

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17137

研究課題名（和文）肝臓の網羅的遺伝子発現解析から探る肺高血圧症の新規病態形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Exploring the new mechanisms of pulmonary hypertension with Liver RNA sequencing

研究代表者

浅野 遼太郎（Asano, Ryotaro）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・非常勤研究員

研究者番号：60827004

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）：肺高血圧症は、遺伝的素因、膠原病、短絡性心疾患、肝障害など様々な背景疾患と関連して肺動脈リモデリングを生じる。肺動脈リモデリングの機序は未だ不明だが、何らかの背景疾患に共通した経路で障害を受けて肺高血圧症病態を形成していると考えられている。肝臓は、多臓器と密接に関連する人体最大の臓器で、肺高血圧症でも重要な役割を果たしている報告もあり、詳細は不明だが、肝臓を中心とした「肺-肝-腸相関」が存在する可能性がある。本研究では、モデル動物の肝臓RNAシーケンス解析と肺高血圧症患者検体の網羅的な解析を通じて、肝臓における保護遺伝子Xが肺高血圧症で重要な働きをすることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肝臓は肺高血圧症の病態形成機構の中でも重要な役割を果たしていることが裏づけられた。特に遺伝子Xは、肝臓での代謝関連する、肺高血圧症の保護的遺伝子であることを見出した。これにより近年注目を集める門脈圧亢進に伴う肺高血圧症を中心として肺高血圧症全般の新たなバイオマーカーや治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary hypertension causes remodeling of the pulmonary arteries in association with a variety of background diseases, including genetics, collagen disease, congenital heart disease, and liver injury. The mechanism of pulmonary artery remodeling is still unknown, but it is likely that some common pathway of background disease is impaired to form the pulmonary hypertension pathology. The liver is the largest organ in the human body, that is closely linked to multiple organs, and it has been reported that it may also play an important role in pulmonary hypertension. In this study, through liver RNA sequencing analysis of animal models and comprehensive analysis of pulmonary hypertension patient samples, we found that the protective gene X in the liver plays an important role in pulmonary hypertension.

研究分野：肺高血圧症

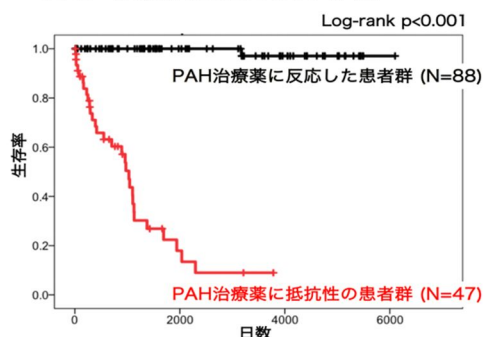
キーワード：肺高血圧症 網羅的遺伝子発現 RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension ; PAH) は、原因不明の機序で肺動脈にリモデリングを生じ、右心不全から死に至る難病である。PAH 治療薬には現在 3 系統の肺血管拡張薬が存在するが、それらに抵抗性を示す患者は 5 年生存率が 22%と極めて予後不良であるため、異なる分子機序に基づく新しい治療薬の開発が望まれている (図 1)。

PAH は、遺伝的素因、膠原病、短絡性心疾患、肝障害など様々な背景疾患と関連しているが、何らかの背景疾患に共通した経路で障害を受けて肺高血圧症病態を形成している可能性が高い。肝臓は、多臓器と密接に関連する人体最大の臓器で、門脈圧亢進症に伴う肺高血圧症 (PoPH) という病態も存在しており、PAH の病態形成メカニズムで重要な役割を果たしている可能性が高いと考えた。

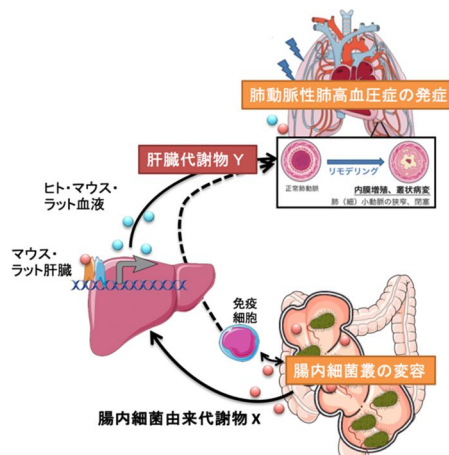
図1. 治療抵抗性PAHの予後



2. 研究の目的

本研究は、肝臓を中心とした「肺 肝 腸相関」が、PAH 病態形成メカニズムにおいて重要な役割を果たすかを検証することを目的とした (図 2)。

図 2. PAH における肺—肝—腸相関



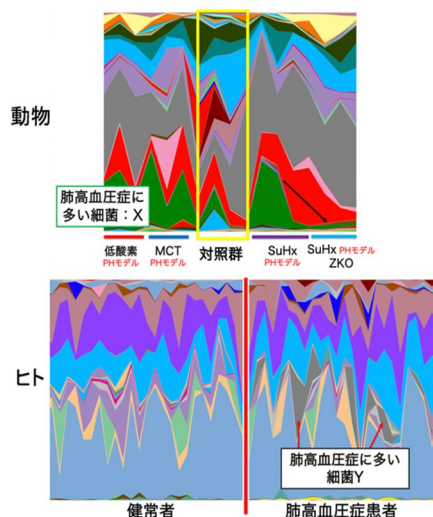
3. 研究の方法

PAH 病態形成に関わる肝臓の代謝や遺伝子発現変化を中心とした「肺 肝 腸相関」を明らかにするため、腸内細菌叢解析、肺高血圧症モデルラットや肝障害・門脈圧亢進症モデルラット (+ 肺高血圧症誘導刺激) を用いた肝臓や肺での RNA シークエンシング解析を行う。網羅的な遺伝子発現変化から PAH 病態に関与すると思われる肝臓での候補遺伝子を同定し PAH 病態に迫る。さらに、ヒトでの多臓器連関や遺伝子動態の変化を解析するため、PoPH 患者を中心に PAH 患者の臨床検体を集積した。

4. 研究成果

まず肺高血圧症モデルラットの腸内細菌叢を解析した。その結果、モノクロタリン (MCT) 負荷、低酸素負荷、重症 PAH モデルである SU5416/低酸素/正酸素 (SuHx) 負荷ラットという 3 系統の異なるモデルにおいて、対照群と比較して腸内細菌叢の構成が大きく変化 (Dysbiosis) していることを明らかにした (図 3)。さらに PAH 特異的腸内細菌叢を明らかにすることを目的とし、倫理委員会の承認を得て、臨床検体の集積を開始した。その結果、現在も臨床研究は継続しているが、25 例ずつの中間解析で、PAH 特異的腸内細菌叢が存在していた (図 3 : 特願 2020-028865)。

図 3. PAH における腸内細菌叢変容



また肺高血圧症モデルラットにおいて、抗生剤経口投与により腸内細菌叢を無菌化するといずれの肺高血圧症モデルラットにおいても PAH 病態が改善することを明らかにし、何らかの腸内細菌由来代謝物が PAH 病態形成に重要である可能性が考えられた。

続いて肝臓での代謝の影響を見るため、腸管で吸収された物質を直接肝臓に輸送されないように

図 4. 門脈結紮による腸-肝循環遮断は PAH 病態を抑制する

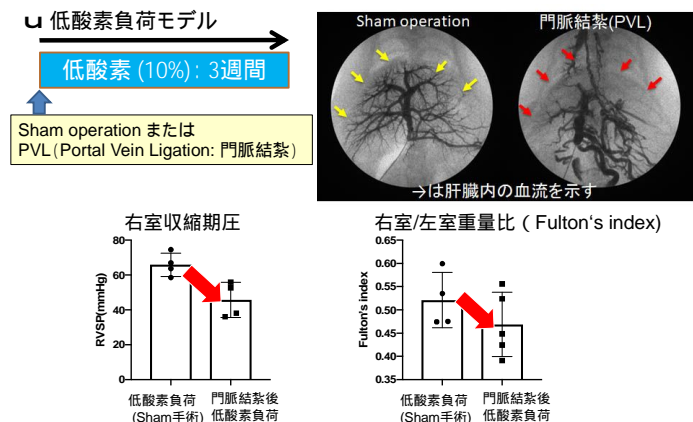
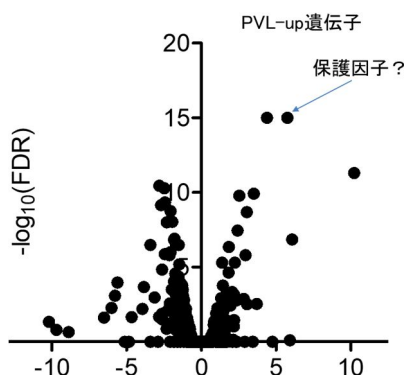


図 5. 部分的門脈結紮により肝臓で発現が変化する遺伝子



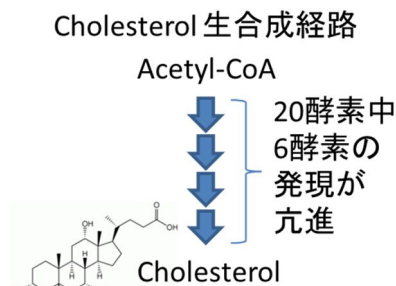
部分的に門脈結紮したラットを作製し低酸素負荷による肺高血圧症誘導をかけると、PAH 病態が大幅に減弱するという結果が得られた (図 4)。すなわち、腸内細菌叢変容によってもたらされる腸内細菌由来代謝物は、肝臓での代謝や何らかの分子の発現誘導を介して肺動脈リモデリングに寄与すると考えられた。

そこで、部分的門脈結紮ラットを用いて、肺高血圧症誘導によって肺や肝臓でどのような遺伝子発現変化を起こすかを明らかにするべく、RNA シークエンシング解析を行った。その結果、部分的門脈結紮ラットラットの肝臓において発現が上昇する遺伝子群を複数同定した (図 5)。この中の一つに、イオンチャネル結合タンパク質に結合するタンパク質が含まれ、PAH を保護する可能性が考えられた。そこで、アデノ随伴ウイルスベクター、ノックアウトマウス、ノックアウトラットを作製し、PAH モデル動物を作製して肺高血圧症病態を検討しており、この分子を減弱させると PAH 表現型が悪化する傾向が確認されつつある。これらを踏まえて、ELISA 法で同分子の血中濃度測定ができないか、検証実験を開始している。

また、コレステロール生合成に関わる酵素群の発現が亢進しており (図 6)、部分的門脈結紮によってコレステロール関連代謝物が増加することが示唆された。コレステロール代謝物が PAH に保護的に働く可能性も考えられる。PAH 病態において、エストロゲンは発症と関連するが、病態悪化に関しては保護的に働くという報告があるため、そこには肝臓でのコレステロール代謝が関係する可能性もあると考えており、重要な知見と考えている。

以上のように、PAH 病態形成メカニズムにおいて、肝臓を中心とした「肺 肝 腸相関」が重要な役割を果たす可能性が捉えられてきた。今後はノックアウト動物での検証と並行して、患者の臨床検体を用いた解析などから、本研究で明らかにした分子動態を明らかにしたい。これにより新たなバイオマーカー開発や治療標的となる可能性がある。

図 6. 門脈結紮によりコレステロール生合成酵素の発現が亢進した



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masaki Takeshi, Okazawa Makoto, Asano Ryotaro, Inagaki Tadakatsu, Ishibashi Tomohiko, Ogo Takeshi, Kishimoto Tamamitsu, Nakaoka Yoshikazu et al.u	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 Amioka Naofumi, Nakamura Kazufumi, Kimura Tomonari, Ohta-Ogo Keiko, Tanaka Takehiro, Toji Tomohiro, Akagi Satoshi, Nakagawa Koji, Toh Norihisa, Yoshida Masashi, Miyoshi Toru, Nishii Nobuhiro, Watanabe Atsuyuki, Asano Ryotaro, Ogo Takeshi, Nakaoka Yoshikazu, Morita Hiroshi, Yanai Hiroyuki, Ito Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Pathological and clinical effects of interleukin-6 on human myocarditis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2021.03.003	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 Mori Hiroyoshi, Ishibashi Tomohiko, Inagaki Tadakatsu, Okazawa Makoto, Masaki Takeshi, Asano Ryotaro, Manabe Yusuke, Ohta-Ogo Keiko, Narazaki Masashi, Ishibashi-Ueda Hatsue, Kumanogoh Atsushi, Nakaoka Yoshikazu	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肺高血圧症改善用組成物、肺高血圧症の予後予測方法、肺高血圧症の重症度判定補助方法および肺高血圧症の診断補助方法	発明者 中岡 良和, 浅野 遼太郎, 大郷 剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/006448	出願年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------