

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17667

研究課題名(和文) 組織透明化技術と多光子励起顕微鏡を用いた肺高血圧症の三次元病理病態解析

研究課題名(英文) Three-dimensional pathophysiological analysis of pulmonary hypertension using tissue-clearing method and multiphoton microscopy

研究代表者

藤原 隆行 (Takayuki, Fujiwara)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40836441

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)：三次元イメージングシステムにより、各種肺高血圧症(PH)モデルマウスにおける微小血管の描出を行った。中等度のPHを呈する低酸素負荷PHおよび遺伝性肺高血圧症モデルAlk1+/-では微小血管新生を認めた。その一方で、低酸素負荷+VEGF受容体阻害薬(SU5416)投与では、血管新生像は認めず、重症PHを呈した。またXの発現が血管新生に關与することが網羅的遺伝子発現解析により示唆された。肺内皮細胞特異的X欠損マウスでは低酸素負荷において血管新生反応は低下しPHは増悪、その一方でX活性化薬は血管新生反応を増強させPHは改善した。この結果よりXはPH治療薬の新規ターゲットとして期待できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規の手法の確立を行い、その応用により、過去には報告しえなかった動物組織の三次元的解析を実践することができた。また難治疾患である肺高血圧症において、新規の治療ターゲットとして期待の持てる因子の探索を行うことができ、新規三次元解析手法が単なる生物現象の観察のみにとどまらず、新規病態解明およびそれを応用した新規治療開発に有用であることを示すことができ、この手法を用いて、他の疾患においても病態解明・治療法開発を推し進められる可能性について示すことが可能であった。

研究成果の概要(英文)：We developed a three-dimensional (3D) visualization system, and revealed that a previously uncharacterized but marked angiogenic response in hypoxia-induced (Hx) and Alk1+/- PH mice models, which was canceled by the administration of VEGFR inhibitor SU5416. Angiogenesis was accompanied by the upregulation of X expression in pulmonary endothelial cells. Pulmonary endothelial-specific X-deficient mice lacked an angiogenic response and developed severe Hx-PH, while the activation of X increased angiogenesis and attenuated Hx-PH. Our results suggest that pulmonary endothelial PGC-1 activation plays a crucial role in preventing PH deterioration and is a potential therapeutic target for PH.

研究分野：循環器内科分野

キーワード：肺高血圧症 血管新生 組織透明化技術 多光子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症(Pulmonary hypertension: PH)は、肺動脈の血圧上昇とともに呼吸不全が進行する予後不良の難治性疾患である。近年では新規の血管拡張薬の開発が相次ぎ、その生命予後は幾分改善傾向にはあるが、重症例では肺移植を余儀なくされ、移植待機期間中(5年以上)に絶命する症例が後を絶たない。PHの病理学的特徴として肺動脈構成細胞(血管内皮細胞および平滑筋細胞)の異常増殖(肺動脈狭窄)が挙げられ、「肺動脈硬化症」としての側面を持ち、肺動脈中枢部のみならず末端の細小血管や毛細血管の障害(微小血管リモデリング)により、肺組織還流障害や換気・代謝異常がさらに増悪し、病態進展に寄与していることが予想される。従来PHでの肺血管像・血流量の判定に用いられる肺動脈造影CTや肺血管造影検査、肺血流シンチグラフィでは、気道中枢側の狭窄に伴う影響を強く反映する一方で、肺ガス交換を担う気道末梢側までの血管構造や機能を正確に把握すること困難であった。またPHモデルマウスを用いた基礎的研究において、この細小血管障害の実像について、二次元の病理組織学的検討や組織での発現解析結果などから諸説はあるが定説をみず、さらに従来の実験技法では実質臓器での三次元構造と機能の変化を視覚化し解析することは極めて難しかった。

従来、医学生物学における病態研究は組織切片を用いた病理組織学的検討や遺伝子発現様式の検証などから進められてきたが、その観察範囲は平面(二次元情報)に留まっていた。また、最先端の多光子顕微鏡を用いても観察深度は数十 μm が限界であったため、血管・神経のような三次元空間で複雑な形態を呈する組織においては、正確な形態評価は極めて困難であった。しかし、近年の臓器透明化技術の目覚ましい発展により(Cell 159:911-24,2014)、この障壁を取り除く手段が提供され、高解像度(一細胞解像度)を維持しながらもその観察深度が拡大することが期待されている。申請者は、臓器透明化技術CUBICと独自の顕微鏡技術を組み合わせ、世界に先駆けて、マウス肺葉全層での血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、炎症細胞、線維化の三次元イメージング手法の確立に成功しており、これまでは評価困難であった肺の組織深部での三次元構造と機能の変化を一細胞解像度で詳細に観察できるようになった(未発表)。本課題では、この新たなシステムを用いて、PHにおいて、今まで「見えなかった」細小血管障害や微小構造リモデリングの詳細を捉えてその分子機構を明らかとすることで、新たな病態把握に基づく診断や治療方法の開発に繋げる研究の礎としたい。

2. 研究の目的

従来病理組織学的評価(二次元)により、PHはその病理学的特徴として肺動脈構成細胞の異常増殖(肺動脈狭窄)が挙げられるが、肺生検を繰り返して病態を検証することが困難なため、肺動脈狭窄以外の現象、特に低酸素や血管新生シグナルの意義付けや役割の解明は進んでおらず、一定の見解を見ていない(多数のパラドックスが存在する)。

つまり、PHの原因遺伝子として、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)スーパーファミリーの受容体をコードする*BMPR2*、*ALK1*、*ENG* 遺伝子などが報告されており、これらの病的変異は血管新生シグナルに対して抑制性(in vitro)に作用すると予測されるが、実際の肺病変では血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現は著しく亢進している。VEGFシグナルが肺動脈狭窄を増強させる可能性も指摘されるが、治療薬として期待されたVEGF受容体阻害薬(Sugen)の投与はマウス・ラットのPHモデルを増悪させた。一方、VEGF上流のシグナル因子である低酸素誘導因子(HIF)を遺伝学的に欠損させるとPHモデルが改善することも知られており、本症の血管新生およびVEGFの役割に関する知見は混沌としている(VEGF paradox)。

PHにおけるVEGFの作動点・役割を検討することが困難であった原因の一つに、従来PH動物モデルはヒト遺伝子変異を反映しておらず、モノクローリン(肺循環障害アルカロイド：炎症惹起性)、低酸素環境、低酸素環境+VEGF受容体阻害薬投与(Sugen)、などの人為的PH誘導モデルが多いことが挙げられる。さらに、これらのPH動物モデル間の相違も大きく、これらを用いた病態解析が本症の発症・進展機序や治療反応性を正しく反映するのかという判断すら極めて難しかった。本課題では、最新の臓器透明化技術と多光子顕微鏡技術を独自に開発した「マウス肺葉全層で平滑筋細胞や内皮細胞、炎症細胞の活動期の変化(形態および機能)を三次元構造として視覚化する新たな三次元病理病態解析システム」を用いて、*ALK1*の遺伝子変異を再現した遺伝子改変マウスと従来疾患動物モデルを比較検証しながら、本症動物モデルの最適化と「VEGF paradox」の謎の解明に挑み、本症の発症・進展に関わる分子機構の詳細を明らかとしたい。

3. 研究の方法

従来PHモデルマウスであるVEGF受容体拮抗薬投与(Sugen)モデルとヒト*ALK1*遺伝子変異を反映した疾患モデルマウス(*Alk1*ヘテロ欠損マウス：*Alk1*^{+/-})について、肺葉全体の三次元構造変化を1細胞解像度で描出したところ、*Alk1*^{+/-}マウスでは微小な血管平滑筋の増生が顕著であるのに対し、Sugenモデルではこの肺抹消領域での平滑筋像が完全に欠如していた。*Alk1*^{+/-}マウスでの微小平滑筋像は、PH進展に伴う既存の細小動脈の「筋性化(平滑筋細胞によ

る裏打ち)」の描出とも考えられるが、低酸素負荷 + Sugen モデルでは完全に欠如していることから、PH 発症・進展機序の相違点、ヒト PH における微小血管新生形成の関与などを示唆・反映した描像である可能性もある。従来の二次元病理組織ではこの両者の区別は困難であるが、三次元イメージングシステムを用いて肺血管内皮細胞を描出したところ、低酸素負荷 PH モデルにおいて、明らかに血管新生が増進している像が得られたことから（別モデルでは未検討）、この現象は本症の VEGF と血管新生シグナルの意義を再検証し、その矛盾点(パラドックス)を解き明かすためのキー現象となるのではないかと考えている。

本課題では、モデル間や病期による本現象の相違を明らかとし、本症の病態を再考・検証すべく、血管平滑筋・血管内皮細胞の三次元イメージング手法を用いて、とくに筋性化・新生血管の描出とその意義に焦点を当てた解析を行う(内皮細胞 lineage tracing 実験なども実施予定)。

[2] 肺高血圧症における転写因子 X の担う役割についての検証

VEGF およびその上流に位置する HIF に関するパラドックス(前述)が、その病態把握を複雑にしている。申請者は、これまでの三次元イメージングと発現解析などを用いた検討により、HIF とは異なる VEGF シグナル伝達を担う転写因子 X が、血管新生シグナルの亢進や微小血管リモデリングに関与し、このパラドックスを解き明かすキー因子となる可能性が高いと考えている。血管内皮細胞または平滑筋細胞特異的に転写因子 X を欠損させたマウスを作成し、上記動物モデルの作成・交配により PH を誘導して表現型を解析することで、転写因子 X が病態進展に担う役割を検証する。

[3] 転写因子 X 活性化剤の治療判定

本症に関して、血管リモデリングや血管新生シグナルに転写因子 X の意義が明らかとなった場合、転写因子 X の活性化剤を PH 治療薬として利用できる可能性がある。既に転写因子 X を活性化することが報告されているフラボノイドの一種 B の動物モデルへの投薬を行い、新規治療法としての検討を行う。

4. 研究成果

肺血管内皮細胞の lineage tracing 実験では低酸素負荷 PH モデルにおいて、明らかに血管新生が増進している像を得ることができたが、その後の検討において *Alk1*^{+/+}マウスにおいて同様な血管新生像を認めた一方、低酸素負荷 + Sugen モデルでは血管新生像は認めず、平滑筋リモデリング像と同様の傾向が示された。またこの血管新生像と VEGFA の発現パターンは一致しており、VEGFA がこの血管新生現象の背景にあることが示唆され、肺高血圧症に対して代償的な役割を担っていることが示された。

しかしながら VEGF シグナルの上流に位置する HIF の欠損により肺高血圧症が改善することがすでに報告されていることより、HIF とは独立した VEGF および血管新生制御因子 X について肺高血圧症における役割の検討を行った。肺血管内皮細胞特異的 X 欠損マウスを低酸素負荷し肺高血圧症を誘導すると、VEGFA の発現および血管新生反応は低下し、肺高血圧症は増悪した。その一方で X 活性化薬の投与で VEGFA の発現および血管新生反応は増強し、肺高血圧症は改善した。このことより、X が代償的な VEGF 発現および血管新生を誘導していることが示され、肺高血圧症における新規治療ターゲットとして期待がもてる結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ishizuka Masato, Harada Mutsuo, Nomura Seitaro, Ko Toshiyuki, Ikeda Yuichi, Guo Jiaxi, Bujo Satoshi, Yanagisawa-Murakami Haruka, Satoh Masahiro, Yamada Shintaro, Kumagai Hidetoshi, Motozawa Yoshihiro, Hara Hironori, Fujiwara Takayuki, et.al	4. 巻 11
2. 論文標題 CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a β -arrestin-biased receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83022-5	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 Adachi Yusuke, Kiyosue Arihiro, Ando Jiro, Kawahara Takuya, Kodera Satoshi, Minatsuki Shun, Kikuchi Hironobu, Inaba Toshiro, Kiriyama Hiroyuki, Hirose Kazutoshi, Shinohara Hiroki, Saito Akihito, Fujiwara Takayuki, et.al	4. 巻 11
2. 論文標題 Factors associated with left ventricular reverse remodelling after percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular systolic dysfunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80491-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 Hara Hironori, Maemura Sonoko, Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi, Ishii Satoshi, Yagi Hiroki, Suzuki Takaaki, Harada Mutsuo, Toko Haruhiro, Kanaya Tsubasa, Ijichi Hideaki, Moses Harold L., Takimoto Eiki, Morita Hiroyuki, Akazawa Hiroshi, Komuro Issei	4. 巻 15
2. 論文標題 Inhibition of transforming growth factor- β signaling in myeloid cells ameliorates aortic aneurysmal formation in Marfan syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0239908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0239908	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 Toko Haruhiro, Morita Hiroyuki, Katakura Masanori, Hashimoto Michio, Ko Toshiyuki, Bujo Satoshi, Adachi Yusuke, Ueda Kazutaka, Murakami Haruka, Ishizuka Masato, Guo Jiaxi, Zhao Chunxia, Fujiwara Takayuki, Hara Hironori, Takeda Norifumi, Takimoto Eiki, Shido Osamu, Harada Mutsuo, Komuro Issei	4. 巻 10
2. 論文標題 Omega-3 fatty acid prevents the development of heart failure by changing fatty acid composition in the heart	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72686-0	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 Nakayama Atsuko, Takayama Naoko, Kobayashi Momoko, Hyodo Kanako, Maeshima Naomi, Takayuki Fujiwara, Morita Hiroyuki, Komuro Issei	4. 巻 25
2. 論文標題 Remote cardiac rehabilitation is a good alternative of outpatient cardiac rehabilitation in the COVID-19 era	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12199-020-00885-2	査読の有無 有
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 Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi	4. 巻 61
2. 論文標題 Glucose Fluctuation and Cardiovascular Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 633 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-417	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 Ishii Satoshi, Fujiwara Takayuki, Ando Jiro, Takeda Norifumi, Inaba Toshiro, Inuzuka Ryo, Komuro Issei	4. 巻 61
2. 論文標題 Balloon Valvuloplasty to Treat Adult Symptomatic Pulmonary Valve Stenosis with Sequential Follow-Up Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Combination with Echocardiography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1075 ~ 1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-106	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 Hara H, Takeda N, Fujiwara T, Yagi H, Maemura S, Kanaya T, et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Activation of TGF- signaling in an aortic aneurysm in a patient with Loeys-Dietz syndrome caused by a novel loss-of-function variant of TGFBR1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Genome Var	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-019-0038-x	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 Fujiwara T, Takeda N, Ishii S, Morita H, Komuro I.	4. 巻 1
2. 論文標題 Unique Mechanism by Which TGFBR1 Variants Cause 2 Distinct System Diseases Loeys-Dietz Syndrome and Multiple Self-Healing Squamous Epithelioma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ Reports	6. 最初と最後の頁 487-492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.cr-19-0098	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 Nakayama A, Morita H, Fujiwara T, Komuro I	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Treatment by Female Cardiologists on Short-Term Readmission Rates of Patients Hospitalized With Cardiovascular Diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1937-1943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0357	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 A novel three-dimensional visualization system revealed an essential adaptive angiogenic response in pulmonary hypertension
3. 学会等名 第28回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 新たな三次元病理病態解析が解き明かす肺高血圧症における微小血管リモデリングの意義とその治療応用
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 新たな三次元病理病態解析が解き明かす肺高血圧症における微小血管リモデリングの意義とその治療応用
3. 学会等名 第56回高血圧疾患モデル学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 新たな三次元イメージングが解き明かす肺高血圧症の病態初期の微小血管リモデリングの意義とその治療応用
3. 学会等名 第61回日本脈管学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 三次元イメージングで解き明かす肺高血圧症の微小血管新生の意義
3. 学会等名 第5回肺高血圧症肺循環学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 新たな三次元的形態解析手法によって明らかとなった肺高血圧症の微小血管リモデリングとその治療的意義
3. 学会等名 第257回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 新たな三次元的形態解析手法によって明らかとなった肺高血圧症の病態初期の微小血管リモデリングの意義
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 新たな三次元的形態解析手法によって明らかとなった肺高血圧症の微小血管リモデリングの意義
3. 学会等名 脳心血管抗加齢研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 新たな三次元的形態解析手法によって明らかとなった肺高血圧症の病態初期の微小血管リモデリングの意義
3. 学会等名 第23回日本心血管内分泌代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原隆行
2. 発表標題 A novel three-dimensional visualization system demonstrates an essential adaptive angiogenic response in the early phase of pulmonary 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

〔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
---------	---------