

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17670

研究課題名（和文）肺動脈性肺高血圧症におけるNGFR陽性細胞の機能的解析

研究課題名（英文）Functional analysis of NGFR positive cells in pulmonary arterial hypertension

研究代表者

五天 千明（GOTEN, CHIAKI）

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教

研究者番号：80802818

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）：本研究では、NGFR陽性細胞は健常者と比較し肺高血圧症患者において有意に末梢血中に増加していることを確認した。さらにNGFR陽性細胞は肺高血圧症における血行動態（平均肺動脈圧、心係数、肺血管抵抗）と相関関係を認め、より重症な肺高血圧症において末梢血中NGFR陽性細胞が増加していることを確認した。

また、NGFR遺伝子欠損(KO)マウスはWTと比較し、低酸素誘発性肺高血圧症の増悪を認めた。一方、WTの骨髄移植したNGFRKOマウスは、肺血管リモデリングの改善が認められた。これらの結果から、NGFR陽性細胞が肺高血圧症の病態形成において保護的効果を有する可能性が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症における間葉系幹細胞の機能的役割は十分に解明されていない。本試験では、間葉系幹細胞の中でも、多分化能、増殖能に優れたNGFR陽性細胞に着目し、臨床研究にてNGFR陽性細胞と肺高血圧症の重症度および予後との関連性を明らかにし、基礎研究にてNGFR遺伝子欠損マウスを用いて、肺高血圧症の病態形成におけるNGFR陽性細胞の役割について検討した。本研究を通して、肺高血圧症における間葉系幹細胞の関連性を明らかにし、新たな肺高血圧症の治療の切り口となる可能性を示した。今後、NGFR陽性細胞の肺血管リモデリングに関する機序解明にむけ、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we confirmed that NGFR-positive cells were significantly increased in peripheral blood in patients with pulmonary hypertension compared to healthy subjects. Furthermore, NGFR-positive cells were found to be correlated with hemodynamics (mean pulmonary artery pressure, cardiac index, pulmonary vascular resistance) in pulmonary hypertension, and it was confirmed that NGFR-positive cells in peripheral blood increased in more severe pulmonary hypertension.

Additionally, NGFR gene-deficient (KO) mice exhibited worsening of hypoxia-induced pulmonary hypertension compared to WT mice. On the other hand, NGFRKO mice transplanted with WT bone marrow showed improved pulmonary vascular remodeling. These results suggested that NGFR-positive cells may have a protective effect on the pathogenesis of pulmonary hypertension.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 神経成長因子受容体 肺血管リモデリング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、極めて予後不良の疾患であったが、1999年以降、肺血管拡張薬が順次開発されその予後は劇的に改善した。しかし、難治性の症例も少なからず存在し、重篤な右心不全を伴う進行した肺高血圧症患者の予後は依然として不良である。肺高血圧症の病態形成には、血管平滑筋および内皮細胞の異常増殖や、単球・マクロファージなどの炎症細胞浸潤が関与しており、最終的には不可逆的な肺血管リモデリングに至ることが知られている。肺高血圧症の初発症状は息切れなど非特異的なことが多く、临床上診断される肺動脈圧が上昇した時点では、すでに約 2/3 の肺血管床において血管リモデリングが進行している(Therapeutic Research 2005)。血行動態の変化よりいち早く肺高血圧症の病態進行を捉えることのできる因子の解明や、既存の治療法では制御できない難治性 PAH の新たな治療法の開発が求められている。近年 NGFR 陽性細胞は、骨髄、脂肪、脾臓などの間質に存在し、高い多分化能、増殖能を有することから、間葉系幹細胞の細胞表面マーカーとして注目されている。我々の独自の先行研究において、NGFR 陽性細胞は、末梢血液にも検出可能なレベルで存在し、血管リモデリングと関連することを見出した。(Open Heart. 2016 Jun 30;3(1))

### 2. 研究の目的

本試験では、臨床研究にて NGFR 陽性細胞と肺高血圧症の重症度および予後との関連性を明らかにし、基礎研究にて NGFR 遺伝子欠損マウスを用いて、肺高血圧症の病態形成における NGFR 陽性細胞の役割を評価する。

### 3. 研究の方法

本研究では、NGFR 陽性細胞が、肺高血圧症における肺血管リモデリングに関与すると仮説をたて、臨床研究とモデルマウスを用いた基礎研究により、以下の検討を行う。

- a) 臨床研究では、末梢血の単核球分画中の NGFR 陽性細胞数と、肺高血圧症の重症度との関連性を明らかにし、追跡調査を行い予後予測マーカーとなりうるかどうか検討する。
- b) 基礎研究では、NGFR 遺伝子欠損マウスを用いて肺高血圧モデルを作成し、肺高血圧症の病態形成における NGFR 遺伝子の役割を明らかにする。

#### a) 臨床研究

末梢血中の NGFR 陽性細胞数と肺高血圧症の重症度および予後との関連性を検討した。

PAH 患者を対象とし、初回および 6~12 ヶ月後に施行した右心カテーテル検査の際、同時にヘパリン採血を行い、密度勾配遠心分離法にて末梢血単核球を分離後、フローサイトメトリー解析を行った。また NGFR 陽性細胞頻度のほか、間葉系幹細胞マーカーとされる CD90 と、血管内皮前駆細胞マーカー CD133、VEGFR2、CD34 の頻度も同時に測定し、肺動脈血行動態および予後と比較検討した。

#### b) 基礎研究

NGFR 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いて肺高血圧モデルを作成し、NGFR 陽性細胞の肺高血圧症病態形成への関与を検討した。

8~12 週齢の NGFR 遺伝子欠損および野生型マウスを用いて 10%低酸素下で 3 週間飼育し、低酸素誘発性肺高血圧モデルを作成した。心臓超音波装 (VEVO®2100-70MHz) を用いて、イソフルラン吸入麻酔下に心エコーを施行し、右室壁厚、PAT/PET 比 (推定肺動脈圧の評価)、左室駆出率を毎週評価した。さらに、イソフルラン吸入麻酔下にマウスの内頸静脈より Miller カテーテルを挿入し、右房圧、右室収縮期圧を測定した。安楽死後に肺および心臓を摘出し、組織学的評価ならびに RT-PCR を実施した。また、NGFR 遺伝子欠損マウスに放射線照射後、WT および NGFR 遺伝子欠損マウスの骨髄をそれぞれ移植し、骨髄由来の NGFR 陽性細胞の働きを評価した。

### 4. 研究成果

本研究において、間葉系幹細胞の中でも、多分化能、増殖能に優れた NGFR (nerve growth factor receptor) 陽性細胞に注目し、臨床研究において NGFR 陽性細胞と肺高血圧症の重症度および予後との関連性を明らかにした。NGFR 陽性細胞は健常者と比較し肺高血圧症患者において有意に末梢血中に増加していることを確認した。さらに NGFR 陽性細胞は肺高血圧症における血行動態 (平均肺動脈圧、心係数、肺血管抵抗) と相関関係を認め、より重症な肺高血圧症において末梢血中 NGFR 陽性細胞が増加していることを確認した。

また、基礎研究にて NGFR 遺伝子欠損マウスを用いて、低酸素誘発性肺高血圧症モデル (PH モデル) を作成し、肺高血圧症の病態形成における NGFR 陽性細胞の役割を検討した。結果、NGFR 遺伝子欠損マウスは WT と比較し、右心カテーテル検査による右室収縮期圧が上昇し、肺の組織学的評価において有意な中膜肥厚を認め、低酸素誘発性肺高血圧症の増悪が示唆された。一方で、NGFR 遺伝子欠損マウスに放射線照射後、それぞれ NGFR 遺伝子欠損マウスおよび WT 骨髄移植し、同様に PH モデルを作成した。結果、NGFR 遺伝子欠損マウスと比較し、WT の骨髄移植した PH モ

デルにおいて、右室収縮期圧および肺動脈中膜肥厚の改善が得られた。これらの結果から、NGFR陽性細胞が肺高血圧症の病態形成において保護的効果を有する可能性が推察された。今後、NGFR陽性細胞の肺血管リモデリングに関する機序解明にむけ、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chiaki Goten; Soichiro Usui; Shinichiro Takashima; Oto Inoue; Kosei Yamaguchi; Daiki Hashimuko; Yusuke Takeda; Ayano Nomura; Kenji Sakata; Shuichi Kaneko; Masayuki Takamura	4. 巻 24
2. 論文標題 Important Role of Endogenous Nerve Growth Factor Receptor in the Pathogenesis of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1868
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24031868	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 Chiaki Goten, Soichiro Usui, Shin-Ichiro Takashima, Oto Inoue, Hirofumi Okada, Masaya Shimojima, Kenji Sakata, Masaaki Kawashiri, Shuichi Kaneko, Masayuki Takamura	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Circulating nerve growth factor receptor positive cells are associated with severity and prognosis of pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pulmonary circulation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2045894021990525	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Chiaki Goten, Soichiro Usui, Oto Inoue, Hirofumi Okada, Shin-ichiro Takashima, Kenji Sakata, Masaaki Kawashiri, Masayuki Takamura
2. 発表標題 Nerve growth factor receptor is involved in maintaining homeostasis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 ESC congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五天 千明, 薄井 莊一郎, 高島 伸一郎, 井上 己音, 岡田 寛史, 坂田 憲治, 川尻 剛照, 高村 雅之
2. 発表標題 肺高血圧症病態形成におけるNgfrの役割
3. 学会等名 肺高血圧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chiaki Goten
2. 発表標題 Circulating CD271 is Associated with the Severity of Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五天 千明
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症におけるCD271陽性細胞の役割
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環器学会学術集会
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
---------	---------