

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591385

研究課題名（和文）実験的肺高血圧の発症における IL-6-Th17/Treg 系の役割

研究課題名（英文）Role of IL-6-Th17/Treg system in the development of experimental pulmonary hypertension

研究代表者

三谷 義英（Mitani Yoshihide）

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60273380

研究成果の概要（和文）：実験的肺高血圧の発症、進展において、血管周囲の炎症細胞浸潤が時間、空間的に関連し、肺血管組織病変の形成に関わる事が証明された。特に、これらの炎症細胞は、種々の液性因子を産生する事、さらに代表的サイトカインである IL-6 と IL-17 が関与する可能性を示唆した。ヒト肺動脈性肺高血圧病変類似病変において、それらの因子が関与する可能性があり、新たな研究プロジェクトによる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that perivascular inflammatory cell infiltration may be temporally and spatially associated with the development of experimental pulmonary hypertension. Specifically, we showed that these infiltrating inflammatory cells contributed to the disease formation via releasing inflammation-related cytokines, IL-6 and IL-17. Further investigation is required to elucidate the role of these cytokines in the development of a new animal model, mimicking human pulmonary arterial hypertension.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：小児循環器学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺高血圧、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

（1）全体構想：肺動脈性肺高血圧（PAH）は、原発性ないし膠原病、HIV 感染症など幅広い疾患に関連して二次的に発症する難治性疾患で、治療法の開発の為には新たな病態解明が重要である。その為には、病態形成に関わるサイトカイン動態及び本症の背景にある遺伝素因を統合的に理解する事が重要な課題である。そこで、幾つかの理由から、炎症性 T 細胞 Th17 及びその上流で働き得る IL-6

を介して肺高血圧が誘発される可能性、さらに肺高血圧の原因遺伝子である骨形成蛋白 2 型受容体（BMP2）の遺伝子異常がこの系を介して肺高血圧を増悪させる可能性を、遺伝子改変マウス、抗サイトカイン抗体を用いて証明し、その分子機序を解明する事が本研究の全体構想である。

（2）PAH と炎症性サイトカイン：AH の病態において、原発性、二次性ともに炎症の関与が示唆されている。すなわち原発性の場

合、抗核抗体など自己抗体陽性、血中 IL-6、IL-1 β 値の上昇、レイノー症状陽性率が高い事、肺血管病変にマクロファージ、T リンパ球、樹状細胞の浸潤、MHC class II のアレルとの関連が知られ、二次的に発症する PAH は、種々の膠原病、HIV 感染などに伴う事が知られる。さらに動物モデルの植物毒素モノクロタリン誘発性肺高血圧ラット、慢性低酸素暴露肺高血圧動物モデル、Vasoactive intestinal peptide (VIP) 欠損肺高血圧マウスでは、肺血管にマクロファージ、T 細胞などの炎症細胞浸潤を認める。最近、Castleman's 病、POEMS 症候群など血中 IL-6 値の上昇する疾患でも PAH の合併が報告され、膠原病、HIV 感染症、慢性肺疾患において、肺高血圧合併例で血中 IL-6 値の上昇が認められ、肺高血圧病態への IL-6 の関与が興味深い。しかし、IL-6 の肺高血圧の病態における分子機序に関する報告はない。

(3) PAH と IL-6, IL-17: IL-6 は免疫応答、炎症、造血など多彩な生理機能を有するサイトカインで、その過剰産生は、関節リウマチなど自己免疫疾患、Castleman's 病の病態に関わり、抗 IL-6 抗体療法が有効とされるが、その機序は当初不明であった。一方、最近ヘルパー T 細胞のサブセットの中でも、Th1, Th2 と異なる IL-17 を産生する新規炎症性ヘルパー T 細胞サブセット (Th17)、それに拮抗する抗炎症性 T cell サブセット (Treg) が同定され、IL-17/Treg バランスは、自己免疫疾患モデル、慢性炎症に重要な働きをすると報告され注目される。さらに Naive T 細胞の Th17 への分化に IL-6 が必要で、Treg へ分化を IL-6 は抑制する事が明らかとなり、Th17/Treg バランスに IL-6 が重要な役割を果たす事が *in vitro* に加え *in vivo* でも明らかとなりつつある。しかし、IL-6, Th17/Treg バランスの肺高血圧での役割は不明である。また興味ある事に、最近 IL-2、レチノイン酸、VIP などは Th17/Treg バランスにおいて Th17 を抑制的に働くと報告されるが、BMP 受容体 II 型を介する経路が IL-6, Th17/Treg バランスに如何なる影響を及ぼすかは報告されていない。

2. 研究の目的

(1) IL-6 発現亢進、Th17/Treg のバランスの変化を野生型及び BMPR2 \cdot Nrf2 ダブル欠損マウスの肺高血圧モデルで検討する事、(2) IL-6 の関与は抗 IL-6 受容体抗体投与、IL-17 の関与は IL-17 欠損マウスないし抗 IL-17 抗体を用いて、肺高血圧への影響を検討する事、(3) 病変抑制と関連して、IL-6 の下流で働き得る肺高血圧関連物質エンドセリン、血小板由来増殖因子 (PDGF) の発現、血管壁肥厚、内皮活性化への影響、*in vitro* で BMP の

Th17/Treg 分化への影響を検討する。

3. 研究の方法

野生型マウス、BMPR2 \cdot Nrf2 欠損マウスにおける IL-6, IL-17/Tre 系の時系列の検討に低酸素暴露 day0, 2, 10, 21 で屠殺し組織を採取する。次に、各マウスで、低酸素の有無及び抗 IL-6 受容体抗体投与 (clone MR16-1, Chugai, 200 μ g/kg, day0 に 1 回腹腔内投与) か control rat IgG1 (Cappel) 投与かの 4 群に分け、day21 で抗体療法の肺高血圧指標への効果を検討した。BMPR2 \cdot Nrf2KO マウスでは、適宜各々単独欠損マウスでも検討する。適当な日数でサイトカイン動態への影響も検討した。

(1) ノックアウトマウスの準備と肺高血圧モデル作成 BMPR2(+/-) マウス (東京大学宮園浩平博士より供与)、Nrf2(-/-) マウス (筑波大学山本雅之博士より供与)、IL-17(-/-) マウス (東京大学岩倉洋一郎博士より提供) の 7 週齢雄を用いて肺高血圧の検討を行う。交配させる事により、前二者のダブル欠損マウスを作製する。

1/2 気圧 (380 mmHg, 10%酸素) 21 日間の慢性低酸素暴露マウスを作成する。低酸素暴露には既報の麻酔科備品の低酸素チャンバーを用いた。

(2) 実験的肺高血圧の評価

肺高血圧モデルを作成した後に、経胸壁右室穿刺により右室圧を測定した後、心肺組織を摘出する。心は右心室を左心室より切離し、その重量比から右室肥大を評価する。気管切開下の人工呼吸下で開胸し、右室切開により脱血還流し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、肺組織切片を抗 α 平滑筋アクチン抗体で染色する。肺血管病変の評価として、本来血管平滑筋を持たない肺動脈や肺胞管レベルの末梢肺動脈での血管平滑筋を持つ血管の割合 (末梢血管での筋性血管出現率) で求める (Mitani Y et al. Circulation 1997)、(Zaidi SH, Rabinovitch M et al. Circulation. 2002)。

(3) 肺組織からの T 細胞の採取と免疫学的解析

肺組織を細かく切った後 collagenase type II, 0.001% DNase で浮遊し、anti-CD4 beads (Dynabeads mouse CD4) を用い CD4+T 細胞を得た。刺激下 (PMA, ionomycin, BrefeldinA)、非刺激下で処置の後、CD4, CD45, IL-17, IL4, IFN γ , FoxP3 抗体で染色し、小児科備品の FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson) を用い CD4+CD45+ 細胞に gating して解析する。Naive T 細胞は、anti-CD4 beads, CD62L Microbeads を用いて採取し、Dynabeads Mouse CD3/CD28 T cell expander で刺激する。その後、IL-6 ないし TGF β を加え、BMP2, 4, 7 存在下で培養し、Th17/Treg の分化を解析する。

(4) RT-PCR による mRNA 発現及び Western

blot による蛋白発現解析

摘出肺の total RNA を TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて抽出し、逆転写酵素により cDNA を作成し、IL-6, IL-6 受容体, IL-17, IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4, IL-10, TGF β , endothelin, PDGF を Real time PCR (小児科備品の Light Cycler, Roche) により mRNA 発現を解析する。得られた蛋白を、IL-6 受容体、STAT3、phospho-STAT3 抗体を用いて Western blot 法により解析する。(Mitani Y. FASEB J 2000)

(5) 組織の免疫染色 (三谷義英が担当)

免疫染色は、抗 VCAM1, MOMA2, CD4 抗体を用い、ABC 法ないし当科備品の焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV1000, Olympus) で行う (Mitani Y. Eur Respir J. 2001) (Mitani Y, et al Thorax 1999)。

4. 研究成果

(1) BMPR2(+/-)Nrf2(-/-) 慢性低酸素暴露モデルの作成

BMPR2(+/-)Nrf2(-/-) マウスの 3 週間慢性低酸素暴露により肺高血圧モデルを作成した。しかし、野生型マウスと比べて収縮期右室圧の増悪は明らかではなく、肺血管病変の中膜肥厚、筋性化率に差があるかさらなる検討が必要である。

(2) 野生型慢性低酸素暴露マウスにおける IL-6-Stat3 系の働き: IL-6mRNA、可溶性 IL-6 受容体蛋白、下流の Stat3、リン酸化 Stat3 蛋白の発現を、それぞれ realtime RT-PCR、western immunoblot で検討した。慢性低酸素暴露マウス肺において、IL-6mRNA 発現は亢進し、可溶性 IL-6 受容体蛋白発現と Stat3 のリン酸化の亢進を認めた。そこで、IL6 受容体機能抑制性抗体を投与したが、慢性低酸素暴露マウスの収縮期右室圧は低下しなかった。肺血管病変の中膜肥厚、筋性化率に差があるかさらなる検討が必要である。

(3) IL-17 欠損マウスにおける慢性低酸素暴露肺高血圧への影響: IL-17 欠損マウスと野生型マウスの低酸素暴露の肺血管病変への影響: 3 週間慢性低酸素暴露では、収縮期右室圧に有意な変化を来さなかった。肺血管病変の中膜肥厚、筋性化率に差があるかさらなる検討が必要である。

(4) VEGF 受容体拮抗薬 Sugen/慢性低酸素暴露 (3 週間) マウスモデルの作成: 新規モデルである Sugen/hypoxia マウスモデルの作成実験を行った。ラットでの標準的 Sugen 投与量 10mg/kg 1 回、週 2 回 X 3 週間、100mg/kg 1 回投与を行ったが、低酸素暴露のみに比べて、有意な収縮期右室圧の上昇は認めなかった。そこで、100mg/kg において、下流のシグナルを検討した。下流の MAP kinase は 100mg/kg により、1-3 週において抑制効果を認めた。そこで、Sugen100mg/kg 投与を BMPR2(+/-)Nrf2(-/-) マウスで肺高血圧増悪

効果を検討した。しかし、右室圧としては有意な増悪を認めなかった。肺血管病変の組織学的検討で、増悪傾向も認めており、現在さらに検討中である。

(5) Sugen/慢性低酸素ラットモデルの作成: このプロトコールでは、経時的な収縮期右室圧の上昇を認め、3-5 週から内膜肥厚、5-13 週で叢状病変などヒト肺動脈性肺高血圧類似の肺血管病変を認めた。それらにおいて、IL-6mRNA、可溶性 IL-6 受容体蛋白、下流の Stat3、リン酸化 Stat3 蛋白の発現を、それぞれ realtime RT-PCR、western immunoblot で検討した。経時的に IL-6mRNA 発現は亢進し、可溶性 IL-6 受容体蛋白発現と Stat3 のリン酸化の亢進の傾向を認めた。このモデルは、ヒト肺動脈性肺高血圧と組織病変が類似であり、病変形成と IL-6-Stat3 系、IL-17 系の関わりを検討する、現在のプロジェクトに繋がった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1: Mitani Y, Ohashi H, Takabayashi S, (5 名中 1 番) Acute effect of sildenafil on hypoxemic patients (excluding those with Eisenmenger syndrome) with incurable congenital heart disease and disturbed pulmonary vasculature in the mid-term follow-up. Int J Cardiol. 2011 Jan 21;146(2):273-4. (査読有)

2 三谷義英, 新規治療薬の Potential 遺伝子治療、再生治療
メディカルビュー社、Heart View、p92-94、2011 (査読無)

3 三谷義英、川崎病と成人急性冠症候群
科学評論社、循環器内科、p366-370、2011 (査読無)

4: Hosoki K, Mitani Y, Takabayashi S, (5 名、2 番) Postnatal course of hypoplastic left heart complex and restrictive foramen ovale. Pediatr Cardiol. 2010 Feb;31(2):270-3. (査読有)

5: Sugino N, Mitani Y, Ohashi H, (8 名、2 番) Dynamic right ventricular outflow tract obstruction due to a swinging echolucent cyst on interventricular septum in a 4-year-old girl. Circulation 2010 Mar;121(12):e250-e251 (査読有)

6: Yokochi A, Itoh H, Mitani Y(8名中6番) Colforsin-induced vasodilation in chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. J Anesth. 2010 Jun;24(3):432-40.

(査読有)

7: Zhang E, Jiang B, Mitani Y (7名中5番) Effect of all-retinoic acid on the development of chronic hypoxia-Induced pulmonary hypertension. Circ J. 2010 Aug;74(8):1696-703. (査読有)

8: Yonekawa T, Mitani Y, Ohashi H. Three-dimensional echocardiographic imaging of a giant eustachian valve in an infant with reversed cyanosis. Pediatr Cardiol. 2010 Oct;31(7):1114-5.

(査読有)

9 三谷義英、PPHNに関連して、PHの pathogenesisと治療への考え方(総説) メジカルレビュー社、Fetal and Neonatal Medicine 2(1): 14-17, 2010. (査読無)

10 三谷義英、児童生徒の心臓性突然死と AED(総説)日本学校保健会、学校保健、283(1): 2-3, 2010. (査読無)

11 三谷義英、川崎病の冠動脈動脈瘤と急性冠症候群, エーザイ、CLINICIAN、590(57): 721-722, 2010 (査読無)

12 三谷義英、新生児・小児期の肺高血圧症の特徴、医薬ジャーナル社、医薬ジャーナル、46(12):89-93, 2010. (査読無)

13 三谷義英、児童、生徒の心臓性突然死に対する新しいアプローチ: AEDを用いた学校救急の可能性、若年者心疾患対策協議会誌 38(2), 9-14, 2010 (査読無)

14: Yokoyama K, Takabayashi S, Mitani Y (7名、5番) Removal of prostaglandin E2 and increased intraoperative blood pressure during modified ultrafiltration in pediatric cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2009 Mar;137(3):730-5. (査読有)

15: Mitani Y, Ohashi H, Sawada H(9名、1番) In Vivo Plaque Composition and Morphology in Coronary Artery Lesions in The Adolescents and Young Adults Long After Kawasaki Disease: A Virtual Histology-Intravascular Ultrasound Study Circulation. 2009 Jun 2;119(21):2829-36. (査読有)

16 三谷義英、特集: 肺高血圧における遺伝子異常(総説)、科学評論社、呼吸器科、16(3):237-242, 2009 (査読無)

[学会発表] (計12件)

1: Sawada H, Mitani Y, Yodoya N (8名中2番), Reduced BMPR-II Induces GM-CSF Translation by Impaired Stress Granule Response, Exacerbating Pulmonary Hypertension. The 76th Scientific meetig of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, Japan 2012. March 16

2: Mitani Y, Functional and Structural Alterations of Coronary Artery Lesions Late after Kawasaki Disease and Potential Impact on Acute Coronary Events in Adulthood: Perspectives from Pediatric Cardiology(Invited lecture) The 10th International Kawasaki Disease Symposium (Kyoto, February 9, 2012)

3: Mitani Y, Tsuda E, Kato H(16名中1番) Acute Coronary Syndrome in Adults with a History of Kawasaki Disease: A Japanese Nationwide Survey. American Heart Association, Orland, Nov 16, 2011

4: Mitani Y, Ohta K, Ichida F (15名中1番). Impact Of Public-Access Defibrillation At School On The Outcome After Out-Of-Hospital Cardiac Arrest Of Cardiac Origin In Elementary And Middle School Students: A Japanese Nationwide Survey. American Heart Association, Chicago, Nov 16 2010

5: Mitani Y, Ohta K, Ichida F (18名中1番) Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Elementary and Middle School Students in the Era of Public-Access Defibrillation: A Retrospective, Nationwide, Hospital-based Survey in Japan. American Heart Association, Orland, Nov 15, 2011.

6: Mitani Y, Pathogenesis of Pulmonary hypertension: An update (special lecture, invited). International forum for child intractable diseases (Tokyo, July 17 2010)

7: Mitani Y, New pulmonary vasodilators against intractable pulmonary vascular lesions (excluding Eisenmenger syndrome) associated with congenital heart disease: a mid-term study. The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society, Urayasu, Japan, July 7 2010.

8: Mitani Y, Impact of AED on out-of-hospital cardiac arrest in elementary and middle school students: a Japanese nation-wide survey (Panel discussion). The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society Urayasu, Japan, July 7 2010.

9: Mitani Y. Pathophysiology of Pulmonary Hypertension: An update (Symposium, Invited). The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society, Urayasu, Japan, July 7 2010.

10: 三谷義英, 肺高血圧症における炎症と骨髄由来幹細胞の役割: 新たな治療標的の可能性肺高血圧病態における骨髄幹細胞の役割と治療への応用. 第 57 回日本麻酔科学会学術集会 (福岡, June 3 2010)

11: Mitani Y Role of Inflammation and Bone Marrow-Derived Stem Cells in the Pathogenesis of Pulmonary Hypertension: Therapeutic Potential (Symposium, invited). The 20th Congress of the International Society for Heart Research Kyoto, Japan, May 13 2010

12: Kato T, Sawada H, Mitani Y (11名中11番) Bosentan promotes incorporation of bone marrow-derived endothelial cells but inhibits infiltration of macrophages into pulmonary vascular lesions in mice exposed to chronic hypoxia: A novel concept of bosentan therapy in pulmonary hypertension. American Heart Association, Orland, Nov 17 2009

[図書] (計3件)

1: 三谷義英, EBMに基づく肺高血圧へのアプローチ: 治療戦略とそのメカニズム、中外医学社、EBM 小児疾患の治療 2011-2012、p134-141、2011

2: 三谷義英 血管内皮機能
中山書店、ビクシス川崎病、160-163. 2009

3: 三谷義英 血管内超音波検査
中山書店、ビクシス川崎病、214-215. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 義英 (Mitani Yoshihide)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 60273380

(2) 研究分担者

熊本 忠史 (Kumamoto Tadashi)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50362348

丸山 一男 (Maruyama Kazuo)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20181828

新保 秀人 (Shimpo Hideto)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70179076

(3) 連携研究者
()

研究者番号: