

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15967

研究課題名(和文) 膠原病性肺高血圧症における炎症・組織リモデリングの解明に向けた免疫組織学的検討

研究課題名(英文) Inflammation and tissue remodeling of pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease - Immunohistochemical analysis

研究代表者

大郷 恵子(Ohta-Ogo, Keiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：30601827

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)：本研究では、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の肺組織における炎症性微小環境を明らかにするため、剖検例を用いて病理学的に評価した。組織学的に強皮症以外では特発性肺動脈性肺高血圧症類似の形態を基本とし肺静脈病変を伴う場合が多く、強皮症では肺静脈閉塞症類似の形態をとることが典型的であった。炎症に関しては、肺動脈に加え肺静脈にも炎症を高頻度に認めることが特徴であった。一方、炎症部のTリンパ球とマクロファージのタイプは膠原病性とそれ以外で類似し、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、M2マクロファージ、炎症性サイトカイン、ケモカインレセプターといった特徴から共通の炎症性微小環境が疾患の進展に重要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において得られた、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症が、組織学的に強皮症と強皮症以外でやや異なる形態をとること、しかし、いずれも肺動脈のみならず肺静脈の炎症も伴うことに特徴付けられるのは治療を考慮する上で重要なポイントである。今回確認された免疫担当細胞の特徴から想定される炎症性微小環境は、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症に特異的なわけではなく、特発性肺動脈性肺高血圧症および肺静脈閉塞症とも共通したものであり、炎症をターゲットとした新規薬物治療に向けたヒトにおける基礎となる知見として意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, autopsy cases were pathologically evaluated to clarify the inflammatory microenvironment in the lung tissue of pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease (CTD-PAH). Histologically, the lesions in the lung tissues of patients other than systemic sclerosis were basically similar to those of idiopathic PAH and were often accompanied by pulmonary vein lesions, while systemic sclerosis typically had a pulmonary veno-occlusive disease (PVOD)-like morphology. Inflammation of the pulmonary veins as well as the pulmonary arteries was a characteristic feature of CTD-PAH. On the other hand, T lymphocyte and macrophage types in the inflammatory zone were similar between the CTD-PAH and idiopathic PAH or PVOD. The inflammatory microenvironment was implicated as a common contributor in the development of the conditions, based on the characteristics of helper T cells, cytotoxic T cells, M2 macrophages, proinflammatory cytokines, and chemokine receptors.

研究分野：Cardiovascular pathology

キーワード：pulmonary hypertension collagen disease inflammation T-lymphocyte macrophages immunohistochemistry

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、明らかな原因なく肺動脈圧・肺血管抵抗の高度の上昇が起こり、右心不全から死に至る厚労省の指定難病である。膠原病では高率に肺動脈性肺高血圧症の合併がみられるが、特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) の特効薬である血管拡張薬に抵抗性を示し予後不良のため、病態の解明と新規治療の探索が急務である。膠原病では組織学的に肺動脈のみならず肺静脈にも閉塞性病変がおよびやすく、肺静脈閉塞症に類似する点があげられているがその病態はよく調べられていない¹⁾。また肺高血圧症の予後においては、上昇した肺動脈圧・肺血管抵抗に対して右室が適応しているかも重要な因子となる。これまで我々は膠原病 (結合組織病) に伴う肺動脈性肺高血圧症例 (CTD-PAH) で、1) 血中炎症性サイトカインが高値である²⁾、2) 剖検肺で肺動脈・肺静脈共に内膜肥厚を伴う閉塞性病変がありしばしば炎症を伴う、など治療抵抗性をきたす要因となる可能性のある病態について調べてきた。一方、詳しい炎症細胞のプロファイルについては検討されていなかった。

2. 研究の目的

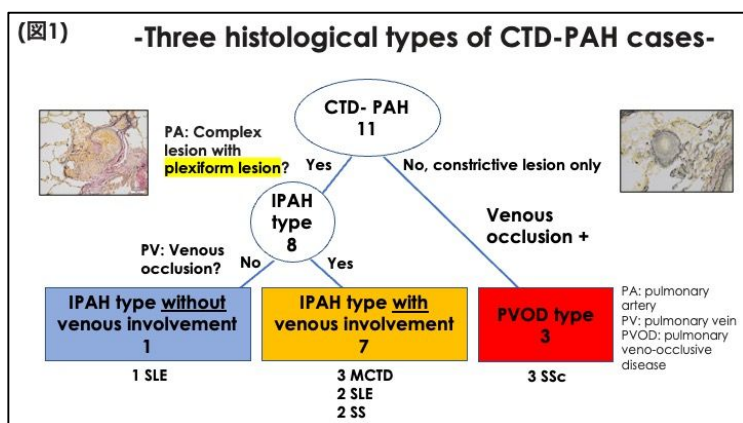
本研究は当センターの肺高血圧症剖検例を用いて、通常染色による観察に加え免疫組織化学的手法を用いた多面的評価により、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症における炎症性微環境を明らかにすることを目的とする。病変の特徴を調べ、炎症のタイプ・組織リモデリングがどのように肺血管病変と心病変に関わっているか、また、膠原病によらない特発性肺動脈性肺高血圧症および肺静脈閉塞症 (PVOD) との類似点・差異について調べ、治療戦略へつなげることを目指している。

3. 研究の方法

当センター病理部に保存されている、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症剖検例 (11 例) を対象とした。肺組織のヘマトキシリンエオジン染色、マッソントリクローム染色、エラスチカ・ワンギーソン染色が施されたガラススライド標本を用いて組織学的に詳細に観察し、肺動脈病変の程度 (Heath-Edwards 分類) と壊死性動脈炎の有無や炎症細胞浸潤、肺静脈病変の合併の頻度、静脈炎の有無について評価した。また、各種抗体を用いて免疫組織化学的手法により主に免疫担当細胞のプロファイルを調べた。比較対照として特発性肺動脈性肺高血圧症例 (14 例)、肺静脈閉塞症例 (4 例) の肺組織を用いた。また心筋に関しては、特に予後の悪い強皮症症例 (3 例) と特発性肺動脈性肺高血圧症例を比較検討した。

4. 研究成果

膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症剖検例 (11 例) は平均年齢 48 ± 13 歳、全例女性で、特発性肺動脈性肺高血圧症の平均年齢 34 ± 10 歳 (女性 8/14 例)、肺静脈閉塞症例の平均年齢 35 ± 12 歳 (女性 2/4 例) と比較してやや年齢が高く女性が多かった。膠原病の内訳は、全身性強皮症 (SSc) 3 例 (1 例は混合性結合組織病との合併)、混合性結合組織病 (MCTD) 3 例、全身性エリテマトーデス (SLE) 3 例、シェーグレン症候群 (SS) 2 例であった。



膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症は、組織学的に特徴的な Heath-Edwards 分類 4 度 (叢状病変) 以上を有する特発性肺動脈性肺高血圧症に類似する症例は 8 例であった。ただしうち 7 例は肺静脈閉塞病変を合併していた。残りの 3 例は叢状病変を示さず肺静脈閉塞が高度な肺静脈閉塞症に類似した病変で全て強皮症症例であった。すなわち、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症では、11 例中 10 例と高率に肺静脈閉塞病変が見られた (図 1)。

一方、特発性肺動脈性肺高血圧症症例でも、肺静脈閉塞病変の合併が 14 例中 10 例に認められ稀ではなかった (図 2)。

肺血管の炎症に関して細かく見ていくと、特発性肺動脈性肺高血圧症では動脈内膜炎 (endarteritis) に加え、中膜を破壊している壊死性動脈炎を 4 例に認めたが、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症では、壊死性動脈炎は明らかでなく動脈内膜炎が全症例で見られた (図 2)。一方、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の肺静脈には、特発性肺動脈性肺高血圧症に比べ、より多

くの症例で細静脈炎が認められた。肺動脈内膜炎と細静脈炎を広く認めることが膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の特記すべき一つの特徴と考えられた。肺血管周囲の炎症細胞浸潤や3次リンパ組織 (tertiary lymphoid structures) の発達もしばしば見られ、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症でより高度ではないかと推測したが、実際には特発性肺動脈性肺高血圧症と肺静脈閉塞症でも多く認めた。

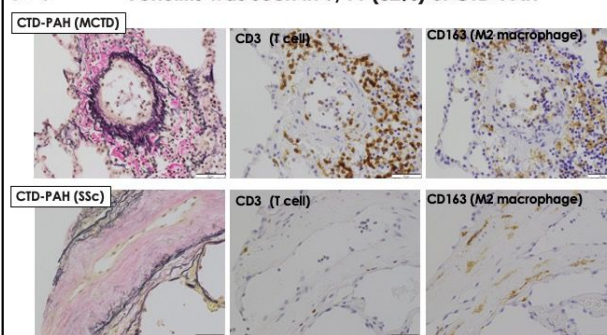
(図2) -Comparison of histological findings of CTD-PAH and IPAH-

	CTD-PAH (n=11)	IPAH (n=14)
Histological type		
IPAH type without PV involvement	1 (9%)	4 (29%)
IPAH type with PV involvement	7 (64%)	10 (71%)
PVOD type	3 (27%)	NA
	91%	
Pulmonary arterial remodeling		
Complex lesion with plexiform lesions	8 (73%)	14 (100%)
SSc (n=3)	0 (0%)	NA
Non-SSc (n=8)	8 (100%)	NA
Arteritis		
Necrotizing	0 (0%)	4 (29%)
Endoarteritis	11 (100%)	14 (100%)
Pulmonary venous remodeling		
PV occlusion by intimal fibrosis	10 (91%)	10 (71%)
Venulitis	9 (82%)	6 (42%)
Perivascular inflammatory infiltrate	11 (100%)	14 (100%)

免疫染色の結果、血管周囲や内膜への浸潤炎症細胞は、CD3 陽性 T リンパ球と CD68 陽性マクロファージの両方を含んでいた。CD20 陽性 B リンパ球については、3次リンパ組織が主体であるが、一部は血管病変部にも見られた。T リンパ球のサブセットは、CD4 陽性 T リンパ球 (ヘルパー T 細胞) と CD8 陽性 T リンパ球 (細胞傷害性 T 細胞) が混在して見られた。マクロファージは CD163 陽性マクロファージ (M2) を多く認めた。これらの所見は、肺動脈病変、肺静脈病変いずれにも共通し、また膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症とそれ以外でも共通していた。

例として、図3 上段に血管内外に多数のリンパ球と CD163 陽性マクロファージが見られた、混合性結合組織病に伴う肺静脈炎の組織像を示す。一方、下段は強皮症症例で見られた高度の内膜肥厚による肺静脈閉塞病変である。このような病変では炎症は明らかでなくリンパ球もわずかであるが、CD163 陽性マクロファージが肥厚内膜内に複数存在していることも今回の研究で判明した。

(図3) Venulitis was seen in 9/11 (82%) of CTD-PAH



M2 マクロファージへの極性化はインターロイキン 6 (IL-6) の作用に関連してヒト特発性肺動脈性肺高血圧症および動物モデルで見られることを我々の共同研究者らが報告³⁾しており、今回、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症で CD163 陽性マクロファージが優位に多数見られたことは、同様の病態が基盤にあることを示唆している。同報告における、IL-6 の作用によりヘルパー T 細胞の一種である Th17 細胞から分泌されるインターロイキン 21 (IL-21) が M2 極性化に関わり肺動脈平滑筋細胞の増殖に関与するとの知見から、Th17 を同定するための IL-17 と、IL-21 の免疫染色を行った。その結果、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症でもそれ以外でも、血管病変内外や一部3次リンパ組織に IL-17 陽性細胞および IL-21 陽性細胞が確認され、IL-6/IL-21 シグナル軸が、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに血管内外に浸潤・集積するリンパ球の一部は、Th1 関連ケモカイン受容体の一つである CCR5 陽性を示しており活性化された T リンパ球の病変への動員が確認できた。CCR5 のリガンドであるケモカイン CCL5 (RANTES) が肺動脈性肺高血圧症組織で高発現しているとの報告があり、関連が推測される。

以上より、本研究における膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の剖検肺は、強皮症以外では肺静脈病変を伴う特発性肺動脈性肺高血圧症類似の形態、強皮症では肺静脈閉塞症類似の形態をとることが典型的で、肺動脈のみならず肺静脈の炎症も伴うことに特徴付けられた。今回確認された肺組織における炎症性微小環境は、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症に特異的ではなく、特発性肺動脈性肺高血圧症および肺静脈閉塞症とも共通しており、肺高血圧症における炎症をターゲットとした新規薬物治療に向けたヒトでの知見として有用と考えられる。一方で、膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症で肺静脈が侵され易い理由は依然不明であり、その解明には異なるアプローチが必要と考えられた。

最後に最も予後不良とされる強皮症症例では、特発性肺動脈性肺高血圧症と比べて、増大した後負荷に対する右室の肥大反応が不十分であるとの仮説に基づき比較検討を行った。その結果、強皮症症例では、年齢が高い以外は臨床的特徴に差がないにも関わらず、心重量が軽く右室自由壁の壁厚が薄かった。組織学的にも強皮症症例では右室自由壁の心筋細胞径が小さく肥大反応が不良と考えられ、全例で右室の線維化が高度な上に、左室にも中等度～高度の線維化を認めた。線維化に一致してテネイシン C の発現を認め炎症の病態への関与が考慮された。

引用文献

1. Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, et al. Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum Pathol.*2007;38:893-902.
2. Itoh T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H, et al. Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology.* 2006;11:158-63.
3. Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, et al. Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E2677-86.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大郷 恵子、大郷 剛	4. 巻 5
2. 論文標題 病理でみる肺高血圧症	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 411-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 大郷 恵子	4. 巻 20
2. 論文標題 肺高血圧の病理を知る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 心エコー	6. 最初と最後の頁 998-1007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 大郷 恵子、植田 初江、大郷 剛	4. 巻 24
2. 論文標題 肺高血圧症の病理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart View	6. 最初と最後の頁 213-220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 大郷 恵子	4. 巻 37
2. 論文標題 病理学および病理生物学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 220-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大郷恵子
2. 発表標題 肺血管の病理：臨床へのフィードバックに備える
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会：日本肺病理学会(JPPS) コンパニオンミーティング（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大郷恵子
2. 発表標題 病理でみる肺高血圧症 ー病理所見を臨床に活かすためにー
3. 学会等名 第6回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 / 第27回日本小児肺循環研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大郷恵子
2. 発表標題 Pulmonary Vascular Remodeling and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Connective Tissue Diseases
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大郷 恵子, 大郷 剛, 植田 初江
2. 発表標題 前毛細血管性肺高血圧症と後毛細血管性肺高血圧症の病理学的特徴
3. 学会等名 第66回 日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大郷 恵子, 大郷 剛, 松本 学, 池田 善彦, 植田 初江
2. 発表標題 肺高血圧症の病理
3. 学会等名 第40回 心筋生検研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 大郷 恵子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 448
3. 書名 非腫瘍性疾患病理アトラス 肺	

1. 著者名 大郷 恵子, 大郷 剛, 植田 初江, 畠山 金太	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)日本臨床社	5. 総ページ数 417
3. 書名 別冊呼吸器症候群II	

〔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
---------	---------