

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17622

研究課題名(和文) 平滑筋細胞特異的Creで標識される血液細胞の循環器疾患における役割の解明

研究課題名(英文) The role of hematopoietic lineage cells marked by smooth muscle-targeted Cre mice in cardiovascular diseases

研究代表者

石橋 知彦 (Ishibashi, Tomohiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：30722285

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)：平滑筋細胞特異的Creマウスとして汎用されているSM22⁻-Creマウスでは、血液細胞でもCreリコンビネーションが生じることを見出した。SM22⁻-Creマウスを用いてIL-6の受容体を構成するgp130を欠損させると低酸素誘発性肺高血圧症(HPH)の病態が改善し、これはSM22⁻-CreによってCD4陽性T細胞で非特異的にgp130を欠損した結果であることが示唆された。実際、CD4-Creマウスを用いてgp130欠損マウスを作製したところHPHモデルの病態も改善し、CD4陽性細胞におけるgp130依存性サイトカインシグナルが肺高血圧症の病態形成に重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

平滑筋細胞特異的Creマウスとして広く研究に使用されているSM22⁻-Creマウスで、実際には血液細胞のすべての系統でCreリコンビネーションが生じることを明らかにした。SM22⁻-Creを用いた実験結果は慎重に解釈する必要があることを示すものであり、学術的に意義がある。また、指定難病である肺動脈性肺高血圧症の病態形成にIL-6が重要であることはこれまでも報告されてきたが、本研究の成果は、その標的としてCD4陽性T細胞が重要であることを示すものであり、新規治療法の開発などの臨床応用へ向けた基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Smooth muscle protein 22 alpha (SM22⁻)-Cre mouse are widely used as smooth muscle cell (SMC)-specific Cre recombination mice for the study of vascular biology. We found that SM22⁻-Cre mice showed unexpected Cre recombination in hematopoietic lineage cells. Deletion of gp130, which constitutes the interleukin-6 (IL-6) receptor, using SM22⁻-Cre mice improved the phenotype of hypoxia-induced pulmonary hypertension (HPH). It was suggested that this improvement was the result of nonspecific deletion of gp130 in CD4-positive T cells. In fact, CD4-positive cell-specific gp130 deletion by crossing gp130 flox mice with CD4-Cre mice ameliorated right ventricular systolic pressure in HPH mouse. These findings suggest that gp130-mediated signaling in CD4-positive cells plays an important role in the pathogenesis of PAH. Besides, careful attention should be paid when using SMC-targeted Cre recombination mice for the purpose of SMC-specific gene knockout and lineage tracing studies.

研究分野：血液内科学、血管生物学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 平滑筋細胞 gp130 IL-6 リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

循環器疾患の病態形成における血液細胞の関与が近年多数報告されている。また、平滑筋細胞 (SMC)も動脈硬化などの循環器疾患の病態形成に深く関与しており、その研究には平滑筋関連遺伝子のプロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (SMC-Cre マウス) が広く用いられている。SM22⁻-Cre (TagIn-Cre) マウスもそのひとつであるが、このマウスでは脾臓の骨髄球系細胞の一部でも Cre が発現することが以前に報告されている (Shen Z, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;422:639)。しかし、他の造血組織での解析や、骨髄球系細胞以外での Cre リコンビネーションの有無、循環器疾患の病態形成に果たす役割についてはこれまで報告がなかった。

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺動脈の遠位部に原因不明の狭窄・閉塞を生じ、肺動脈圧の上昇から右心不全に至る疾患であり、厚生労働省の指定難病となっている。現在使用可能な薬剤はいずれも肺動脈血管平滑筋の弛緩を促進する血管拡張薬であり、分子病態解明に基づく新たな作用機序の薬剤が望まれている。研究代表者のグループでは、インターロイキン-6 (IL-6) /IL-21 の炎症性サイトカインシグナルが肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病態形成に重要であることを報告した (Hashimoto-Kataoka T, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E2677)。しかし、IL-6 がどの細胞に作用することが PAH の病態形成の鍵となるかは十分に明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、平滑筋細胞特異的 Cre マウスとして汎用されている SM22⁻-Cre マウスで標識される血液細胞の特徴を明らかにすることを第一の目的とした。また、これらの血液細胞の循環器疾患における役割について、特に肺動脈性肺高血圧症の病態形成に果たす役割に着目して明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 平滑筋細胞特異的 Cre レポーターマウスの解析

平滑筋細胞特異的 Cre マウスとして、SM22⁻-Cre (TagIn-Cre) あるいは SMMHC-CreERT2 (Myh11-CreERT2) マウスを、Cre リコンビネーションによって tdTomato を発現するマウス (Rosa26-loxP-Stop-loxP-tdTomato) マウスと交配し、SM22⁻-Cre レポーターマウス、SMMHC-CreERT2 レポーターマウスをそれぞれ作製した。SMMHC-CreERT2 レポーターマウスに対しては、タモキシフェン腹腔内投与により Cre リコンビネーションを誘導した。これらのレポーターマウスの造血組織 (骨髄・脾臓・末梢血) のフローサイトメトリー解析、および、骨髄の免疫組織解析により、各平滑筋細胞特異的 Cre マウスで Cre リコンビネーションが生じる細胞を解析した。

(2) 細胞系統特異的 gp130 欠損マウスの肺高血圧症病態評価

gp130 flox マウスを、細胞系統特異的 Cre マウスと交配して細胞系統特異的 gp130 欠損マウスを作製した。これらのマウスを 10% の低酸素下で 4 週間飼育して低酸素誘発性肺高血圧症 (HPH) マウスを作製し、病態を評価した。

4. 研究成果

(1) 平滑筋細胞特異的 Cre レポーターマウスの解析

SM22⁻-Cre レポーターマウス骨髄の免疫組織解析では、骨髄内動脈周囲の血管平滑筋細胞で tdTomato のシグナルが認められたが、骨髄腔内に広がる血球細胞の一部も tdTomato 陽性となっており、血液細胞でも Cre リコンビネーションが生じていることが明らかとなった (図 1)。フローサイトメトリーで確認したところ、骨髄の CD45+血液細胞の約 30% が tdTomato 陽性であった。SM22⁻-Cre レポーターマウスの脾臓および末梢血でも同様に、tdTomato 陽性の血液細胞が認められた。一方、SMMHC-CreERT2 レポーターマウス骨髄の免疫組織染色では、tdTomato のシグナルは骨髄内の動脈周囲の血管平滑筋細胞に限局して認められた。フローサイトメトリー解析でも、骨髄・脾臓・末梢血の CD45+血液細胞には tdTomato 陽性細胞は認められず、血液細胞での Cre リコンビネーションは SM22⁻-Cre マウスに特徴的な事象であると考えられた。他の筋細胞をターゲットとする Cre マウスとして、MCK-Cre マウス (骨格筋および心筋)、MHC-Cre マウス (心筋) でも同様にレポーターマウスを作製して造血組織を解析したが、tdTomato 陽性の血液細胞は認めなかった。

tdTomato 陽性血液細胞が多数認められた SM22⁻-Cre レポーターマウスについては、フローサ

イトメトリーを用いてさらに詳細な解析を行った。末梢血の解析では、骨髄球系細胞、Tリンパ球、Bリンパ球のいずれの分画でも、tdTomato陽性細胞が認められた。骨髄の造血幹・前駆細胞分画の解析では、未分化な造血幹細胞分画(CD150+ CD48- LSK細胞)においても10%程度の細胞がtdTomato陽性であり、分化が進むにつれてtdTomato陽性細胞の比率が上昇することも明らかにした。骨髄中の骨髄球系前駆細胞やリンパ球系前駆細胞分画では、30~40%がtdTomato陽性であり、分画による差は認められなかった

以上の結果から、平滑筋細胞特異的Creマウスとして広く用いられているSM22-Creマウスでは、造血幹細胞の段階から一部の血液系細胞でCreリコンビネーションが生じてしまい、血球の分化が進むにつれてCreリコンビネーションを生じた細胞の比率が増加していくことが明らかとなった。SM22-Creマウスを用いて平滑筋細胞特異的な遺伝子ノックアウトや系統追跡実験を実施する際は、結果を慎重に解釈する必要があると考えられた。

(2) 平滑筋細胞特異的Creを用いてgp130を欠損させたマウスにおける肺高血圧症病態の解析

次に、平滑筋細胞特異的Creで標識される血液細胞の循環器疾患における意義を検討するため、肺動脈性肺高血圧症(PAH)に着目して解析を行った。我々は肺高血圧症の病態形成において炎症性サイトカインであるIL-6が重要であることを報告しているが、この標的細胞については十分に明らかとなっていない。そのため、IL-6受容体を構成する分子であるgp130のfloxマウスと、平滑筋細胞特異的Creマウスとを交配して細胞系統特異的gp130欠損マウスを作製し、低酸素誘発性肺高血圧症(HPH)モデルの病態評価を行った。平滑筋細胞特異的Creマウスとしては、(1)で用いたSM22-CreとSMMHC-CreERT2を用いた。4週間の低酸素負荷後に右室カテーテル検査等によって肺高血圧症病態を評価したところ、コントロールと比較して、SMMHC-CreERT2でgp130を欠損させたマウスでは改善がみられなかったのに対して、SM22-Creでgp130を欠損させたマウスでは右室収縮期圧および右室肥大係数(Fulton's index)の改善傾向が認められた。

2系統の平滑筋細胞特異的Creマウスを用いたgp130欠損モデルで肺高血圧症病態の改善に違いが認められる理由が、(1)で明らかにしたSM22-Creによる血液細胞での非特異的Creリコンビネーションによるのではないかと考え、血液細胞におけるgp130発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。Cre(-)のコントロールマウスではCD4陽性T細胞のほぼ100%がgp130を発現しているが、gp130flox/flox; SM22-Creマウスでは約25%のCD4陽性T細胞でgp130の発現が欠損していることが明らかとなった。IL-6受容体を構成するもう一方の分子であるIL-6Rの発現は、コントロールマウスとgp130flox; SM22-Creマウスとで差異を認めなかった。また、CD8陽性T細胞や、CD3陰性のT細胞以外の分画では、コントロールマウスにおいてもIL-6Rはほとんど発現を認めなかった。以上から、SM22-Creを用いてgp130を欠損させたマウスでの肺高血圧症病態の改善は、CD4陽性T細胞においてgp130シグナルを欠損させた結果であることが示唆された。

(3) CD4-Creを用いてgp130を欠損させたマウスにおける肺高血圧症病態の解析

(2)の結果をふまえて、CD4-Creマウスとgp130floxマウスとを交配し、CD4T細胞でgp130を欠損したマウスを作製した。フローサイトメトリー解析により、gp130flox/flox; CD4-CreマウスのCD4陽性T細胞のgp130はほぼ完全に消失していることを確認した。このマウスでHPHモデルを作製して病態評価を行ったところ、SM22-Creマウスを用いたときと比較してさらに右室収縮期圧が低下することを明らかにした。低酸素負荷により、マウス肺では炎症性サイトカイン産生CD4T細胞が増加することをフローサイトメトリー解析によって確認した。この炎症性サイトカイン産生CD4陽性T細胞の増加が、CD4-Creを用いてgp130を欠損させたマウスでは抑制されていることも明らかにし、これが肺高血圧症病態の改善に繋がっていることが示唆された。

以上から、CD4陽性T細胞におけるgp130依存性サイトカインシグナルが肺高血圧症の病態形成に重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yasuhiro Nagate, Sachiko Ezo, Jiro Fujita, Daisuke Okuzakis, Daisuke Motooka, Tomohiko Ishibashi, Michiko Ichii, Akira Tanimura, Masako Kurashige, Eiichi Morii, Takuya Fukushima, Youko Suehiro, Takafumi Yokota, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura	4. 巻 35
2. 論文標題 Ectonucleotidase CD39 is highly expressed on ATLL cells and is responsible for their immunosuppressive function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 107-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-020-0788-y	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 -

1. 著者名 Tomoaki Ueda, Takafumi Yokota, Daisuke Okuzaki, Yoshihiro Uno, Tomoji Mashimo, Yoshiaki Kubota, Takao Sudo, Tomohiko Ishibashi, Yasuhiro Shingai, Yukiko Doi, Takayuki Ozawa, Ritsuko Nakai, Akira Tanimura, Michiko Ichii, Sachiko Ezo, Hirohiko Shibayama, Kenji Oritani, Yuzuru Kanakura	4. 巻 13
2. 論文標題 Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Contributes to the Development of Definitive Hematopoiesis in the Fetal Liver.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 992-1005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.11.002	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 -

1. 著者名 Hiroyoshi Mori, Tomohiko Ishibashi, Tadakatsu Inagaki, Makoto Okazawa, Takeshi Masaki, Ryotaro Asano, Yusuke Manabe, Keiko Ohta-Ogo, Masashi Narazaki, Hatsue Ishibashi-Ueda, Atsushi Kumanogoh, Yoshikazu Nakaoka	4. 巻 84
2. 論文標題 Pristane/hypoxia (PriHx) mouse as a novel model of pulmonary hypertension reflecting inflammation and fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1163-1172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-19-1102	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 -

1. 著者名 Masaki T, Okazawa M, Asano R, Inagaki T, Ishibashi T, Yamagishi A, Umeki-Mizushima S, Nishimura M, Manabe Y, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Tsuchimochi H, Pearson JT, Kumanogoh A, Sakata Y, Ogo T, Kishimoto T, Nakaoka Y	4. 巻 118
2. 論文標題 Aryl hydrocarbon receptor is essential for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2023899118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2023899118	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 石橋知彦, 正木豪, 稲垣薫克, 森啓悦, 浅野遼太郎, 岡澤慎, 中岡良和
2. 発表標題 CD4陽性細胞のIL-6シグナルは肺高血圧症の病態形成に重要である
3. 学会等名 第4回 日本肺高血圧・肺循環学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi T, Masaki T, Inagaki T, Mori H, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y
2. 発表標題 gp130-mediated signaling in CD4-positive cells is important for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第3回 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi T, Masaki T, Inagaki T, Okazawa M, Nakaoka Y
2. 発表標題 gp130-mediated signaling in CD4-positive cells has a critical role for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第3回 Asia Australia Vascular Biology Meeting (AAVBM) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石橋知彦, 正木豪, 稲垣薫克, 森啓悦, 浅野遼太郎, 岡澤慎, 中岡良和
2. 発表標題 CD4陽性細胞におけるgp130シグナルの肺高血圧症病態形成における役割
3. 学会等名 第27回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okazawa M, Inagaki T, Ishibashi T, Masaki T, Mori H, Asano R, Takei K, Nakaoka Y
2. 発表標題 TrkB has a protective role for right ventricular dysfunction under chronic hypoxia-induced PH
3. 学会等名 第3回 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inagaki T, Mitsui M, Asano R, Ogo T, Aoki K, Masaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Nakaoka Y
2. 発表標題 Critical roles of interleukin-21 signaling in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第3回 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣薫克, 浅野遼太郎, 三井麻利江, 青木一晃, 石橋知彦, 岡澤慎, 大郷剛, 中岡良和
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症の病態形成におけるInterleukin-21の役割の解明と治療法開発
3. 学会等名 第27回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi T, Masaki T, Inagaki T, Okazawa M, Nakaoka Y
2. 発表標題 gp130 signaling in CD4 cells is important for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting (IVBM) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inagaki T, Ishibashi T, Okazawa M, Masaki T, Mitsui M, Aoki K, Asano R, Ogo T, Nakaoka Y
2. 発表標題 Critical Roles of Interleukin-21 Signaling in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting (IVBM) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishibashi T, Masaki T, Inagaki T, Asano R, Okazawa M, Nakaoka Y
2. 発表標題 IL-6 signaling in the CD4-positive T cells is important for the pathogenesis of PAH
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 稲垣薫克, 浅野遼太郎, 石橋知彦, 岡澤慎, 正木豪, 三井麻利江, 青木一晃, 大郷剛, 中岡良和
2. 発表標題 Interleukin-21阻害による肺動脈性肺高血圧症の新規治療法開発
3. 学会等名 第5回 日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------