

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：84404
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K08484
研究課題名(和文) 組織特異的AHRノックアウトマウスを用いた肺動脈性肺高血圧症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension using tissue-specific Ahr knockout mice

研究代表者
岡澤 慎 (Okazawa, Makoto)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：40414130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(Pulmonary Arterial Hypertension: PAH)は肺小動脈や肺細小動脈に原因不明の狭窄・閉塞を来す、厚労省指定難病である。PAH治療に使用可能な薬剤は何れも血管拡張薬のため、新しい治療薬の開発が喫緊の課題である。本研究では、芳香族炭化水素受容体AHRの活性化がPAHの発症・重症化を引き起こすメカニズムを検討した。組織特異的AHR欠損マウスや重症度の異なるモデル動物等の解析により、PAHの病態形成に関与する可能性のある組織・細胞が示唆され、血管内皮細胞におけるAHR依存性の遺伝子発現変化がPAH重症化の一要因となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症(Pulmonary Arterial Hypertension: PAH)は肺動脈に原因不明の狭窄・閉塞を来して肺動脈圧の上昇から右心不全に至る予後不良の厚労省指定難病である。PAH治療に使用可能な血管拡張薬には限界があり、別の機序に基づく創薬が待たれている。本研究では、芳香族炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor: AHR)に着目し、種々の動物モデルを駆使し、関与する組織・細胞とAHRの下流分子を同定した。本研究結果から、AHRの下流分子がPAHの新規創薬ターゲットとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe disease that causes occlusion in the small pulmonary arteries, leading to elevation of pulmonary arterial pressure and eventually to right-sided heart failure. All current therapeutic drugs for PAH target vasodilation. The PAH patients with advanced stages still have poor prognoses. Therefore, the development of a novel therapeutic drug other than vasodilators has been awaited. Aryl hydrocarbon receptor (AHR), a nuclear receptor/transcription factor, detoxifies xenobiotics and regulates the differentiation and function of various cells. In this study, we demonstrated that AHR is an essential transcription factor for the pathogenesis of PAH using several PAH model animals and human peripheral blood mononuclear cells. Our results suggest that AHR and its downstream signal molecules are novel therapeutic targets for PAH.

研究分野：循環器内科学

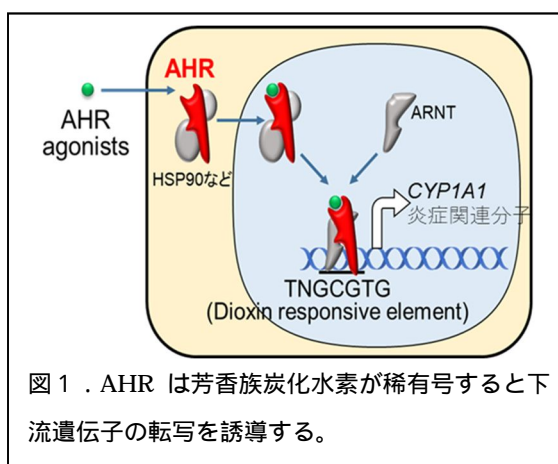
キーワード：肺高血圧症 肺動脈性肺高血圧症 アリルヒドロカーボン受容体 組織特異的遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension: PAH) は遠位の肺動脈 (肺小動脈や肺細小動脈) に原因不明の狭窄・閉塞を来して、肺動脈圧の上昇から右心不全を来す。内科的治療に不応の場合は未だ予後不良の厚労省指定難病である。PAH の治療は、平滑筋の弛緩を促進する血管拡張薬が使用可能となり、近年予後は改善しつつある。しかしながら、重症患者の予後は未だに不良であり(Ogawa et al., 2017)、PAH 治療薬に抵抗性を示す患者の予後も極めて不良であるため、既存の肺血管拡張薬と異なる分子機序に基づく新しい治療薬の開発が待たれている。

研究代表者らのグループはマウスで最も汎用される PAH モデル動物である低酸素誘発性肺高血圧症 (低酸素性 PH) マウスで、低酸素により肺動脈内皮細胞から分泌される炎症性サイトカインの interleukin-6(IL-6)が肺で Th17 細胞を誘導し、Th17 細胞由来の interleukin-21(IL-21)が PAH 病態を促進することを報告した(Hashimoto-Kataoka et al., 2015)。IL-21 の発現制御をする上流の転写因子に芳香族環状炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor: AHR) (Apetoh et al., 2010) (図 1) が報告されていたことから、研究代表者らは AHR に着目した。

ヒトと同様の PAH 重症病態を形成する唯一のモデルの Su/Hx(Sugen5416/低酸素)ラットモデル (Abe et al., 2010)の発症メカニズムは、一般的に VEGFR2 阻害による血管新生阻害により内皮細胞がアポトーシス耐性を獲得するためと説明されている(Apetoh et al., 2010)。一方、研究代表者らは、SU5416 が有する AHR アゴニスト活性に着目(Mezrich et al., 2012)し、“AHR が PAH 病態の制御因子である”との仮説を立てて、検証実験を開始した。AHR の内在性リガンドである FICZ の投与と低酸素負荷が PAH を発症させることを見出し、独自に作製したノックアウトラットで、AHR が Su/Hx モデルの PAH 病態形成の重要な制御因子であることを見出した。しかしながら、研究開始当時、PAH 発症・重症化に関わる AHR 下流シグナルについては全く不明であり、どの細胞の AHR 活性化が、どのような遺伝子発現変化を引き起こすことで PAH 発症・重症化につながるのか全く分かっていなかった。

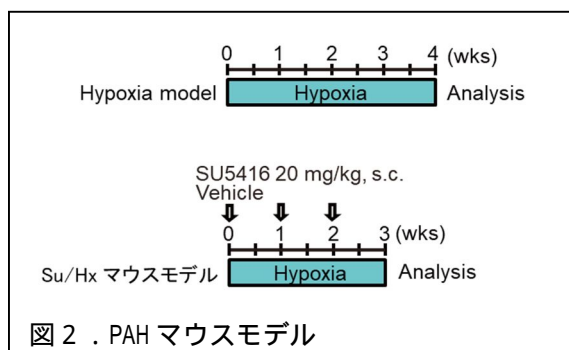


2. 研究の目的

研究代表者らの予備検討の結果から、AHR の活性化が PAH 病態形成に重要な役割を果たす可能性を見出したが、その詳細は不明であった。そこで、本研究では、PAH 発症・重症化における AHR の役割を組織特異的 AHR 欠損マウスや初代培養系、PAH モデル動物の遺伝子発現の比較を生化学的、分子生物学的手法を用いて検討し、PAH の新規創薬ターゲットの候補の同定や新規 PAH 診断法に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

Ahr-flox マウスを各種組織特異的 Cre マウスと交配し、組織特異的 Ahr 欠損マウスを作製した。低酸素誘発性 PAH モデルマウスは、10%低酸素下で 4 週間飼育することで作製した (図 2 上) より重症な PAH モデルマウスとして、20mg/kg SU5416 を皮下に毎週投与し、並行して 10% O₂ 下で 3 週間飼育する Su/Hx マウスモデルを作製した (図 2 下)。肺動脈圧への影響を右心カテーテルにより右室収縮気圧 (right ventricular systolic pressure: RVSP) を測定することで、生理学的に検討した。また、心臓への影響は右室 / 左室重量比により評価し、肺小動脈の中膜肥厚を検討した。遺伝子発現変化はマウスおよびラット肺から Trizol 試薬により回収した total RNA を使用した。網羅的遺伝子発現変化はマウス肺の遺伝子発現は DNA マイクロアレイにより、ラット肺の遺伝子発現は RNA-sequencing により解析し、比較した。



4. 研究成果

AHR は、比較のコビキタスに発現する分子である。SuHx 動物の免疫組織学的解析から、AHR は、肺の血管内皮細胞や免疫細胞で活性化していることが明かになった。さらに、SuHx ラットによる骨髄移植実験では、骨髄由来細胞、血管内皮細胞、いずれの AHR も病態形成に一定の役割を果たすことが示唆された (Masaki T et al, PNAS 2021, 図 3)。そこで、マウスにおいて、血管内皮細胞特異的 Cre マウス (VE-cadherin Cre マウス)、CD4 T 細胞特異的 Cre マウス (CD4 Cre マウス)、自然免疫系特異的 Cre マウス (Cd11c Cre マウス) と AHR flox マウスの交配を行い、PAH モデルを検討した。その結果、血管内皮細胞特異的 AHR 欠損マウスでは、RVSP も右室/左室重量比もコントロールと有意な差はなかった (図 5)。一方、自然免疫系細胞特異的欠損マウスでは、有意差は無いものの病態が悪化する可能性が示唆された。また、CD4 T 細胞特異的欠損マウスでは、有意差は無いものの病態が軽減する傾向が見られた。

上記、血管内皮細胞での AHR 欠損マウスの結果から、ラットと異なりマウスでは血管内皮細胞の AHR は PH 病態形成に主要な役割を果たさない可能性が示唆された。一方、同じ SuHx モデルでもラットでは内膜病変、叢状病変が形成され重症化する。そこで、マウスとラットの肺で Su/Hx モデルで誘導される遺伝子の比較を行った。Cyp1a1 や Ahrr, Cyp1b1 等、典型的な AHR 下流分子は、マウス、ラットいずれの肺でも mRNA の発現誘導がかかることがわかった (図 5)。一方、マウスでのみ、あるいはラットでのみ発現上昇する遺伝子も複数存在した (図 5)。そこで、ラットの肺で優先的に誘導がかかる分子を探索するために、マウスで発現が 4 倍未満しか誘導されないが、ラットで 4 倍以上誘導される分子を検討したところ、110 遺伝子が同定された。さらに、ラットの肺で AHR 依存性に有意に誘導がかかる分子のみに絞ることで 27 遺伝子を同定した (図 5)。その中には、基質未同定のキナーゼ *Stk32b* や分泌タンパク質が複数同定された。*Stk32b* は Su/Hx モデルの腎臓などでは、SuHx モデルで顕著な変化は示さず、肺でのみ発現誘導がかかり、肺では特に、血管内皮細胞に特異的に発現することがわかった。そこでこの分子をヒト肺血管内皮細胞に強制発現させると、細胞質に局在が認められ (図 6) 遺伝子発現解析などの結果、内皮間葉転換を誘導することが示唆された。

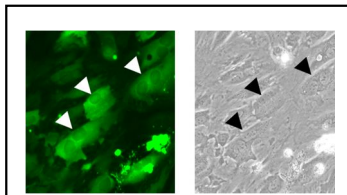


図 6. 同定したキナーゼは細胞質に局在した。

次に、AHR が肝臓で薬物代謝に重要な役割を果たすことから、肺高血圧病態における肝臓の AHR の役割を検討するために、肝臓特異的 Cre マウス (Albumin-Cre) マウスと Ahr flox マウスを交配し、肝臓特異的に欠損させた。このマウスで Su/Hx モデルを検討した結果、RVSP の有意な上昇が観察された (図 7)。SU5416 の類似体は肝臓で P450 1A によっても代謝されることから、Su/Hx ラットでは、SU5416 によって AHR 依存的に Cyp1a の発現誘導がかかることで、SU5416 は P450 1A により代謝され、活性を失っていくが、肝臓特異的欠損マウスでは、SU5416 の分解が抑制されることで、病態が悪化した可能性が考えられた。

さらに、モデル動物から得られた遺伝子発現解析の結果をヒトで検討するため、血液検体から採取した PBMC の RNA 発現解析を行った。その結果、AHR の発現と正に相関する分子が複数同定された。薬剤誘発性 PAH の一つである青黛誘発性 PAH に関して、青黛の主成分に AHR アゴニストで

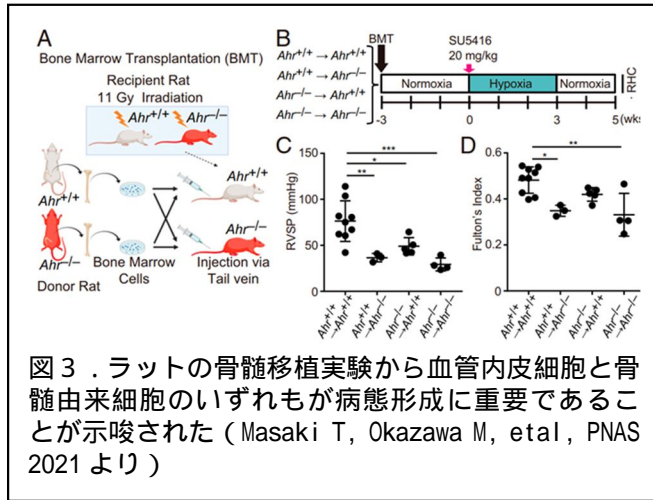


図 3. ラットの骨髄移植実験から血管内皮細胞と骨髄由来細胞のいずれもが病態形成に重要であることが示唆された (Masaki T, Okazawa M, et al, PNAS 2021 より)

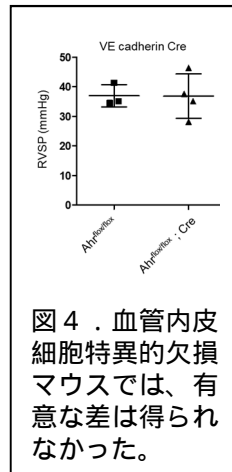


図 4. 血管内皮細胞特異的欠損マウスでは、有意な差は得られなかった。

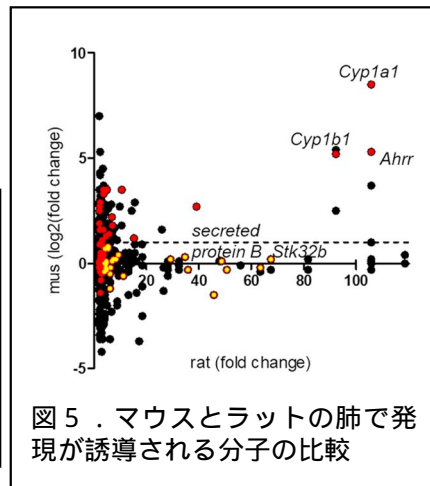


図 5. マウスとラットの肺で発現が誘導される分子の比較

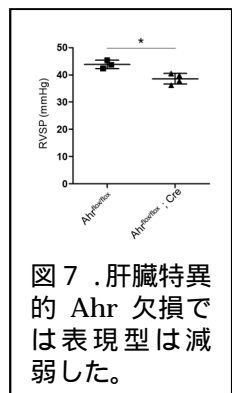


図 7. 肝臓特異的 Ahr 欠損では表現型は減弱した。

あるインディルピンが含有されていることから、青黛誘発性 PAH は AHR を介して誘発されることが考えられ、ラットモデルから示した。そこで、ヒトの PAH でも AHR 依存性が高い検体として、青黛誘発性患者 PBMC の遺伝子発現を検討し、*AHRR* などのマウスやラットでも誘導される分子を同定した。それ以外の分子として、*CCL3*, *IL1B*, *PTGS2* などの炎症関連分子や *EGRI*, 2 等転写因子を同定した (図 8)。

本研究により、PAH 病態形成において AHR が関与する組織・細胞が示唆され、PAH 病態形成に関与する可能性のある AHR 下流分子が同定された。

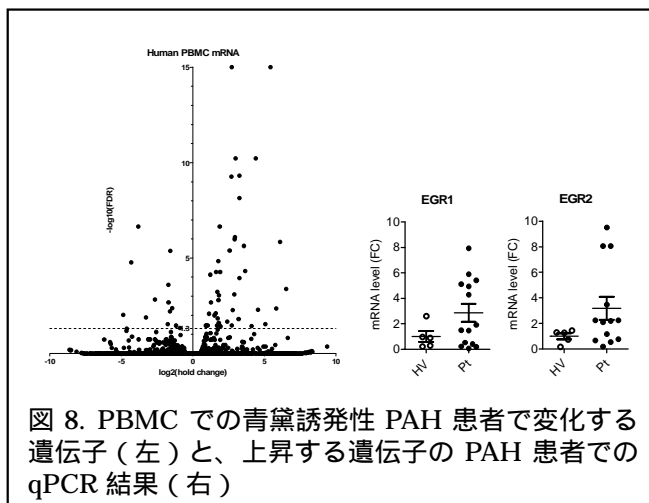


図 8. PBMC での青黛誘発性 PAH 患者で変化する遺伝子 (左) と、上昇する遺伝子の PAH 患者での qPCR 結果 (右)

(引用文献)

Abe, K., Toba, M., Alzoubi, A., Ito, M., Fagan, K.A., Cool, C.D., Voelkel, N.F., McMurtry, I.F., and Oka, M. (2010). Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* *121*, 2747-2754.

Apetoh, L., Quintana, F.J., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E.J., Sherr, D.H., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2010). The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* *11*, 854-861.

Hashimoto-Kataoka, T., Hosen, N., Sonobe, T., Arita, Y., Yasui, T., Masaki, T., Minami, M., Inagaki, T., Miyagawa, S., Sawa, Y., *et al.* (2015). Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, E2677-2686.

Mezrich, J.D., Nguyen, L.P., Kennedy, G., Nukaya, M., Fechner, J.H., Zhang, X., Xing, Y., and Bradfield, C.A. (2012). SU5416, a VEGF receptor inhibitor and ligand of the AHR, represents a new alternative for immunomodulation. *PLoS One* *7*, e44547.

Ogawa, A., Satoh, T., Tamura, Y., Fukuda, K., and Matsubara, H. (2017). Survival of Japanese Patients With Idiopathic/Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Cardiol* *119*, 1479-1484.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 J T, 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	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10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡澤慎、正木豪、浅野遼太郎、稲垣薫克、石橋知彦、大郷剛、中岡良和
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症・重篤化における芳香族炭化水素受容体の役割
3. 学会等名 第6回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡澤慎、正木豪、浅野遼太郎、稲垣薫克、石橋知彦、山岸亜紀子、真鍋侑資、大郷剛、中岡良和
2. 発表標題 芳香族炭化水素受容体を介した肺動脈性肺高血圧症の病態形成メカニズム
3. 学会等名 第29回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Okazawa, Takeshi Masaki, Ryotaro Asano, Tadakatsu Inagaki, Tomohiko Ishibashi, Akiko Yamagishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takeshi Ogo, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 Aryl Hydrocarbon Receptor Plays an Essential Role in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 American heart association scientific sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makoto Okazawa, Takeshi Masaki, Ryotaro Asano, Tadakatsu Inagaki, Tomohiko Ishibashi, Akiko Yamagishi, Yusuke Manabe, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takeshi Ogo, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 The role of aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Masaki, Makoto Okazawa, Ryotaro Asano, Tadakatsu Inagaki, Tomohiko Ishibashi, Akiko Yamagishi, Yusuke Manabe, Yasushi Sakata, Takeshi Ogo, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 Aryl hydrocarbon receptor is essential for the pathogenesis of pulmonary arterial 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 2021年

1. 発表者名 正木 豪、岡澤 慎、浅野 遼太郎、稲垣 薫克、石橋 知彦、大郷 剛、中岡 良和
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症における芳香族炭化水素受容体の役割
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡澤慎、稲垣薫克、中岡良和
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症患者の末梢血単核球における芳香族炭化水素受容体関連分子の遺伝子発現の検討
3. 学会等名 第7回JCVA（日本心臓協会）年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡澤 慎, 正木 豪, 山岸 亜紀子, 水島 沙織, 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 浅野 遼太郎, 大郷 剛, 中岡 良和
2. 発表標題 PH 病態形成における芳香族炭化水素受容体と低酸素誘導因子の関係
3. 学会等名 第7回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡澤 慎, 正木 豪, 山岸 亜紀子, 水島 沙織, 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 浅野 遼太郎, 大郷 剛, 中岡 良和
2. 発表標題 重症肺高血圧症モデルラットを用いた芳香族炭化水素受容体および低酸素誘導因子依存性の遺伝子発現制御の解析
3. 学会等名 第30回 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡澤 慎, 正木 豪, 山岸 亜紀子, 水島 沙織, 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 浅野 遼太郎, 中岡 良和
2. 発表標題 AHR依存的に発現誘導される肺血管リモデリング関連分子の探索
3. 学会等名 第8回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 重症肺高血圧症、治療抵抗性肺高血圧症、又は薬剤性肺高血圧症の予防又は治療薬	発明者 中岡良和、岡澤慎、 正木豪、大郷剛、浅 野遼太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/00028	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	中岡 良和 (Nakaoka Yoshikazu) (90393214)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

	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
研究協力者	大郷 剛 (Ogo Takeshi) (80617077)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター (84404)	
研究協力者	稲垣 薫克 (Inagaki Tadakatsu) (20638366)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・血管生理学 部・上級研究員 (84404)	

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