

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17292

研究課題名(和文) 周産期侵襲の肺動脈性肺高血圧の発症への関与：エピゲノムを介する分子機序

研究課題名(英文) Contribution of perinatal insults to the development of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

大矢 和伸 (Ohya, Kazunobu)

三重大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70835785

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)：研究の目的は、1周産期侵襲のラットPAHの増悪効果、2肺血管平滑筋の細胞生物学的特性とゲノムワイドのDNAメチル化変化の解明である。方法は、1母胎・新生児ラットの周産期低酸素暴露侵襲による遠隔期のSugen/Hypoxiaラットの肺高血圧増悪効果、2周産期低酸素暴露後遠隔期の培養血管平滑筋細胞の増殖促進・細胞死抑制と関連したゲノムワイドDNAメチル化の解析である。結果では、周産期低酸素は、Sugen/Hypoxiaラットの生命予後、肺動脈圧、右室肥大、肺血管閉塞性病変を悪化させた。培養肺動脈血管平滑筋細胞は、増殖能、炎症性サイトカイン産生能を、更新し、関連したDNAメチル化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的独自性と創造性は、1臨床的知見に基づき、母胎・新生児低酸素暴露刺激に着目した事、2肺高血圧モデルとして、最近報告され、本研究グループから既報のヒト類似PAHラットモデル(Am J Physiol 2015, PLoS One2015)を用いた事、3病変を構成する平滑筋細胞の細胞生物学的機序、網羅的遺伝子発現解析に加えて、網羅的DNAメチル化解析などエピゲノムに着目した点である。本研究結果により、1ヒト類似肺動脈性肺高血圧モデルの新規作成となり、病態解明、治療法開発に資する事、2肺高血圧患者の登録研究で、低出生体重児、母児の周産期合併症などの項目の追加を提案する。

研究成果の概要(英文)：The objectives of the study were 1) to elucidate the exacerbating effects of perinatal invasion on PAH in rats, and 2) to elucidate cell biological characteristics and genome-wide DNA methylation changes in pulmonary vascular smooth muscle. The methods were: 1) the exacerbating effect of perinatal hypoxic invasion of maternal and neonatal rats on pulmonary hypertension in Sugen/Hypoxia rats in the remote period, and 2) analysis of genome-wide DNA methylation in relation to accelerated proliferation and suppressed cell death in cultured vascular smooth muscle cells in the remote period after perinatal hypoxia exposure. Results showed that perinatal hypoxia worsened life expectancy, pulmonary artery pressure, right ventricular hypertrophy, and pulmonary vascular occlusive lesions in Sugen/Hypoxia rats. Cultured pulmonary artery vascular smooth muscle cells showed renewed proliferative capacity, inflammatory cytokine production capacity, and associated DNA methylation.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧 肺動脈性肺高血圧 動物モデル 周産期刺激 周産期医学 DoHAD仮説 エピゲノム変化 DNAMメチレーション

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧は、特発性、遺伝性ないし二次性に発症する原因不明の難治性疾患で、新規治療法開発には病態解明が重要である。近年、骨形成蛋白2型受容体(BMPR2)遺伝子異常が肺動脈性肺高血圧原因遺伝子として報告されるが、その保因者の発症率は20%と報告され、何らかのエピゲノムの関与が推測される。また、種々の周産期侵襲で生じる新生児肺高血圧の既往が、児の成人期の肺高血圧の危険因子とされ、今回、周産期侵襲を介した機序に着目した。

2. 研究の目的

(1) 周産期侵襲のラット肺動脈性肺高血圧の増悪効果

(2) 肺血管平滑筋の細胞生物学的特性とゲノムワイドのDNAメチル化状態

(3) BMPR2欠損ラット肺高血圧の増悪効果

を検討し、肺動脈性肺高血圧発症の機序、特にエピゲノムを介する分子機序を解明し、本症の治療標的の同定に資する事である。

3. 研究の方法

(1) 母胎・新生児ラットの周産期低酸素暴露侵襲による遠隔期のSugen/Hypoxiaラットの肺高血圧増悪効果：周産期の低酸素暴露により周産期低酸素暴露侵襲ラットを作成した。7週齢でSUGEN投与と低酸素暴露を行い15週齢のSugen/Hypoxiaラットを作成した。周産期低酸素暴露侵襲の有無にSugen/Hypoxia処置をかけ合わせた4群を作成し(N=40)、15週齢で血行動態と肺血管病変を解析した。

(2) 周産期低酸素暴露後遠隔期の培養血管平滑筋細胞の増殖促進・細胞死抑制と関連したゲノムワイドDNAメチル化：7週齢の周産期低酸素暴露侵襲ラットで循環動態指標(右室収縮期圧、右室収縮期圧/大動脈収縮期圧比、右室/(左室+心室中隔)重量比)、血管病変(閉塞性血管病変率、叢状病変率、中膜肥厚)(N=8)を解析し、培養継代した肺動脈平滑筋細胞における増殖能、炎症誘発性(N=12)、網羅的DNAメチル化解析(MeDIP-sequence)(N=6)を行った。

(3) BMPR2欠損の周産期低酸素後Sugen/Hypoxia肺高血圧ラットモデルへの影響と細胞生物学機序の3点の検討：BMPR2欠損の有無の2群で、周産期の低酸素暴露により周産期低酸素暴露侵襲ラットを作成した。7週齢でSUGEN投与と低酸素暴露を行い15週齢のSugen/Hypoxiaラットを作成した(N=40)。

4. 研究成果

(1) 周産期低酸素は、Sugen/Hypoxiaラットの生命予後、体重増加、肺動脈圧、右室肥大、肺血管閉塞性病変を悪化させた：周産期低酸素暴露侵襲は15週齢のSugen/Hypoxiaラットの体重増加率、生存率(60%vs100%) (図1)、右室収縮期圧、全肺血管抵抗係数、右室収縮期圧/大動脈収縮期圧比、右室/(左室+心室中隔)重量比(<.001)と閉塞性血管病変率、叢状病変率、中膜肥厚、macrophage数/肺血管(<.005) (図2)を悪化させた。

図1 周産期低酸素の生存率と体重増加率への影響

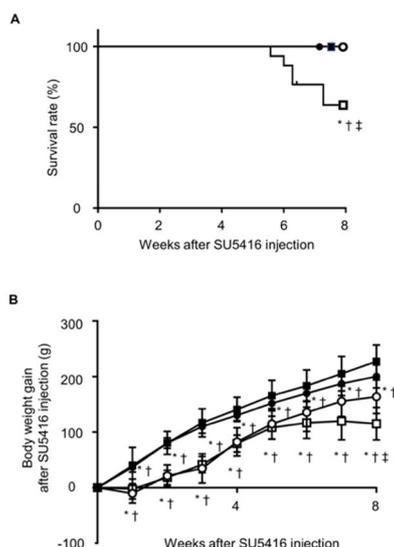
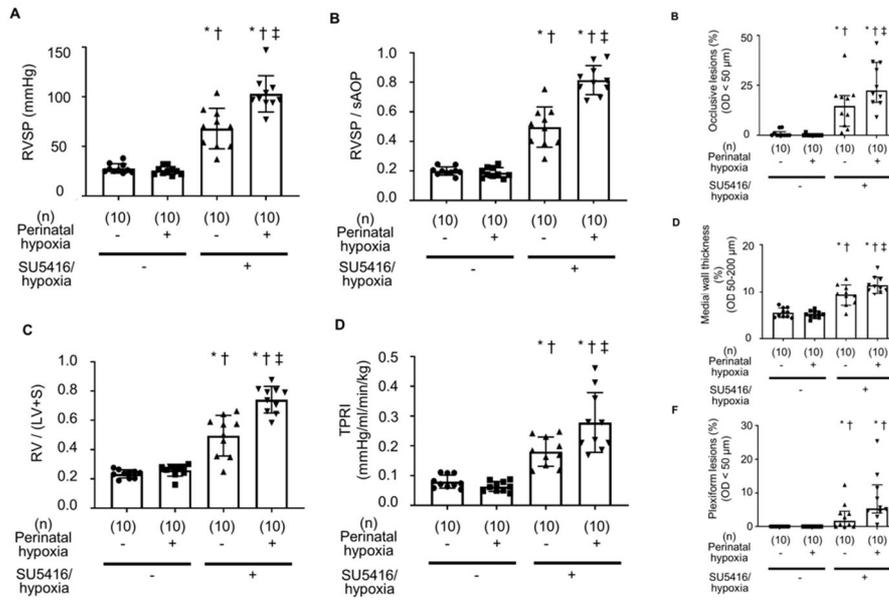


図2 周産期低酸素の血行動態と肺血管病変への影響



(2) 培養肺動脈血管平滑筋細胞は、増殖能 (BrdU 取り込み率、Ki67 陽性率、PCNA 発現量、ERK リン酸化)、炎症性サイトカイン産生能 (TNF- α 、IL-6、MCP-1、p38 リン酸化) を更新し、関連し DNA メチル化を認めた: 周産期低酸素暴露侵襲は 7 週齢健常ラットで体重、血行動態、PVD の各指標に影響なく、継代肺動脈平滑筋細胞の増殖能と炎症誘発性を亢進 (<.005) させた (図 3)。周産期低酸素暴露侵襲は DNA メチル化解析により 35 の異なるメチル化領域が同定され、その一つであるホストシン様タンパク質(Pdcl) をコードする領域におけるメチル化は周産期低酸素暴露侵襲の PSMCs における PDGF-BB 誘発の Pdcl mRNA の発現低下と関連していた。メチル化領域の機能濃縮解析により、細胞増殖や炎症過程(Wnt5A や ROR1)との関係が明らかになった (図 4)。

図3 周産期低酸素の培養肺動脈血管平滑筋細胞の増殖能とサイトカイン産生への影響

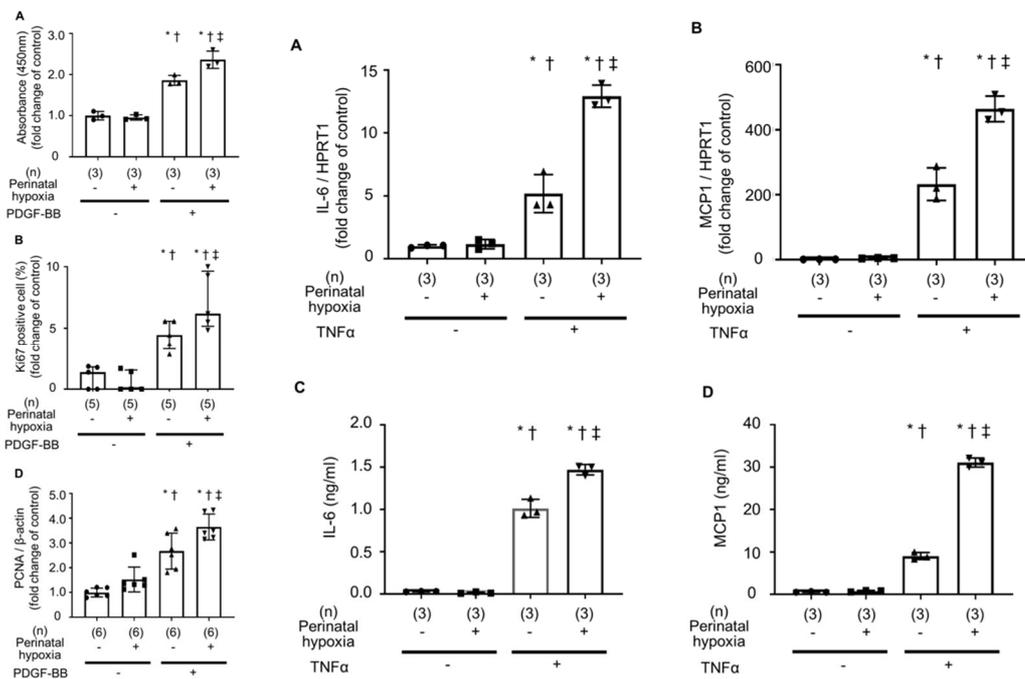
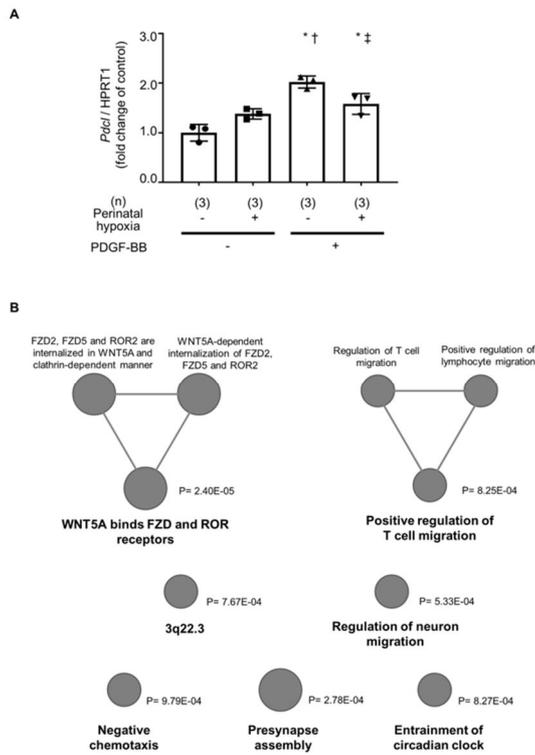


図 4 周産期低酸素の培養肺動脈血管平滑筋細胞の DNA メチル化への影響



(3) BMPR2 欠損ラットの本モデルへの影響について、現在、15 週年齢のラットの血行動態評価、組織学的評価を行なっている。

以上の結果から、周産期低酸素暴露侵襲刺激と Sugen/Hypoxia 処置により致死的な肺動脈性肺高血圧ラットモデルを作成した。継代肺動脈平滑筋細胞における表現型変化と機能的に関連する DNA メチル化の差異が、致命的な閉塞性 PVD の原因となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大下裕法、三谷義英、澤田博文、坪谷尚季、Jane C. Kabwe、淀谷典子、大橋啓之、大矢和伸、丸山一男、平山雅浩
2. 発表標題 周産期低酸素は若年SUGEN/低酸素ラットにおいて肺動脈性肺高血圧を増悪させる：新たな致死性、進行性のPAHラットモデルとその分子的機序
3. 学会等名 日本小児循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田博文、Jane C Kabwe、三谷義英、淀谷典子、大橋啓之、大矢和伸、坪谷尚季、早川豪俊、丸山一男、平山雅浩
2. 発表標題 BMPR2変異はラット肺高血圧モデルにおいて進行期の病態と生命予後を悪化させる CRISPR/Cas9ゲノム編集ラットを用いた検討
3. 学会等名 日本小児循環器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hironori Oshita, Hirofumi Sawada, Yoshihide Mitani, Jane Kabwe, Noriko Yodoya, Naoki Tsuboya, Kazunobu Ohya, Japan; Hiroyuki Ohashi, Kazuo Maruyama, Masahiro Hirayama
2. 発表標題 Perinatal hypoxia aggravates occlusive pulmonary vasculopathy in the adolescent rats: Establishment of a fatal Sugden/Hypoxia model and its molecular basis
3. 学会等名 American Heart Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大下裕法、三谷義英、澤田博文、大橋啓之、淀谷典子、大矢和伸、坪谷尚季、平山雅浩
2. 発表標題 周産期侵襲は肺動脈性肺高血圧の発症、増悪の危険因子となるか: 実験的検証
3. 学会等名 日本小児循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大下裕法、三谷義英、澤田博文、大橋啓之、淀谷典子、大矢和伸、坪谷尚季、平山雅浩
2. 発表標題 周産期ストレスによるラット肺動脈性肺高血圧の増悪効果
3. 学会等名 日本肺高血圧・肺循環学会
4. 発表年 2019年

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

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
---------	---------