

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08267

研究課題名(和文) 肺動脈平滑筋標識マウスを用いた新規肺動脈成長促進因子の探索

研究課題名(英文) Exploring novel proangiogenic factors of pulmonary artery using a LacZ reporter mouse for pulmonary artery smooth muscle

研究代表者

内田 敬子 (UCHIDA, Keiko)

慶應義塾大学・保健管理センター(日吉)・准教授

研究者番号：50286522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：チアノーゼ性心疾患にしばしば合併する肺動脈低形成は有効な治療がなく予後不良因子である。本研究では肺動脈の発生機序を解明することを目的とした。肺高血圧症の疾患遺伝子の一つTbx4の発現を、肺器官培養系においてアンチセンスオリゴヌクレオチド(AS)によって抑制したところ、肺の気道分岐や血管内皮の成熟が抑制された。また、先天性複雑性心疾患の家系解析から2遺伝子の複合変異が疾患原因の候補として絞り込まれ、両者のダブル欠損マウスで心臓発生が障害されるだけでなく、胎仔肺の肺動脈像に特徴が認められ、肺血管発生への影響が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児循環器の医療現場で遭遇するチアノーゼ性心疾患にはしばしば肺動脈低形成が合併する。肺動脈低形成には有効な治療がないために手術適応をも左右する予後不良因子である。心臓発生においては分子レベルでの基礎研究が比較的進んでいる一方で、肺血管発生の発生は肺血管細胞の系譜を含めて不明な点が多い。本研究は、小児循環器の臨床で遭遇する二つの疾患、肺高血圧症と単心室を含む先天性複雑性心疾患の疾患原因遺伝子の発現を抑制した肺やマウス個体を、私たちが独自に開発した肺動脈標識技術を用いて観察し、肺動脈発生に関する知見を得たこと学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Hypoplasia of pulmonary arteries, a frequent complication of cyanotic congenital heart disease, is a poor prognostic factor with no effective treatment. The aim of this study was to elucidate the mechanism of pulmonary artery development in order to develop any targets of the treatment for their hypoplasia. We found that the expression of Tbx4, one of the disease-causing genes for pulmonary arterial hypertension, was suppressed by antisense oligonucleotides (AS) in a lung organ culture system, resulting in suppression of airway branching and maturation of vascular endothelium in the lungs. In addition, a genetic analysis applied to the family members including patients with congenital complex heart disease found the compound variations of the two genes as a candidate cause of the disease caused not only was cardiac development impairment, but the pulmonary arteriogram of fetal lungs was also characterized, suggesting an effect on pulmonary vascular development.

研究分野：小児循環器

キーワード：肺動脈発生 先天性心疾患 平滑筋 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

肺循環は、陸上に棲む生物が酸素を取り入れ、二酸化炭素を排出し、生体機能を維持するために必須の循環である。Fallot 四徴症や肺動脈閉鎖症などのチアノーゼ性先天性心疾患では、しばしば肺動脈低形成が合併し、肺循環血流量の減少と右左短絡により低酸素血症を来し、手術治療が必要となる。肺動脈低形成合併例に対する一期的心内修復手術の成績は不良なため、体肺短絡手術により肺血流を増やし、肺動脈の成長を促す治療が実施されているが、肺動脈低形成が十分に改善せず、心内修復手術不能となる例も多い。また、心内構造異常が手術によって修復されても、肺動脈低形成が残存する例では、生涯、低酸素血症が改善せず予後不良である。また、肺高血圧症は、肺高血圧症治療薬の開発が進む昨今においても難治性疾患の一つであり、最終的には肺移植が必要となる。先天性心疾患にも肺高血圧症を伴うことがあり、その原因の一つに肺動脈低形成があると考えられている。内科的治療薬の開発や手術治療が飛躍的な進歩を遂げた現在の小児循環器領域においても、いまだ救えない命、改善できない QOL をなくすために、肺動脈低形成の発症機構を解明し、それに基づいた新たな治療戦略を開発することは、残された喫緊の課題である。

哺乳類の血管系は大きく体血管系と肺血管系に二分される。どちらも内膜・中膜・外膜の3層構造を基本とする点で類似するが、低酸素応答性などの機能面では異なる特徴を持つ。従来の血管発生学は主に体血管を対象に研究が進められており、肺血管の発生研究は遅れている。心臓流出路から伸長する近位肺動脈は既存の血管から新たな管腔を作る過程である Angiogenesis によって、肺末梢部の遠位肺動脈は未分化細胞から *de novo* に脈管が生まれ出される過程である Vasculogenesis によって発生することが提唱されたが、遠位肺動脈も胎生早期から中枢側と連結し Angiogenesis によるという説もある。また、内膜を構成する内皮細胞と比較して、中膜の主要成分である平滑筋細胞を対象とした研究は限られている。現在、肺動脈平滑筋細胞の起源として、近位肺動脈平滑筋細胞へは心肺前駆細胞が、遠位肺動脈平滑筋細胞へは Tbx4+ などの肺間葉系細胞が最も有力と考えられているが詳細は不明である。

我々は、以前 2 型イノシトール三リン酸受容体 (*IP3R2*) の翻訳開始領域に *LacZ* 遺伝子を挿入した *IP3R2-LacZ* マウスを用いて、*IP3R2* が胎生期から生後に至るまで肺内で肺動脈に特異的に発現していること、さらに体血管平滑筋細胞や気道平滑筋細胞、肺動脈内皮細胞には発現せず、肺動脈平滑筋細胞に特異的に発現することを発見した(1,2)。本研究では、肺動脈平滑筋細胞を標識する *IP3R2-LacZ* マウスを有用なツールとして、胎生期における肺動脈平滑筋細胞の細胞系譜とその分化により、どのように肺動脈は発生するのか、その分子メカニズムを解析する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺動脈の特徴的構造と機能の発生・成長を促進する肺動脈特有の因子を探索することである。本研究の独自性は、我々が独自に開発し研究してきた肺動脈平滑筋細胞を特異的に標識可能な *IP3R2-LacZ* マウスをツールとして用い、肺動脈低形成の病態の根底にある肺動脈発生機序を解明する点である。発生学では、分子および細胞レベルの研究成果を臓器・個体レベルで立体的な評価へと繋げていくことが必要とされ、しばしば困難だが、本研究は独自のツールとして *IP3R2-LacZ* マウスを用いて、この立体的評価を実現する。

## 3. 研究の方法

(1) 肺動脈性肺高血圧症疾患原因遺伝子 *TBX4* バリエーションの特定と *in vitro/ex vivo* 機能解析  
肺動脈性肺高血圧症患者の *TBX4* 遺伝子エクソンとその近傍のイントロン領域の遺伝子解析  
特発性/遺伝性肺動脈性肺高血圧症患者の 75 検体を対象に *TBX4* のエクソンと近傍イントロンをサンガー法で解析し、検出されたレアバリエーションのうち *in silico* 解析により病原性が疑われるバリエーションを特定した。

*TBX4* の病的バリエーション候補の *in vitro* 解析

細胞内局在、*FGF10* の 5' UTR を用いたルシフェラーゼアッセイと ChiP アッセイを実施した。

*Tbx4* ノックダウンによる *ex vivo* 解析

マウス胎子の肺器官培養を用いて *Tbx4* アンチセンスオリゴヌクレオチドによるノックダウンを行い、肺気道ならびに血管の形態観察と下流候補因子の同定をおこなった。

(2) 先天性複雑性心疾患原因候補の特定と *in vitro/in vivo* 機能解析

単心室を含む先天性複雑性心疾患を複数持つ家系の遺伝子パネル解析

単心室型の先天性複雑性心疾患の姉妹が存在する家系に対して遺伝子パネル(心臓関連遺伝子 197 遺伝子を搭載)を次世代シーケンサーにて実施し、レアバリエーションのうち *in silico* 解析をおこなった。

病因候補バリエーションの *in vitro* 解析

下流シグナルのルシフェラーゼアッセイを実施した。

病因候補遺伝子のダブルノックアウトマウスの解析

2種候補遺伝子のダブルノックアウトマウスの発生初期の心臓形態の観察と下流候補遺伝子の発現解析、ならびに *IP3R2-LacZ* マウスを用いた whole-mount Xgal 染色による肺血管の描出をおこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肺動脈性肺高血圧症における *TBX4* バリエント

*TBX4* のエクソン上ならびに近傍イントロンに病因候補バリエントを2種特定した。核移行シグナルを欠いたバリエントは核移行が障害され、どちらのバリエントも *FGF10* の転写調節領域への結合が低下し、*FGF10* の転写活性を低下させたため、この2種のバリエントは機能低下型変異と同定した(図1)。

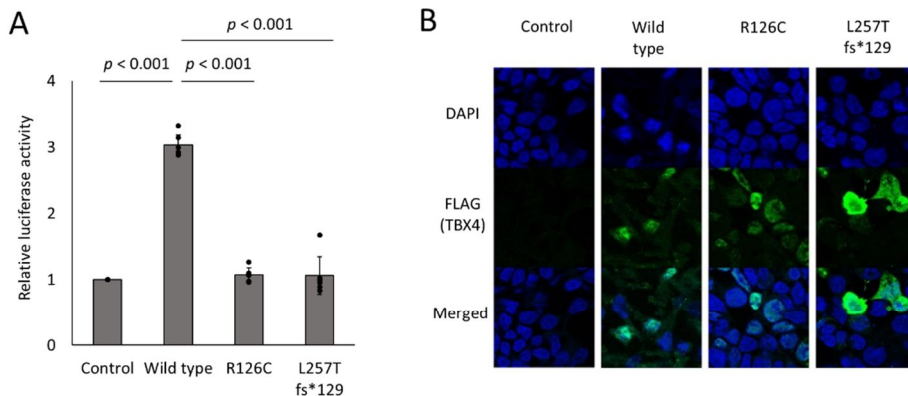


図1 肺動脈性肺高血圧症患者で認められた*TBX4*バリエントの機能解析

肺動脈性肺光家辰翔患者の*TBX4*遺伝子配列解析の結果、T-box型DNA結合領域内のミスセンスバリエントc.376C>T/p.R126Cと、T-box型DNA結合領域のC末端側のフレームシフトバリエントc.768\_769insA/p.L257T fs\*129が検出された。A. *Fgf10*のプロモーター領域をターゲット配列に用いたルシフェラーゼアッセイ。野生型ではシグナルが増強しているが、2つのバリエント蛋白では増強せず、下流ターゲットに対する転写活性が低下している。

B. 免疫細胞染色。TBX4 (FLAG) を緑、核 (DAPI) を青で示す。フレームシフトバリエントp.L257T fs\*129ではTBX4蛋白の核への局在性を認めず、核移行が障害されている。

肺器官培養において、*Tbx4*の発現をノックダウンすると、肺気道分岐数の減少が認められ肺発生が抑制された。さらに、肺血管内皮細胞マーカーのうち *Tie2* と *Klf4* の発現が特異的に低下し、肺血管内皮の成熟が障害されていることが示唆された。*TBX4* は肺高血圧症の主要な病因シグナルである BMP シグナルの抑制にも関連することが報告されており、それに加えて、肺の発

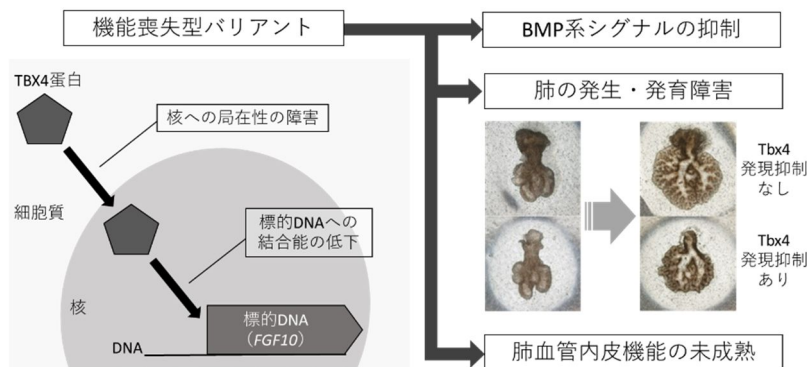


図2 *TBX4*機能低下による肺動脈性肺高血圧症発症機序

生・発育障害と肺血管内皮細胞の未成熟が原因で *TBX4* 機能低下による肺動脈性肺高血圧症が発症する機構が考えられた(図2)(3)。

##### (2) 先天性複雑性心疾患における *NODAL* と *TBX20* コンパウンドバリエント

単心室を伴う先天性複雑性心疾患の姉妹とその両親に対して行った遺伝子パネル解析の結果から得られたレアバリエントのうち、*in silico*解析ならびに Gene ontology 解析から心臓発生に関与が疑われる疾患原因遺伝子の候補として、*NODAL* と *TBX20* のバリエントのコンパウンドヘテロ接合が挙げられた。ルシフェラーゼアッセイから2遺伝子のレアバリエントはともに下流シグナルの転写活性を低下させたため、機能低下型と考えられた。*Nodal* と *Tbx20* のダブルノックアウト胎仔マウスの心臓発生を胎生9.5日で観察したところ、*Tbx20* シングルノックアウトマウスと比較して、*Nodal* ヘテロノックアウト *Tbx20* ホモノックアウトマウスにおいて将来心臓流出路となる領域の有意な低形成が観察された(図3)。さらに *Tbx20* シングルノックアウトマウス

において *Nodal* の下流因子である *Pitx2c* の発現が低下しており、*Nodal* と *Tbx20* が相補的に機能し、おそらく下流候補である *Pitx2c* の機能低下を介して複雑性心疾患が発生する可能性が示唆された(4)。

*Nodal* と *Tbx20* のダブルヘテロ接合性ノックアウトマウスの胎生 18 日の肺において、*IP3R2-LacZ* マウスと交配することによって肺動脈を可視化したところ、一部の胎仔肺に正常コントロールには無い LacZ 陽性肺血管が認められ、肺血管異常の併発も疑われた。

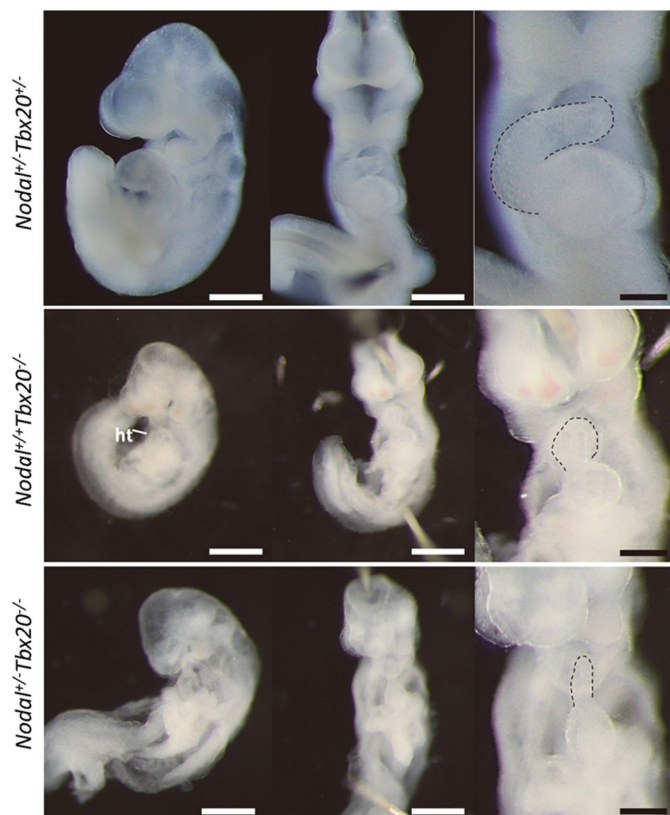


図3 *Nodal*<sup>+/+</sup>*Tbx20*<sup>-/-</sup>マウスでは心臓流出路が低形成になる  
点線領域は将来心臓流出路となる領域。ht, heart. スケールバー：左と中央は500 μm, 右は200 μm.

#### <参考文献>

1. Shibata A, Uchida K, Kodo K, Miyauchi T, Mikoshiba K, Takahashi T, Yamagishi H. Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits the progression of pulmonary arterial hypertension via calcium signaling and apoptosis. *Heart Vessels*. 2019 Apr;34(4):724-734. doi: 10.1007/s00380-018-1304-4. Epub 2018 Nov 20. PMID: 30460575.
2. Ishizaki-Asami R, Uchida K, Tsuchihashi T, Shibata A, Kodo K, Emoto K, Mikoshiba K, Takahashi T, Yamagishi H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 2 as a novel marker of vasculature to delineate processes of cardiopulmonary development. *Dev Biol*. 2020 Feb 15;458(2):237-245. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.11.011. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31758944.
3. Yoshida Y, Uchida K, Kodo K, Shibata H, Furutani Y, Nakayama T, Sakai S, Nakanishi T, Takahashi T, Yamagishi H. Genetic and functional analyses of TBX4 reveal novel mechanisms underlying pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol*. 2022 Oct;171:105-116. doi: 10.1016/j.yjmcc.2022.07.002. Epub 2022 Jul 29. PMID: 35914404.
4. Yoshida Y, Uchida K, Kodo K, Ishizaki-Asami R, Maeda J, Katsumata Y, Yuasa S, Fukuda K, Kosaki K, Watanabe Y, Nakagawa O, Yamagishi H. A genetic and developmental biological approach for a family with complex congenital heart diseases-evidence of digenic inheritance. *Front Cardiovasc Med*. 2023 Apr 25;10:1135141. doi: 10.3389/fcvm.2023.1135141. PMID: 37180804; PMCID: PMC10166836.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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<br>Kodo Kazuki, Uchida Keiko, Yamagishi Hiroyuki   | 4. 巻<br>8            |
| 2. 論文標題<br>Genetic and Cellular Interaction During Cardiovascular Development Implicated in Congenital Heart Diseases | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Cardiovascular Medicine  | 6. 最初と最後の頁<br>653244 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fcvm.2021.653244   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Kazuki Kodo, Keiko Uchida, Hiroyuki Yamagishi   | 4. 巻<br>8            |
| 2. 論文標題<br>Genetic and Cellular Interaction During Cardiovascular Development Implicated in Congenital Heart Diseases | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Cardiovascular Medicine  | 6. 最初と最後の頁<br>653244 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fcvm.2021.653244   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshida Yu, Uchida Keiko, Kodo Kazuki, Shibata Hironori, Furutani Yoshiyuki, Nakayama Tomotaka, Sakai Satoshi, Nakanishi Toshio, Takahashi Takao, Yamagishi Hiroyuki | 4. 巻<br>171             |
| 2. 論文標題<br>Genetic and functional analyses of TBX4 reveal novel mechanisms underlying pulmonary arterial hypertension  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Molecular and Cellular Cardiology   | 6. 最初と最後の頁<br>105 ~ 116 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.yjmcc.2022.07.002   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshida Yu, Uchida Keiko, Kodo Kazuki, Ishizaki-Asami Reina, Maeda Jun, Katsumata Yoshinori, Yuasa Shinsuke, Fukuda Keiichi, Kosaki Kenjiro, Watanabe Yusuke, Nakagawa Osamu, Yamagishi Hiroyuki | 4. 巻<br>10            |
| 2. 論文標題<br>A genetic and developmental biological approach for a family with complex congenital heart diseases-evidence of digenic inheritance   | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Cardiovascular Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>1135141 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fcvm.2023.1135141   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉田祐, 内田敬子, 山岸敬幸              |
| 2. 発表標題<br>TBX4 機能低下は肺低形成と肺血管内皮機能異常をきたす |
| 3. 学会等名<br>第6回日本肺高血圧・肺循環学会              |
| 4. 発表年<br>2021年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>内田敬子, 吉田祐, 石崎怜奈, 福島裕之, 山岸敬幸      |
| 2. 発表標題<br>遺伝子解析を実施した特発性 / 遺伝性肺動脈性肺高血圧症の臨床像 |
| 3. 学会等名<br>第6回日本肺高血圧・肺循環学会                  |
| 4. 発表年<br>2021年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Keiko Uchida  |
| 2. 発表標題<br>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in cardiovascular development and diseases |
| 3. 学会等名<br>第99回日本生理学会大会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉田祐, 内田敬子, 山岸敬幸             |
| 2. 発表標題<br>TBX4機能低下は肺低形成と肺血管内皮機能異常をきたす |
| 3. 学会等名<br>第6回日本肺高血圧・肺循環学会             |
| 4. 発表年<br>2021年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>内田敬子, 住友直文, 石崎怜奈, 土橋隆俊, 福島裕之, 山岸敬幸       |
| 2. 発表標題<br>主要体肺側副動脈を伴う区域性肺高血圧症に対する治療効果              |
| 3. 学会等名<br>第7回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会・第28回日本小児肺循環研究会(合同開催) |
| 4. 発表年<br>2022年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>土井庄三郎, 石井卓, 山岸敬幸, 内田敬子, 細川奨, 石崎怜奈, 石田秀和, 高月晋一, 福島裕之, 稲井慶, 小垣滋豊 |
| 2. 発表標題<br>小児～成人における先天性心疾患を伴う肺高血圧レジストリの整備                                 |
| 3. 学会等名<br>第7回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会・第28回日本小児肺循環研究会(合同開催)                       |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石井卓, 内田敬子, 石田秀和, 細川奨, 高月晋一, 石崎怜奈, 小垣滋豊, 福島裕之, 稲井慶, 山岸敬幸, 土井庄三郎 |
| 2. 発表標題<br>本邦における先天性心疾患を伴う肺高血圧症のレジストリ研究                                   |
| 3. 学会等名<br>第7回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会・第28回日本小児肺循環研究会(合同開催)                       |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>内田敬子, 住友直文, 石崎怜奈, 土橋隆俊, 福島裕之, 山岸敬幸                                    |
| 2. 発表標題<br>CHD-PHの大規模登録研究(JACPHR)に登録した当科の主要体肺側副動脈を伴う区域性肺高血圧症に対する肺高血圧治療薬の効果に関する検討 |
| 3. 学会等名<br>第58回日本小児循環器学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計1件

|                          |                 |
|--------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>三浦大、山岸敬幸       | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>中外医学社          | 5. 総ページ数<br>276 |
| 3. 書名<br>小児心電図のみかた, 考えかた |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|