

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17194

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧症におけるペリオスチンを介した血管リモデリング進展機構の解析

研究課題名(英文) The mechanism of periostin-associated vascular remodeling progression in pulmonary arterial hypertension.

研究代表者

堤 建男 (TSUTSUMI, TAKEO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50866150

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)：マトリックス細胞タンパクであるペリオスチン(POT)の肺高血圧症(PH)進展への関与を検証した。POTは、ヒト肺血管平滑筋および内皮細胞とマクロファージの遊走能を増加させた。VEGF受容体拮抗薬と低酸素刺激により誘導されたPHマウスにおいて、野生型と比較してPOT<sup>-/-</sup>マウスではPH進展およびM2マクロファージの肺動脈への集積が抑制され、肺動脈リモデリングも軽度であった。肺組織中のマクロファージ関連ケモカインや右心室におけるマクロファージ集積もPOT<sup>-/-</sup>マウスで減少していた。血清POT値は、PH患者で有意に上昇しており、予後予測因子として有用である可能性が示唆された。

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は、様々な治療薬の開発によって著しく予後が改善しているが、治療抵抗例では、肺移植が必要となる重篤な疾患である。特に重症例では、病態に血管リモデリングが強く関与することが知られているが、現在使用できる治療薬は血管拡張薬のみであり、リモデリングを標的とした新規治療薬の開発が待たれる。本研究は、細胞外マトリックス蛋白であるペリオスチンが、肺高血圧症モデルマウスにおいて、M2マクロファージを介して血管リモデリング進展に関与することを示した。この結果は、リモデリングを標的とした肺高血圧症の新たな治療戦略の進歩に貢献する可能性を含むと考えている。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that periostin, a matricellular protein, is involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension (PH). Periostin increased the migratory capacity of vascular component cells and macrophages. In PH mice induced by a vascular endothelial growth factor receptor antagonist (Sugen5416) and hypoxia exposure (SuHx), periostin<sup>-/-</sup> mice had reduced accumulation of PH and M2 macrophages in pulmonary arteries (PA) compared to wild type. PA remodeling was also mild in periostin<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type mice. In addition, expression of macrophage-associated chemokines in lung tissue and accumulation of macrophages in the right ventricle were also reduced in SuHx periostin<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, serum periostin levels were significantly elevated in PH patients compared to healthy controls, suggesting that it may be a useful prognostic biomarker.

研究分野：肺循環障害

キーワード：肺高血圧症 ペリオスチン マクロファージ 血管リモデリング バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension : PAH) の主病態は肺動脈の異常収縮と血管リモデリングである。PAH の病初期には、血管内皮細胞の機能障害により異常収縮が惹起され、引き続いて血管平滑筋を主体とする血管中膜肥厚が生じる。進行期になると、血管内腔を閉塞するような増殖性内膜病変が進行し、最終的に非可逆性の血管リモデリングに至る。PAH に特徴的なこの閉塞性内膜病変は、肺循環動態の悪化に特に重要な役割を果たすことが知られている。PAH の臨床上の大きな問題は、病初期は無症状であるため早期発見が難しい点である。ほとんどの症例では、肺動脈圧が上昇し血管リモデリングが進展した有症状期～進行期以降で診断される。強い線維化を伴う血管リモデリングが進行した症例は治療抵抗性となるため、早期発見・早期治療介入が重要であるが、残念ながら現時点で PAH 早期発見の有効な手段はない。今回我々は、早期の血管リモデリングを同定するバイオマーカーの候補として細胞外マトリックス蛋白質であるペリオスチンに注目した。ペリオスチンは、主に線維芽細胞から産生されてコラーゲン 1・テネイシン C・フィブロネクチンなどと結合し、組織の病的線維化形成に寄与することが知られている。併せて、ペリオスチンは細胞表面のインテグリン受容体と結合してマトリセルラー蛋白質として細胞の各種シグナルを制御する機能も有しており、気管支喘息や間質性肺疾患などの呼吸器疾患の病態進展に関与することが報告されている。さらに、血清ペリオスチン値が重症気管支喘息の治療反応性や特発性肺線維症の予後予測のバイオマーカーとなることも報告されている。加えて、ペリオスチンがマクロファージの集積に伴う炎症および組織修復機構を介して、動脈硬化の進展に関与する可能性も示唆されている。このような背景から、我々は“PAH を含む肺高血圧症の線維化を伴う肺動脈リモデリングにペリオスチンが関与している”と仮説をたて、研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の主な目的は以下の 2 点である。

ペリオスチンが肺高血圧症の病態進展に関与していることを、肺動脈のリモデリングに寄与する細胞および複数の肺高血圧症モデルを用いて検証する。

ヒト肺高血圧症患者の血清ペリオスチン増加の有無を確認し、さらに血清ペリオスチン値の肺高血圧症における臨床的バイオマーカーとしての有用性を検証する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト肺血管平滑筋細胞 (Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell: HPASMC)・ヒト肺血管内皮細胞 (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell: HPMVEC) におけるペリオスチン産生に関わる因子の検証

培養中の HPASMC に PDGF-BB・TNF- $\alpha$ ・TGF- $\beta$ 2 を、また HPMVEC に IL-1 $\beta$ ・TNF- $\alpha$ ・TGF- $\beta$ 2 を添加し、その後それぞれの細胞の培養上清中に含まれるペリオスチン濃度を測定した。

(2) ペリオスチンが血管リモデリングに関与する各種細胞の遊走に与える影響

ペリオスチンが HPMVEC, HPASMC, U937 (ヒトマクロファージ), RAW264.7 (マウスマクロファージ) の細胞遊走に与える影響を、chemotaxis assay を用いて検証した。さらに、ペリオスチンが細胞遊走に作用する際の実受容体を確認するため、抗インテグリン  $\alpha$ M 受

容体抗体 (CD11b) と抗インテグリン  $\alpha_v$  受容体抗体 (CD51) を用いて、HPASMC の細胞遊走の相違を評価した。

(3) PH 動物モデルを用いたペリオスチンの病態進展への関与

Sugen 5416 (VEGF 受容体-1,-2 阻害剤) と 10% O<sub>2</sub> 低酸素曝露による PH マウスモデル (SuHx モデル) および強い血管炎を誘導するモノクロタリンピロールを用いた PH マウスモデル (MCT モデル) を作成した。野生型(WT)正常酸素マウス(正常コントロール), ペリオスチンノックアウト(periostin<sup>-/-</sup>)正常酸素マウス, 野生型 SuHx/MCT マウス, ペリオスチンノックアウト SuHx/MCT マウスの各群に分けて、右心室圧・右室肥大・肺動脈血管リモデリングを比較検証した。

(4) 肺高血圧マウスモデルのリモデリングを伴う肺動脈におけるペリオスチンの発現

SuHx で PH を誘導した野生型もしくはペリオスチンノックアウトマウスの肺組織中のペリオスチンの発現を、Western blotting および蛍光免疫染色を用いて検証した。

(5) ペリオスチンが肺動脈および右心室心筋へのマクロファージ集積に与える影響

SuHx マウス (野生型およびペリオスチンノックアウト) の血管周囲への M1 および M2 マクロファージ集積を、蛍光免疫染色を用いて経時的に評価し、さらに右室心筋へのマクロファージの集積も比較検証した。

(6) マクロファージに関わる炎症性サイトカイン・ケモカインの発現、およびの線維芽細胞由来増殖因子の発現に対するペリオスチンの関与

SuHx マウス (野生型およびペリオスチンノックアウト) の肺組織中を用いて、肺高血圧症進展に関与する炎症性サイトカイン (IL-6・TNF・IL-1 )、マクロファージの遊走に関与するケモカイン (CXCL1・CXCL2) さらに線維芽細胞由来増殖因子 (FGF2) の発現を検証した。併せて、肺組織中のマクロファージ遊走に関わるケモカインの発現も確認した

(7) ヒト肺高血圧症における血清ペリオスチン値の予後予測因子としての有用性の検証

ヒト肺高血圧症患者の血清におけるペリオスチン蛋白の発現を ELISA 法で確認し、ROC カープからカットオフ値を算出し、肺高血圧症における血清ペリオスチン値の予後予測因子としての有用性を検証した。

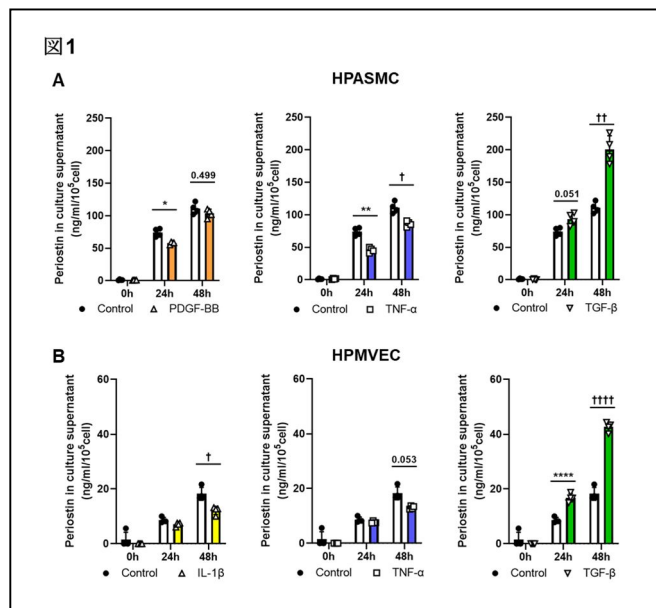
4. 研究成果

(1) TGF- $\beta$  は HPASMC および HPMVEC からのペリオスチン産生を刺激する

HPASMC への PDGF-BB および TNF- $\alpha$ 、および HPMVEC への IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  は、それぞれの細胞からのペリオスチン産生を亢進しなかったが、TGF- $\beta$  の添加によってどちらの細胞からのペリオスチンの産生も有意に増加した (図 1A、1B)。

(2) ペリオスチンは濃度依存性に細胞遊走能を増加する

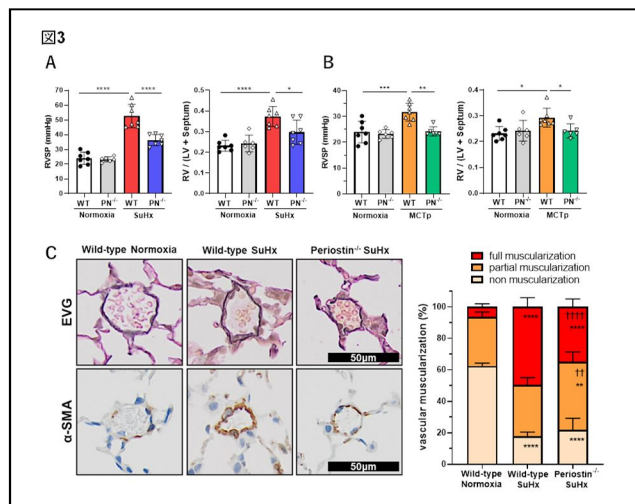
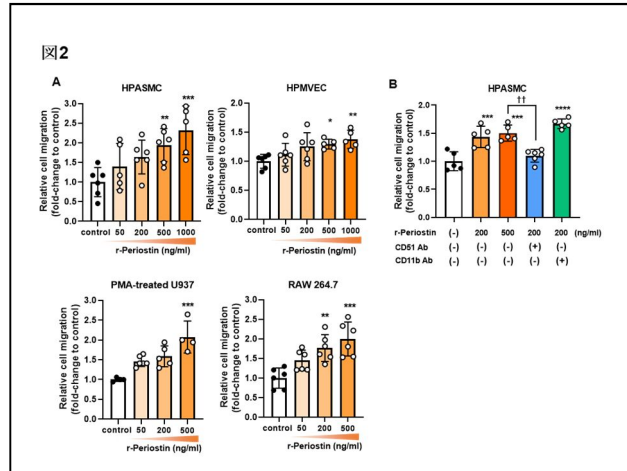
HPASMC、HPMVEC、ヒトおよびマウスのマクロファージ (U937 および RAW264.7) にペリオスチンを添加したところ、濃度依存性に各細胞の遊走能



は亢進した(図 2A)。その遊走能亢進は、抗インテグリン  $\alpha$ M 受容体抗体(抗 CD11b 抗体)では抑制されなかったが、抗インテグリン  $\alpha$ V 受容体抗体(抗 CD51 抗体)では有意に抑制された(図 2B)。

(3) 異なる PH マウスモデルにおいてペリオスチンは PH の進展に寄与する

SuHx および MCT で PH を誘導したマウスにおいて、ペリオスチンノックアウトマウスでは右室収縮期圧/右心室肥大の進展が抑制された(図 3A、3B)。さらに、SuHx マウスモデルの末梢肺動脈筋性化が、ペリオスチンノックアウトで有意に抑制された(図 3C)。

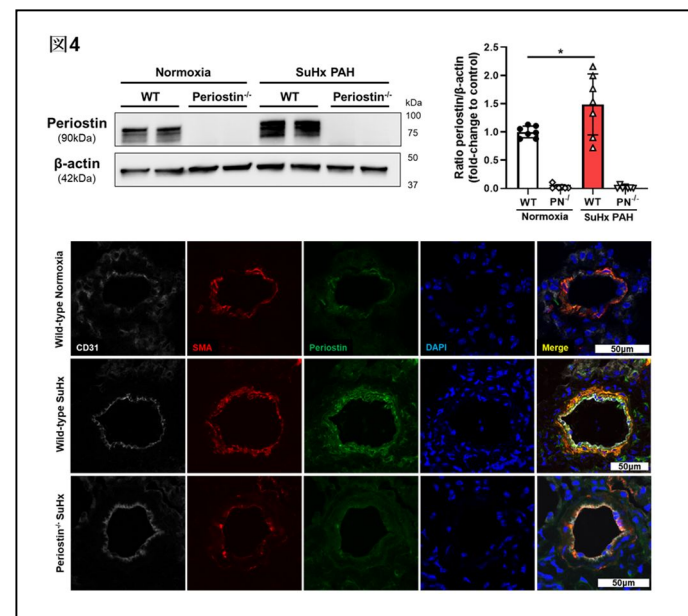


(4) SuHx マウスの肺組織中のペリオスチンの発現は増加

コントロールの野生型マウスと比較して、SuHx で PH を誘導した野生型マウスの肺動脈周囲や全肺組織中のペリオスチンの発現は増加していた(図 4)。

(5) 野生型 SuHx マウスの肺動脈/右心室への M2 マクロファージ集積はペリオスチンノックアウトで抑制

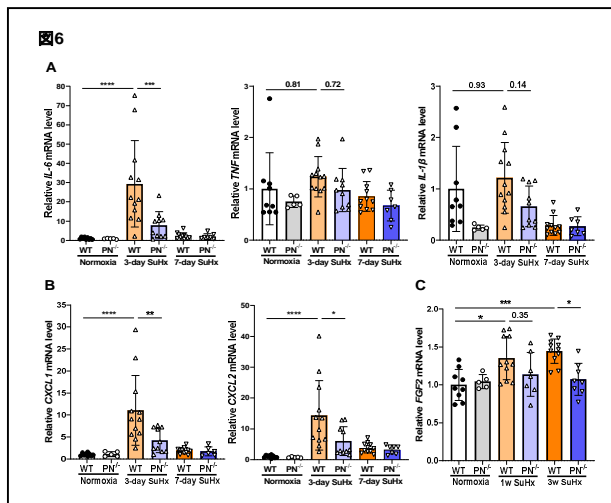
野生型 SuHx マウスのリモデリングした肺動脈周囲には、M2 マクロファージ (CD68 + CD206 +) が集積した。その集積は SuHx による PH 誘導 2 週後に最も増加していたが、ペリオスチンノックアウト SuHx マウスでは、M2 マクロファージの集積は増加しなかった(図 5A)。M1 マクロファージ (CD68 + CD11c +) に関しては、野生型およびペリオスチンノックアウトの SuHx マウスで、肺動脈周囲への集積に差は認めなかった (data not shown)。野生型 SuHx マウスの肥大した右心室心筋では、ペリオスチンノックアウトと比較して CD68 陽性細胞が有意に増加していた(図 5B)。





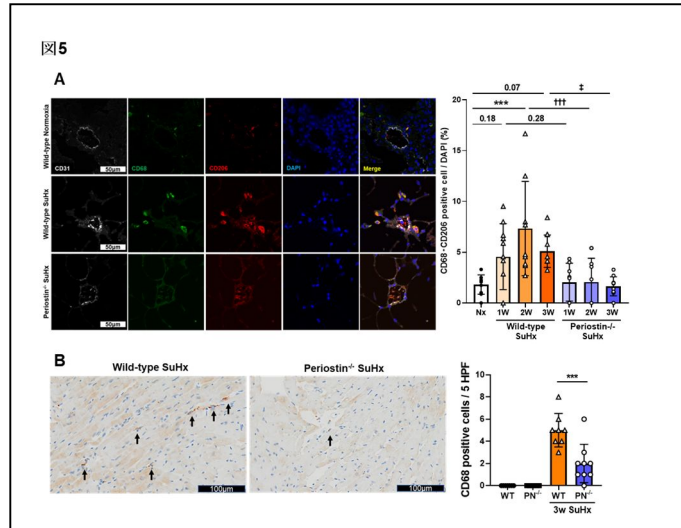
(6) ペリオスチンはマクロファージ関連ケモカイン・IL-6 および FGF2 の発現に關与

野生型 SuHx マウスの肺組織中の IL-6 (図 6A) および CXCL1・CXCL2 (図 6B) の発現は、ペリオスチンノックアウト SuHx と比較して、有意に増加していた。さらに肺高血圧症進展への関与が示されている FGF2 (図 6C) の発現も野生型 SuHx マウスで有意に増加していた。



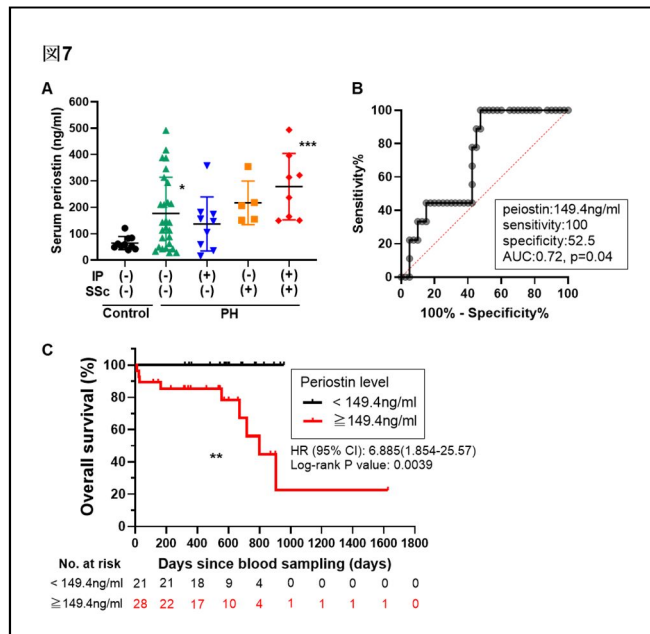
よび低値群の予後を後ろ向きに解析したところ、高値群の予後が有意に悪化していたことが示された (図 6C)。

以上 (1) ~ (7) の結果から、ペリオスチンが M2 マクロファージを介した血管リモデリングの進展によって肺高血圧症の病態進行に關与しており、さらに血清ペリオスチン値がヒト肺高血圧症の予後予測因子となる可能性が示唆された。



(7) ヒト肺高血圧症患者の血清ペリオスチン値は増加しており、高値群の予後が不良である可能性を示唆

血清ペリオスチンは、間質性肺疾患や皮膚硬化を伴う強皮症を有する患者において増加することが知られているが、そのいずれも合併しない肺高血圧症群においても、血清ペリオスチン値は正常コントロール群と比較して有意に増加をしていた (図 6A)。ROC カーブを用いて肺高血圧検出に最適な血中濃度を 149.4ng/ml と設定し (図 6B)、高値お



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 Yoshida Takashi, Nagaoka Tetsutaro, Nagata Yuichi, Suzuki Yoshifumi, Tsutsumi Takeo, Kuriyama Sachiko, Watanabe Junko, Togo Shinsaku, Takahashi Fumiyuki, Matsushita Masakazu, Joki Yusuke, Konishi Hakuoh, Nunomura Satoshi, Izuhara Kenji, Conway Simon J., Takahashi Kazuhisa	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Periostin related progression of different types of experimental pulmonary hypertension: A role for $M2$ macrophage and $FGF$ signalling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respirology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/resp.14249	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Yoshida, Takeo Tsutsumi, Tetsutaro Nagaoka
2. 発表標題 Periostin contribute to the development of vascular remodeling via enhanced M2 macrophage migration in pulmonary arterial hypertension.
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田隆司、長岡鉄太郎、永田祐一、鈴木宣史、堤建男、栗山祥子、松下雅和、小西博広、出原賢治、Simon J. Conway、高橋和久
2. 発表標題 マクロファージ遊走を介したペリオスチンのPAH病態進展への関与
3. 学会等名 第6回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田隆司、長岡鉄太郎、永田祐一、鈴木宣史、堤建男、栗山祥子、出原賢治、高橋和久
2. 発表標題 ペリオスチンはM2マクロファージ遊走を介してPAH血管病変の進展に関与する
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------