

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08644

研究課題名(和文)肺動脈性肺高血圧症における組織常在マクロファージの役割と治療応用

研究課題名(英文) Role and therapeutic application of tissue-resident macrophages in pulmonary arterial hypertension

研究代表者

重田 文子 (Shigeta, Ayako)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70436369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：予定していたマクロファージ特異的BMPR2欠損マウスの繁殖が不成功に終わり、マクロファージ特異的BMPR2ヘテロノックアウトマウスでの結果のみになってしまった。ヘテロにノックアウトしても肺血行動態や肺内の組織マクロファージや単球比率に有意な影響は及ばなかった。ただCsf1rcr; BMPR2f/+マウスでは、恒常性維持・創傷治癒・血管新生・炎症抑制を担う組織定住マクロファージの比率が低下する傾向、血管内の恒常維持の役割を担うPatrolling Ly6Chlow monocyte比率が上昇する傾向が認められ、これらが肺動脈性肺高血圧症病態の促進と制御に働いている可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予定していたマクロファージ特異的BMPR2欠損マウスの繁殖が不成功に終わり、マクロファージ特異的BMPR2ヘテロノックアウトマウスでの結果のみになってしまった。マクロファージ特異的BMPR2遺伝子ヘテロノックアウトマウスでは肺動脈圧上昇所見は認めておらず、肺動脈性肺高血圧症病態を反映したモデルとは言い難い。そのため今回は組織定住マクロファージ低下が病態を促進させている可能性を示唆するのみに留まっている。既報で肺動脈圧上昇が認められているホモノックアウトマウスによる検証を進められれば、肺動脈性肺高血圧症病態形成における組織定住マクロファージの働きをより明確できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The planned breeding of macrophage-specific BMPR2-deficient mice was unsuccessful. Therefore, we present only the result derived from macrophage-specific BMPR2 heterozygous knockout mice. Heterogeneous knockout did not significantly affect pulmonary hemodynamics and tissue macrophage or monocyte ratios in the lung tissue. However, in Csf1rcr; BMPR2f/+ mice, the ratio of tissue-resident macrophages, which are responsible for homeostasis, wound healing, angiogenesis, and suppression of inflammation, tends to decrease, and the ratio of Patrolling Ly6Chlow monocytes, which plays a role in maintaining intravascular homeostasis, tends to increase, suggesting that that these cells might promote and control the development of pulmonary arterial hypertension.

研究分野：肺循環

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 組織定住マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは、単球由来炎症性マクロファージ (Monocyte derived inflammatory macrophage: MoMF) と組織常在マクロファージ (Tissue resident macrophage: TrMF) に大別される。TrMF には、胎生期の卵黄嚢や胎児肝を起源として各組織に拡散し出生後も生涯に渡って組織に居続ける embryo-derived type と、骨髄幹細胞を起源として生後に組織内へ入り込んだ bone marrow-derived type がいる。いずれにせよ、これらはそれぞれの組織内で、自己複製をしながら周囲環境因子 (サイトカインや代謝産物等) によって各組織や局所環境に特異的な機能を獲得し、恒常性維持・創傷治癒・血管新生・炎症抑制において重要な役割を担っていることが近年明らかになってきている (Davies and Taylor, 2015; Ginhoux and Guilliams, 2016)。

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺動脈とその周囲組織の病変により肺血管抵抗の持続的上昇が生じ、結果として右心不全から死に至る難治性疾患の総称である (Galie et al., 2016)。PAH の血管病変部分には、内膜にて血管内皮細胞増殖、中膜にて平滑筋細胞の肥大と過形成、外膜にて線維芽細胞増殖が認められ (Tuder et al., 2013)、血管周囲の異常細胞増殖・炎症・異常血管新生・内皮間葉転換・アポトーシス耐性が PAH 病態へ関与していることが知られている (Boucherat et al., 2017)。そして、PAH 血管周囲には MoMF が集簇しており、これらが産生するロイコトリエン B4 は外膜線維芽細胞や肺動脈平滑筋細胞を異常増殖させ、MoMF の肺内への動員抑制は PAH 病態を改善させると報告されている (Tian et al., 2013; Voelkel et al., 2016) しかし、PAH 病態における肺 TrMF の関与は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PAH 肺内における肺 TrMF の動態・機能的特徴を明らかにする肺 TrMF の特異的機能に着目した PAH 治療戦略を探求する、である。TrMF 研究は近年飛躍的に広まり、組織や疾患環境特異的に恒常維持や病態抑制を担った TrMF が発見されている (Lavine et al., 2014; Satoh et al., 2013)。PAH 病態における肺 TrMF の働きは未だ知られていないが、TrMF の一般的機能である炎症抑制や血管新生促進は PAH 病態抑制因子である。PAH 血管周囲に認められる MoMF のコントロールが、血管リモデリング改善につながるとの見解はすでに報告されている (Rabinovitch et al., 2014) が、本研究は、周囲環境に応じ変化して病態抑制に関与することが予想される肺 TrMF に焦点を当てている点が独創的である。現在、PAH 治療の中心は、閉塞血管を部分的に拡張させることであり、病態の主である血管リモデリングの改善は期待できない。肺 TrMF が PAH の血管病変改善に働くのならば、血管リモデリング克服へ向けた PAH の新規治療法開発に結び付く大きな一歩となりえるだろう。肺 TrMF は PAH 病態下で特異的機能を獲得しているのか、病態を抑制させているのか、未だ明らかではない PAH 肺内の肺 TrMF について詳細に解析することが、PAH の病態自体を知ると共に PAH 創薬の新たな切り口になる。

3. 研究の方法

Wild-type C57BL6 へ胸部遮蔽下全身照射・ブスルファン投与の後に GFP マウスの骨髄を移植、8週間後には肺内マクロファージは 100% Recipient, 骨髄と血中 Monocyte は 100%

Doner の GFP 骨髄移植マウスが作成される(Misharin et al., 2017)。このマウスに VEGFR blocker (SU5416) 20mg/kg 腹腔内投与と 3 週間の 10%酸素暴露を行うことで GFP 骨髄キメラ PAH モデルマウスを作成する。作成後に右心カテーテルで右室収縮圧、摘出肺の病理像で PAH 血管病変、摘出心臓で右室重量/左室 + 心室中隔重量比を調べることで、作成した PAH 病変の程度を確認する。

4 . 研究成果

本研究は肺動脈性肺高血圧症発症病態における組織定住マクロファージの役割を明らかにすることを目的としている。当初は、胸部遮蔽下全身照射・プスルファン投与と VEGFR blocker (SU5416) 20mg/kg 腹腔内投与と 3 週間の 10%酸素暴露を用いることで GFP 骨髄キメラ肺動脈性高血圧症モデルマウスを作成予定であった。しかし、開始直後の研究結果と当科の人員不足を理由に上記モデルマウス作成による研究成果を挙げることが困難な状況になることが予想されたため、上記モデルマウスをトランスジェニックマウス(マクロファージ特異的 BMPR2 欠損マウス : Csf1rcrc; BMPR2f/f マウス)を用いることで研究を遂行する形に研究計画を変更した。マクロファージ特異的 BMPR2 欠損マウスでの解析により、肺動脈性肺高血圧症病態における組織定住マクロファージの役割をよりマクロファージに特化した形で進められると考えた。

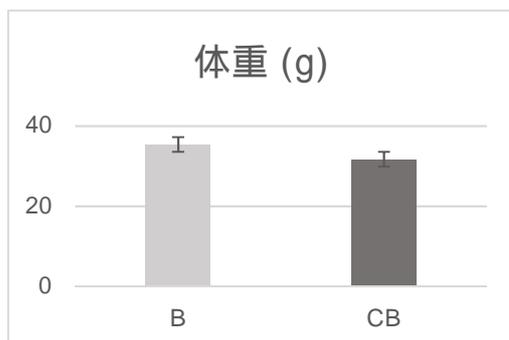
Csf1rcrc; BMPR2f/f マウスを作成するため、東京大学循環器内科より BMPR2 floxed マウスを譲受、業者より Csf1r-Cre マウスを購入して繁殖を開始、問題なく Csf1rcrc; BMPR2f/+ のヘテロマウスを作成できた。

2021 年度本学動物舎移動に伴い、当トランスジェニックマウスを一度精子凍結した上で移動を行った。凍結精子から本実験に必要な Csf1rcrc; BMPR2f/+ と BMPR2f/f を用いた Csf1rcrc; BMPR2f/f の作成を再開した。しかし繁殖させたマウス全て BMPR2floxed が入らない状態が続き、BMPR2f/+ のヘテロマウスすら入手することが出来なくなった。上記状況となったため、Csf1rcrc; BMPR2f/f マウスで予定していた本研究計画はほぼ進めることが出来なかった。

繁殖が成功した Csf1rcrc; BMPR2f/+ マウス(マクロファージ特異的に BMPR2 をヘテロにノックアウトしたマウス)とコントロールマウスの比較結果のみ以下に提示する。コントロールマウスとして BMPR2f/+ マウスを使用した。

(1) 体重の比較

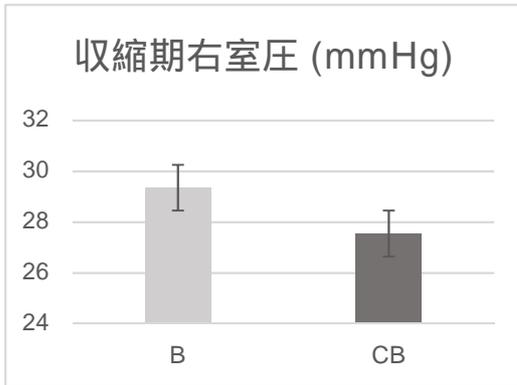
Csf1rcrc; BMPR2f/+ マウス (CB) の体重はコントロールマウス(BMPR2f/+マウス)と比べて有意な差は認められなかった。



Control : Csf1rcrc; BMPR2f/+
35.4 ± 0.9 : 31.8 ± 3.9 (g) p=0.39
それぞれ n=5

(2) 収縮期右室圧の比較

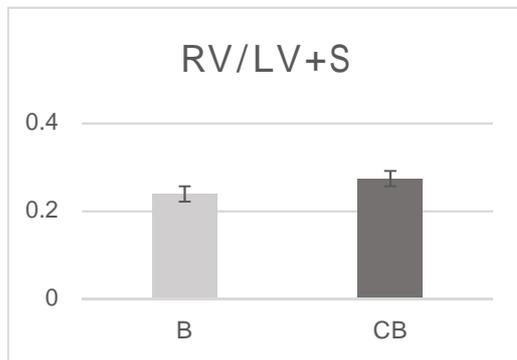
Csf1rcr; BMPR2f/+マウス (CB) の収縮期右室圧はコントロールマウス(BMPR2f/+マウス)と比べて有意な差は認められなかった。



Control : Csf1rcr; BMPR2f/+
29.4 ± 1.2 : 27.6 ± 2.4 (mmHg) p=0.53
それぞれ n=5

(3) 右室/左室 + 心室中隔重量比の比較

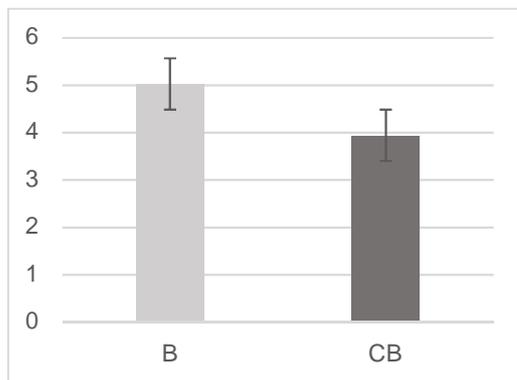
Csf1rcr; BMPR2f/+マウス (CB) の右室/左室 + 心室中隔重量比(RV/LV+S)はコントロールマウス(BMPR2f/+マウス)と比べて有意な差は認められなかった。



Control : Csf1rcr; BMPR2f/+
0.24 ± 0.27 : 0.27 ± 0.15 p=0.29
それぞれ n=5

(4) 肺胞マクロファージ比率の比較

既報に従い、肺組織を酵素処理して採取した単一細胞のうち、CD45+CD11c+auto を肺胞マクロファージと定義した。全単一細胞に対する肺胞マクロファージの比率は、Csf1rcr; BMPR2f/+マウス (CB) とコントロールマウス(BMPR2f/+マウス)間で有意差は認められなかった。



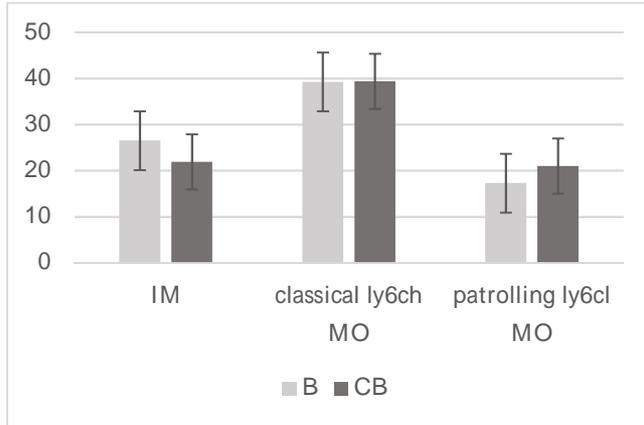
Control : Csf1rcr; BMPR2f/+
5.0 ± 0.7 : 3.9 ± 0.7 (%) p=0.29
Control: n=5,
Csf1rcr; BMPR2f/+ : n=4

(5) 間質マクロファージ、classical Ly6Chigh monocyte、patrolling Ly6Clow monocyte の比率の比較

既報に従い、肺組織を酵素処理して採取した単一細胞を下記のように定義した。

CD45+CD11c-F4/80+CD64+Ly6Cint → 間質マクロファージ
 CD45+CD11c-F4/80+CD64-Ly6Chigh → classical Ly6Chigh monocyte
 CD45+CD11c-F4/80+CD64-Ly6Clow → patrolling Ly6Clow monocyte

間質マクロファージ、classical Ly6Chigh monocyte、patrolling Ly6Clow monocyte の比率は Csf1rcr; BMPR2f/+マウス (CB) とコントロールマウス(BMPR2f/+マウス)間に有意差は認められなかった。



Control : Csf1rcr; BMPR2f/+マウス

Interstitial macrophage	26.5 ± 3.7 : 21.9 ± 5.4	p=0.49
Classical Ly6Chigh monocyte	39.2 ± 4.9 : 39.4 ± 6.2	p=0.98
Patrolling Ly6Chlow monocyte	17.3 ± 1.5 : 21.0 ± 0.6	p=0.07

Control: n=5,

Csf1rcr; BMPR2f/+: n=4

【Conclusion】

以上より、マクロファージ特異的に BMPR2 遺伝子をヘテロでノックアウトしても肺血行動態や肺内の組織マクロファージや単球比率に有意な影響は及ばなかった。ただ Csf1rcr; BMPR2f/+マウスでは、肺泡マクロファージや間質マクロファージといった組織定住マクロファージの比率が低下する傾向が認められ、恒常性維持・創傷治癒・血管新生・炎症抑制を担う組織定住マクロファージの低下が肺動脈性肺高血圧症病態形成に關与している可能性が示唆される。また Patrolling Ly6Chlow monocyte 比率が上昇する傾向が認められ、血管内皮細胞に沿って走行しながら血管内の恒常維持の役割を担う Patrolling Ly6Chlow monocyte を増やすことで肺動脈性肺高血圧症病態を制御している可能性が示唆される。マクロファージ特異的 BMPR2 遺伝子ヘテロノックアウトマウスでは肺動脈圧上昇所見は認めておらず、肺動脈性肺高血圧症病態を反映したモデルとは言い難い。そのため今回は上記可能性を考察するのみに留まっている。既報で肺動脈圧上昇が認められているホモノックアウトマウスによる検証を進められれば、肺動脈性肺高血圧症病態形成における組織定住マクロファージの働きをより明確できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	巽 浩一郎 (Tatsumi Koichiro) (10207061)	千葉大学・真菌医学研究センター・特任教授 (12501)	
研究分担者	坂尾 誠一郎 (Sakao Seiichiro) (80431740)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	

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