2版

様　式　Ｃ－４１

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　８ 月 １６ 日現在

機関番号：８４４０４

研究種目：奨励研究

研究期間：2021～2021

課題番号：２１Ｈ０４２７７

研究課題名　膠原病性肺高血圧症の病態を反映した新規モデルマウスの免疫系細胞動態の解明

研究代表者

桐野　友美（Kirino, Tomomi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・実験補助員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　470,000円

研究成果の概要：膠原病に合併するPAH (CTD-PAH) の病理学的特徴を反映したマウス肺高血圧症モデルとして、所属研究室で開発したプリスタン／低酸素(PriHx)モデルを用いて、造血・免疫系の動態を解析した。PriHxマウスの肺および脾臓では、CD11b陽性の骨髄球系細胞の増加や、PD-1陽性のCD4 T細胞の増加などの免疫学的変化が認められた。また、肺においてIL-17産生CD4 T細胞の比率が増加していることが明らかとなり、PriHxモデルの肺高血圧症病態におけるTh17細胞の関与が示唆された。プリスタン投与マウスでは、骨髄内の前駆細胞レベルにも変化が認められた。

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) は厚生労働省の指定難病であり、予後不良の疾患である。全身性エリテマトーデス (SLE) などの 膠原病にはPAHを合併することがあるが、特発性/遺伝性PAH (I/HPAH) と比べても予後不良であり、分子病態の解明とそれに基づく新たな治療法が望まれている。膠原病に関連するPAHの病態を反映したモデルマウスを用いた本研究の成果は、CTD-PAHの病態解明に寄与し、新規治療法の開発などの臨床応用へ向けた基盤になると考えられる。

研究分野：免疫内科学

キーワード：肺高血圧症　炎症性サイトカイン

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究の目的

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は厚生労働省指定難病であり、治療成績向上のためにもその病態解明が不可欠である。研究代表者の所属グループは、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6（IL-6）や IL-21 が PAH の病態形成を促進することを明らかにしてきた(Hashimoto-Kataoka T, et al. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 2015;112:E2677)。サイトカイン産生に影響するものとして造血・免疫系細胞も重要であるが、PAH モデルにおける造血組織の網羅的解析は行われていない。このため、PAH モデル動物における造血・免疫系の動態を明らかにすることは、PAH の病態解明において重要である。

全身性エリテマトーデス（SLE）などの 膠原病（connective tissue disease; CTD）は PAH を合併することがあり、これらは膠原病に関連する PAH（CTD-PAH）と呼ばれる。CTD-PAH は特発性/遺伝性 PAH（I/HPAH）と比較しても予後不良であり、分子病態の解明とそれに基づく新たな治療法が望まれている。そのためには CTD-PAH の特徴を反映した動物モデルが必要である。研究代表者の所属グループでは、鉱油の一種であるプリスタン投与に慢性低酸素負荷を組み合わせたプリスタン／低酸素（PriHx）モデルマウスを新たに開発した（Mori H, et al. ***Circ J***. 2020;84:1163)。この PriHx モデルにおいても、造血系にどのような変化が生じているのかは十分に明らかになっていなかった。

本研究では、膠原病に関連する PAH（CTD-PAH）の特徴をよく反映したマウスモデルとして、所属する研究室で新たに開発したプリスタン／低酸素（PriHx）モデルを用いて、肺高血圧症モデルマウスの造血系・免疫系の動態を明らかにすることを目的とした。

２．研究成果

PriHx モデルは、雌の C57BL/6 マウスに 8 週齢でプリスタン 500μL を腹腔内投与して常酸素で 4 週間飼育後、10%低酸素下でさらに 4 週間飼育することで作成した。対照群として、8 週齢で生理食塩水を腹腔内投与し、常酸素で 8 週間飼育した雌の C57BL/6 マウスを用いた。16 週齢で肺、末梢血、脾臓、骨髄をサンプリングして、自動血球計測器による血球数測定、フローサイトメトリー解析等を行い、造血系・免疫系の表現型を Control 群と PriHx 群とで比較した。

コントロールマウスと比較して、PriHx マウスでは CD11b 陽性の骨髄球系細胞が肺および脾臓で増加していた。また、PD-1 陽性の CD4+ T 細胞の比率も PriHx モデルで増加するなど、免疫学的な変化が認められた。さらに、PriHx モデルの肺においては IL-17A 産生 CD4+ T 細胞の比率がコントロールと比べて増加しており、PriHx モデルの肺高血圧症病態における Th17 の関与が示唆された（図 1）。

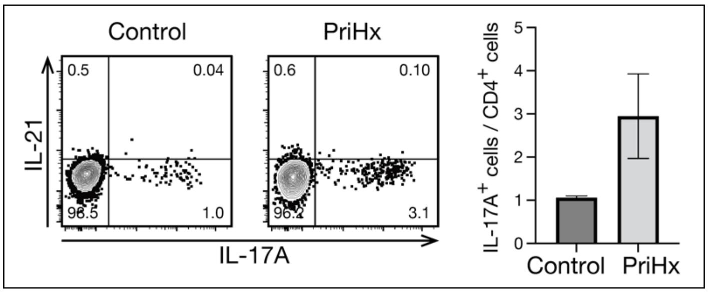

図 1. PriHx モデルの肺では IL-17A 産生 CD4 T 細胞が増加する

プリスタン投与マウスでは、低酸素負荷をかける前の投与後 4 週時点で、末梢血のヘモグロビン値上昇などの血液学的変化が観察された。このときの骨髄の造血幹・前駆細胞分画をフローサイトメトリーで解析すると、骨髄球系の前駆細胞のうち、骨髄球系共通前駆細胞(CMP, $CD34^+$ $CD16/32^-$ Lin^- $Sca\text{-}1^-$ $c\text{-}Kit^+$）と巨核球・赤芽球前駆細胞(MEP, $CD34^-$ $CD16/32^-$ Lin^- $Sca\text{-}1^-$ $c\text{-}Kit^+$）の比率がコントロールと比較してプリスタン投与群（Pri）で有意に低下する一方、顆粒球・マクロファージ前駆細胞（GMP, $CD34^+$ $CD16/32^+$ Lin^- $Sca\text{-}1^-$ $c\text{-}Kit^+$）の比率が有意に上昇していた（図 2）。

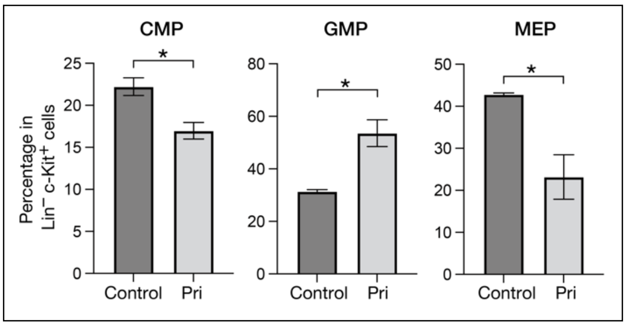

図 2. Pristane 投与後 4 週での骨髄球系前駆細胞比率
CMP, common myeloid progenitor; GMP, granulocyte-macrophage progenitor; MEP, megakaryocyte-erythroid progenitor. *p<0.05

このことから、PriHx モデルマウスでは成熟した免疫細胞のみならず、前駆細胞レベルから造血系の変化が生じていることが明らかとなった。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Ishibashi T, Masaki T, Inagaki T, Chikaishi-Kirino T, Okazawa M, Nakaoka Y
２．発表標題 The role of gp130-mediated IL-6 signaling in the CD4+ lymphocytes for the pathogenesis of 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 (BCVR)
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
石橋　知彦	(Ishibashi Tomohiko)