

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17609

研究課題名(和文) 髄外造血に注目したJAK2 V617 変異に伴う肺高血圧症のメカニズムの解明

研究課題名(英文) JAK2V617F mutation promotes chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice.

研究代表者

君島 勇輔 (Kimishima, Yusuke)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：00836702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧症ニース分類中で、第5群：詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症として、血液疾患、とくに骨髄増殖性疾患が挙げられており、骨髄増殖性疾患による肺高血圧症のメカニズムはいまだ不明である。JAK2V617Fは、機能獲得型の後天的体細胞変異で、骨髄増殖性疾患の原因遺伝子変異として知られている。JAK2V617F変異を導入したトランスジェニックマウス(JAK2V617Fマウス)においては持続的低酸素負荷2週間後、右室圧がWTマウスに比べ有意な上昇を示した。また、低酸素負荷後、JAK2V617Fマウスでは中膜肥厚の程度が有意に増悪し肺動脈リモデリングを示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、JAK2V617変異を有する肺高血圧症患者において、JAK/STAT経路の活性を制御できれば新たな肺高血圧症治療のターゲットになり得るものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary hypertension (PH) is one of major complications of hematological diseases such as myeloproliferative neoplasms (MPNs). An acquired mutation of JAK2V617F is causally related with MPNs including polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. However, the role of JAK2V617F on PH remains unclear. We used the transgenic mice expressing JAK2V617F. JAK2V617F mice and WT mice were exposed continuous hypoxia (10% O₂) for 2 weeks to induce PH. Controls were bred under normoxia. Although hypoxia significantly increased RVSP in both JAK2V617F mice and WT mice compared to the normoxic groups, RVSP in JAK2V617F mice was significantly higher than those in WT mice after hypoxia. Elastica-Masson staining demonstrated that the medial wall thickening of pulmonary arteries was significantly increased in hypoxia-exposed JAK2V617F mice compared to hypoxia-exposed WT mice. MPNs caused by JAK2V617F is associated with development of PH by remodeling of pulmonary arteries in mice.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧症 JAK2V617F 骨髄増殖性疾患

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasm: MPN)は、骨髄系細胞の増殖、脾腫を初めとする髄外造血、急性白血病への進展を呈する疾患群であり、真性多血症、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症を含む。MPNの本態は、JAK2、MPL(thrombopoietin受容体)、calreticulin等の変異により(ドライバー変異)、JAK-STAT系が恒常的に活性化するために生じる巨核球などの骨髄系細胞の増殖である。MPNの合併症として、動静脈血栓症の他、肺高血圧症もしばしば認められ、肺高血圧を合併したMPN症例は予後不良とされる(Leukemia 2008; 22: 646-649)が、その頻度や病態については明らかになっていない。MPNに伴う肺高血圧症は、ニース分類の第5群「詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症」に含まれ、血栓症のみならず臓器の間質における髄外造血も想定されているものの、その病態や発症メカニズムはほとんど不明である。

2. 研究の目的

本研究では、肺高血圧症患者の末梢血およびJAK2 V617F遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて、肺高血圧症の発症メカニズムにおけるJAK2 V617F変異の役割を明らかにすることを目的とする。

肺高血圧症は、この20年間で診断と治療法が劇的に進歩したが、それでも予後不良な疾患である。現在、JAK2阻害薬が骨髄線維症および真性多血症に適応となり、予後改善に寄与している。MPNを発症していないJAK2V617F変異を有する症例が肺高血圧症に関与している可能性を探索し、これが治療のターゲットになり得るか検討する。

3. 研究の方法

(1)JAK2V617Fマウスにおける肺高血圧症の解析

本学輸血・移植免疫学講座で保有しているJAK2V617Fマウスを譲り受け、当講座で肺高血圧の病態について解析を行う。JAK2V617Fマウスは、骨髄において骨髄球系細胞と巨核球系細胞が優位に増殖し、MPNの表現型を呈する(Leukemia 2008; 22: 87-95, Ueda, Ikeda, Takeishi, et al, Blood Advances, 2017)。コントロールとして野生型 littermatesを用いる。心エコー図検査にて、肺血流加速時間、右室駆出率、三尖弁収縮期移動距離などを測定し肺高血圧の程度と右心機能について評価する。1.4 Frカテーテルを内頸静脈より右室に挿入し右室圧を測定する。マウスをサクリファイス後、心臓、肺、肝臓、脾臓、骨髄を摘出し、重量を測定する。肺高血圧に伴う右室肥大の程度についてはFulton index(右室重量/左室+心室中隔重量)および右室体重比で評価する。病理組織学的検討では、肺動脈中膜肥厚をElastica Masson染色にて解析し、また-SMAに対する免疫染色により末梢肺動脈の筋性変化を評価する。肺組織からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりサイトカインの発現を解析する。肺組織中のSTAT3のリン酸化についてウエスタンブロッティング法により検討する。

(2)JAK2V617Fマウスの低酸素負荷誘発性肺高血圧症モデルマウスの作成

上記実験2においてJAK2V617Fマウスに肺高血圧が認められなかった場合には、JAK2V617Fマウスを持続的10%低酸素装置に暴露し、肺高血圧症を誘導する。持続的低酸素は、肺平滑筋細胞増殖から肺動脈リモデリングを来し、肺高血圧症を呈するモデルとして確立されている。低酸素暴露装置後2週目において、心エコーにおける各種心機能パラメーターおよびカテーテル法による右室収縮期圧を測定し、同様の解析を行う。

4. 研究成果

(1)JAK2V617Fマウスにおける肺高血圧症の解析

JAK2V617Fマウスでは、白血球と血小板の有意な増加を認め、骨髄増殖性疾患の表現型を呈していた。室内気(Normoxia)では右室圧、右室重量はWTマウスと差を認めず、エラスティカマッソン染色での中膜肥厚の解析や、SMAの染色での動脈の筋性化の解析でも肺動脈のリモデリングに関して両マウス間で差は認めなかった。

(2)JAK2V617Fマウスの低酸素負荷誘発性肺高血圧症モデルマウスの作成

2週間の低酸素負荷により低酸素負荷誘発性肺高血圧症モデルを作成した。右室圧はWTマウスに比べJAK2V617Fマウスで有意な増加を示し、右室重量もJAK2V617Fマウスで有意な増加を示した(図1)。さらにエラスティカマッソン染色での中膜肥厚の解析では、低酸素負荷後にJAK2V617FマウスではコントロールとWTマウスに比べ有意に中膜肥厚が増悪し、SMAの染色での動脈の筋性化の解析でも全周性に筋性化を認める抹消肺動脈数の割合が低酸素負荷後のJAK2V617Fマウスで有意に増加し肺動脈のリモデリングの増悪を示唆した(図2)。肺動脈周囲の炎症細胞の解析のための白血球マーカーの免疫染色ではJAK2V617FマウスにおいてはLy6G陽性好中球が有意に増加していた。CD68陽性マクロファージやCD45R陽性B細胞の増加は認めなかった。そのため、肺好中球エラスターゼ活性を測定したところ、低酸素負荷後のJAK2V617Fマウスにおいて有意なエラスターゼ活性の上昇を認め、また、CCl2、Cxcl1、CCr1、Cxcr2といった好中球に関連するケモカインやケモカインレセプターの有意な上昇を認めた。また、免疫染色

により、抗 CD48 抗体、抗 CD150 抗体、抗 vWF 抗体による 3 重免疫染色を行い、Lineage-CD48-CD150+vWF+ 細胞を vWF+造血幹細胞として同定しようとしたが、同細胞は同定されなかった。

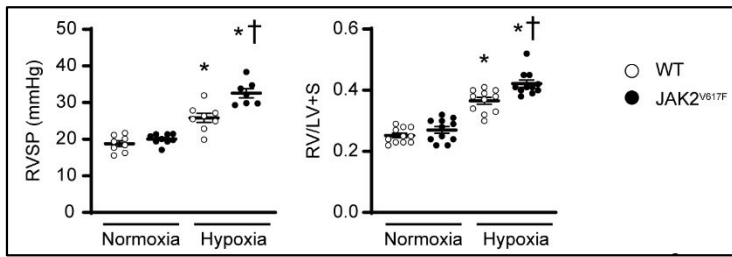


図 1. JAK2V617F マウス、WT マウスにおける右室圧、右室重量

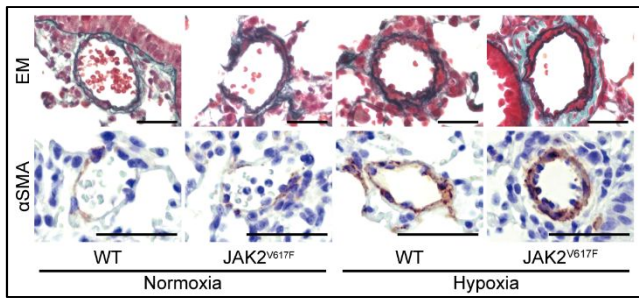


図 2. エラスティカマッソン染色(上段)、αSMA 染色(下段)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 JAK2 V617F mutation promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 2019 XXIII ISHR World Congress (2019.6.3-6.6, Beijing, China) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 JAK2 V617F mutation promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 第3回 日本循環器学会基礎研究フォーラム (The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research) (2019.9.6-9.8, 東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 JAK2 V617F mutation promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 第23回 日本心不全学会学術集会 (2019.10.4-10.6, 広島)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 Janus activating kinase 2 V617f mutation promotes hypoxia induced pulmonary hypertension in mice.
3. 学会等名 Scientific Sessions of American Heart Association 2019 (2019.11.16-11.18, Philadelphia, USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 JAK2 V617F mutation promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 Cardiovascular and Metabolic Week 2019: International Society for Heart Research (ISHR), The 36th Annual Meeting of the Japanese Section (2019.12.14-12.15, Kobe, Japan)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension through ALK1
3. 学会等名 第4回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension through ALK1
3. 学会等名 第24回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension through ALK1
3. 学会等名 iHFフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension through ALK1
3. 学会等名 第5回日本肺高血圧・肺循環学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension through ALK1
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 君島勇輔
2. 発表標題 Clonal hematopoiesis with JAK2V617F promotes pulmonary hypertension through ALK1
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------