark et al. Circ Res. 2006)、我々は同モデルにおける PVECs の著明な増殖能亢進を確認した (Nishimura et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015)。近年 Su+Hypo モデルでは、叢状病変を含めた内膜病変形成が認識され (Abe et al. Circulation. 2010)、我々も PVECs 数増加がより顕著かつ持続性であることを確認した。共に PVECs が増加するも、増殖形態や発現マーカー、血管形成能は異なり、PVECs の形質の違いが病態に影響する可能性が示唆される。また、PVECs の過剰増殖は、肺血管リモデリングや前述の Angiogenesis を想起させ、実際に PAH の病態形成には、叢状病変に限らず機能障害を伴う Angiogenesis が関与するとされている (Voelkel et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014)。

(4) 肺高血圧症と EndMT

肺高血圧症動物モデルにおいて、EndMT が報告されたが (Ranchoux et al. Circulation. 2015)、定量化は行われず、他細胞群への影響や Angiogenesis を含めた病態への寄与・そのメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト PAH に最も近いとされる Sugen5416 (VEGFR inhibitor)+低酸素暴露 (Su+Hypo) マウスを用い、PVECs の EndMT を含めた細胞機能変化が如何に PAH の病態 (肺動脈リモデリング) へ影響するかを解析し、新規治療の可能性を探索する。

3. 研究の方法

本研究では wild type マウスに加え、内皮細胞由来の細胞 (Tie2 陽性細胞) に GFP が発現するトランスジェニックマウス (Tie2-GFP マウス) を使用する。低酸素暴露マウスは Normoxia (Control), Hypoxia (O₂ 10%) 1~3 Week (W)、Su+Hypo マウスは既報 (Vitali et al. Pulm Circ. 2014) に準じ Su5416 20mg/kg 毎週投与+Hypoxia 1~3W で解析する。

(1) フローサイトメトリー (FCM) による肺構成細胞の解析 (EndMT 陽性細胞を含む)

細胞増殖能の解析のため事前に BrdU を投与する。両モデルマウスの肺を摘出し、細胞分散を行った後に構成細胞同定のための多重染色 (CD31, CD45, CD326, SMA, Vimentin, CD34, CD133, BrdU, etc) を行う。CD31+CD45- cell を PVECs、CD326+/CD31-CD45- cell を上皮細胞、SMA+/CD326-/CD31-CD45- cell を平滑筋細胞と定義し、SMA+/PVECs を EndMT 細胞とする。

(2) EndMT 細胞における血管内皮前駆細胞マーカーの発現

EndMT が Angiogenesis に関与するとの報告もあるため、上記 EndMT 細胞における CD34, CD133, c-kit 等の前駆細胞マーカーの発現を FCM にて評価する。

(3) サイトスメア、免疫組織染色での EndMT 確認

Magnetic cell sorting により PVECs を単離し、サイトスメアを作成する。CD31, CD45, SMA, Vimentin, S100A4 抗体による免疫染色を行い、EndMT 陽性細胞の存在を確認する。また、肺組織の凍結切片を前述の抗体で染色し、EndMT の局在を定量的に解析する。

(4) トランスジェニックマウスを用いた cell lineage 解析

Tie2-GFP マウスを用い、GFP 陽性 (血管内皮細胞由来) の線維芽細胞・平滑筋細胞や partial EndMT 細胞の局在等を評価する。具体的には前述の FCM や免疫組織染色にて解析する。

(5) EndMT 細胞の起源

骨髄細胞にのみ GFP が発現したマウスを作成し、上記 FCM にて EndMT 細胞が骨髄由来か組織常

在性細胞かを確認する。

(6) in vitroでの血管形成能評価

我々は、ヒト PVECs を Sugen 存在下で培養することにより、EndMT 細胞への形質転換が生じることを既に明らかにしている(Sakao et al. FASEB J. 2007)。この実験系を用い、EndMT 細胞によるコロニー形成能や管腔形成能等の血管形成能を評価する。

同細胞群の培養におけるメディウム(conditioned medium)を回収し、分泌因子の解析や平滑筋細胞・上皮細胞等への影響(細胞増殖、形質変化)を検討する。

4. 研究成果

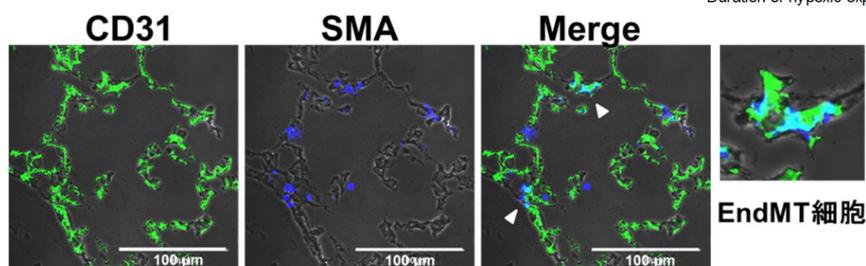
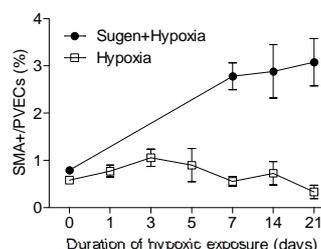
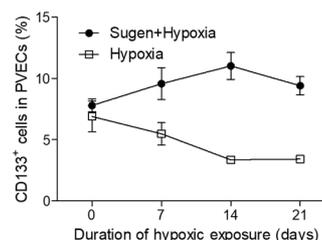
(1) モデルマウス毎の PVECs 増殖能・幹細胞マーカーの発現
低酸素曝露マウス、Su+Hypo マウスいずれにおいても、曝露 2 週間程度から PVECs の増加を確認した。BrdU による細胞増殖能の評価では、曝露 1 週間での急激な増殖能亢進・その後の定常化を認めた。

一方で、幹細胞マーカーである CD133 の陽性率は Su+Hypo マウスの PVECs のみで上昇した。

(2) 両モデルにおける EndMT 定量化・局在

PVECs の形質検討において、間葉系細胞のマーカーである SMA 陽性の PVECs を両モデルで確認した。しかしながら、同細胞群の割合や持続性に明らかな差を認めた。また、ヒト PVECs を Sugen 存在下に培養することでも EndMT を確認した。

FCM にて解析した上記の結果は、組織の免疫染色でも同様の結果が得られ、EndMT 細胞の局在は末梢肺動脈から毛細血管に優位であった。



(3) EndMT 細胞の起源

検出した EndMT 細胞が骨髄由来細胞の形質変化である可能性を検討するため、骨髄細胞のみに GFP が発現したキメラマウスを作成した。

このキメラマウスに対し Su+Hypo 刺激を加えたところ、wild type マウスと同様に EndMT 細胞を認めたが、これらの細胞群は GFP 陰性であり、骨髄由来ではなく組織常在性の細胞由来であることが示された。

(4) EndMT 細胞の増殖能・細胞マーカー発現

BrdU を用いた EndMT 細胞の増殖能評価では、通常の PVECs における BrdU 陽性率のピークが 10% 程度に対し、EndMT 細胞では約 30%まで上昇し、著明な増殖能亢進を認めた。

これらの細胞群では CD133 や CD34 等の幹細胞マーカーの陽性率も高く、幹前駆細胞性を示した。

(5) Tie2-GFP マウスでの細胞追跡

内皮細胞マーカーである Tie2 が陽性の細胞に GFP が発現した遺伝子改変マウスを用い、フローサイトメトリーでの解析を施行した。低酸素曝露マウス、Su+Hypo マウスいずれでも GFP 陽性の間葉系細胞(CD31 が陰性化し完全に間葉系細胞に形質変化した PVECs)を確認し、それらの細胞群の割合は両モデルで同程度であった。

(6) in vitroでの検討

ヒト肺動脈内皮細胞を培養し、低酸素単独、Su+Hypo 刺激を加えると、in vivo の結果同様に後者でより EndMT 細胞の割合が増加した。一方で各刺激を加えた細胞の管腔形成能を比較すると、Su+Hypo 群の管腔形成が不良であった。

両モデルにおける PVECs の増殖能亢進は同程度であったが、幹前駆細胞マーカーを含めた細胞マーカーの発現は異なっていた。モデル間の内膜病変の差異を考慮すると、これらの病変形成に PVECs の増殖形態・形質変化が関与する可能性が示された。

Su+Hypo モデルでは内皮形質が残存した EndMT(Partial EndMT)が増加しこの細胞群はさらに強い幹前駆細胞性を示した。一方で、in vitro の検討では幹細胞性を示すはずの Su+Hypo 群で管腔形成能が低下しており、PAH における内膜病変を形成しうる不完全な angiogenesis を誘導している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Suzuki T, Carrier EJ, Talati MH, Rathinasabapathy A, Chen X, Nishimura R, Tada Y, Tatsumi K, West J.	4. 巻 314(1)
2. 論文標題 Isolation and characterization of endothelial-to-mesenchymal transition cells in pulmonary arterial hypertension.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	6. 最初と最後の頁 118-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajplung.00296.2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato F, Sakao S, Takeuchi T, Suzuki T, Nishimura R, Yasuda T, Tanabe N, Tatsumi K.	4. 巻 313(5)
2. 論文標題 Endothelial cell-related autophagic pathways in Sugen/hypoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	6. 最初と最後の頁 899-915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajplung.00527.2016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki T, Tada Y, Nishimura R, Kawasaki T, Sekine A, Urushibara T, Kato F, Kinoshita T, Ikari J, West J, Tatsumi K.	4. 巻 310(11)
2. 論文標題 Endothelial-to-mesenchymal transition in lipopolysaccharide-induced acute lung injury drives a progenitor cell-like phenotype.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	6. 最初と最後の頁 1185-1198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajplung.00074.2016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sekine A, Nishiwaki T, Nishimura R, Kawasaki T, Urushibara T, Suda R, Suzuki T, Takayanagi S, Terada J, Sakao S, Tada Y, Iwama A, Tatsumi K.	4. 巻 310(11)
2. 論文標題 Prominin-1/CD133 expression as potential tissue-resident vascular endothelial progenitor cells in the pulmonary circulation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	6. 最初と最後の頁 1130-1142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajplung.00375.2014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto K, Nishimura R, Kato F, Naito A, Suda R, Sekine A, Jujo T, Shigeta A, Sakao S, Tanabe N, Tatsumi K	4. 巻 299
2. 論文標題 Protective role of endothelial progenitor cells stimulated by riociguat in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 263-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2019.07.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 4件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 西村倫太郎、鈴木敏夫、関根亜由美、漆原崇史、加藤史照、坂尾誠一郎、多田裕司、田邊信宏、巽浩一郎
2. 発表標題 肺高血圧症モデルマウスにおける内皮細胞の形質変化と病態形成についての検討
3. 学会等名 第56回日本呼吸器学会学術講演会(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西村倫太郎
2. 発表標題 群肺高血圧は本当に 群か? ~肺血管傷害に対する修復・再生~
3. 学会等名 第59回 日本呼吸器学会学術講演会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村倫太郎
2. 発表標題 肺高血圧症モデルにおける肺血管内皮細胞の形質変化の解析
3. 学会等名 第59回 日本呼吸器学会学術講演会(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西村倫太郎、巽浩一郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 20
3. 書名 肺高血圧症	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----