

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08070

研究課題名(和文) 肺高血圧症におけるgp130依存性サイトカインシグナルの役割の解明

研究課題名(英文) Role of gp130-dependent cytokine signaling in pulmonary hypertension

研究代表者

石橋 知彦 (Ishibashi, Tomohiko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：30722285

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)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、肺小動脈の狭窄や閉塞を特徴とし、肺動脈圧の上昇や右心不全を引き起こす。PAHの病態におけるインターロイキン(IL)-6の標的細胞については不明のままであった。我々はIL-6受容体のサブユニットであるgp130のfloxedマウスを用いて、CD4陽性細胞特異的なgp130欠失は肺高血圧症病態を有意に改善させ、肺のCD4陽性T細胞におけるSTAT3のリン酸化を抑制し、低酸素が誘発するTh17細胞の増加を抑制することを明らかにした。以上の結果はCD4陽性細胞におけるIL-6/gp130シグナル伝達がPAHの病態形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症は、治療薬の開発が進み治療法が進歩しつつある疾患であるが、薬剤反応性が低い患者においては未だに予後不良の疾患である。本研究では免疫細胞のCD4陽性T細胞における炎症性サイトカインのIL-6シグナルが肺高血圧症の病態形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究から、免疫細胞における炎症シグナルを抑制することで、炎症に着目した新たな治療法の確立といった肺高血圧症における創薬の可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by stenosis and occlusions of small pulmonary arteries, leading to elevated pulmonary arterial pressure and right heart failure. Although accumulating evidence shows the importance of interleukin (IL)-6 in the pathogenesis of PAH, the target cells of IL-6 are poorly understood. Using mice harboring the floxed allele of gp130, a subunit of the IL-6 receptor, we revealed that a CD4+ T cell-specific gp130 deletion ameliorated the phenotype of hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. Disruption of IL-6 signaling via deletion of gp130 in CD4+ T cells inhibited phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and suppressed the hypoxia-induced increase in T helper 17 cells. These findings suggest that IL-6/gp130 signaling in CD4+ T cells plays a critical role in the pathogenesis of PAH.

研究分野：循環器内科学、血管生物学、血液内科学

キーワード：肺高血圧症 interleukin-6 CD4陽性細胞 肺血管リモデリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension; PAH) は、遠位の肺動脈に原因不明の狭窄・閉塞病変を生じ、肺動脈圧の上昇から心不全に至る疾患であり、厚生労働省の指定難病とされている。現在使用可能な薬剤はいずれも肺動脈平滑筋細胞の弛緩を促進する血管拡張薬であり、新薬の登場によって予後改善がみられつつあるものの、進行した PAH の予後はいまだ不良である。さらなる予後の改善のためには新たな作用機序の治療法の開発が望まれており、そのためにも PAH の分子病態解明が必要である。我々は PAH の病態において炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6)/IL-21 シグナルが重要であることを報告した (Hashimoto-Kataoka T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112: E2677)。しかし、IL-6 がどの細胞に作用することが PAH の病態形成の鍵となるかは不明であった。肺高血圧症の病態形成における IL-6 シグナルの標的細胞に関する研究は、国内外から報告されているが、その結果は一定していない。IL-6 受容体を構成する IL-6R α を平滑筋細胞特異的に欠損させて低酸素誘発性肺高血圧症 (HPH) モデルを作製し、その意義を検討した論文が 2 本報告されているが、その結果は相反するものである。平滑筋細胞特異的 Cre マウスとして SM22 α -Cre を用いた報告では、平滑筋細胞特異的 IL-6R α 欠損によって肺高血圧症病態が改善した報告しているのに対して (Tamura Y, et al. J Clin Invest. 2018;128:1956)、SMMHC-CreERT2 マウスを用いた報告では逆に病態が増悪したと報告されている (Mickael C, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2019;61:123)。これに対し、我々はどの組織/細胞での IL-6 シグナルを受容することが PAH の病態形成に関与するかを明らかにするため、肺動脈を構成する血管内皮細胞や血管平滑筋細胞で IL-6 受容体を構成する受容体コンポーネントの 1 つである gp130 を欠損させたマウスを作製して、HPH 病態を検討した。その結果、gp130 を血管内皮細胞で欠損するマウスでは有意な変化はみられないが、平滑筋細胞特異的に遺伝子組み換えを誘導することが知られる Cre マウスの SMMHC-CreERT2 と SM22 α -Cre を用いて gp130 を欠損させたマウスでは既報と同様に相反する結果となり、SM22 α -Cre を用いて gp130 を欠損させたマウスでのみ HPH 病態が有意に抑制されることを確認した。この違いが Cre マウスの特異性に起因するのではないかと考え、SM22 α -Cre が遺伝子組み換えを誘導する細胞系列を明らかにするため、レポーターマウスを作製して解析すると、血管平滑筋だけでなく、造血幹細胞を含む血球細胞でも Cre 依存性の遺伝子組み換えが生じていることが明らかになった (科学研究費補助金・若手研究 2019~2020 年度)。さらに、既存のデータベースから、gp130 は T 細胞に多く発現することを見出したことから、SM22 α -Cre マウスを用いた場合にみられた肺高血圧症病態の抑制は T 細胞での IL-6 シグナルの欠損が関与していることが示唆された。CD4 陽性 T 細胞の IL-6 シグナルは、Th17 細胞や濾胞性 T 細胞などへの分化と関連しており、このシグナルが阻害されることで広範な免疫細胞に影響が及んでいることが推測される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫細胞が PAH の病態形成に果たす役割を明らかにすることであり、特に炎症性サイトカインの IL-6 の受容体である gp130 を介したシグナルの意義について、CD4 陽性 T 細胞に注目して明らかにすることである。

3. 研究の方法

CD4 特異的な IL-6 シグナル欠損マウスにおける肺高血圧症モデルの解析

gp130^{flox} マウスと CD4-Cre マウスを交配し、gp130^{f/f}; CD4-Cre マウスを作成した。作成した gp130^{f/f} マウスおよび gp130^{f/f}; CD4-Cre マウスに対し、HPH モデルによる肺高血圧症病態の比較検討を行った。HPH モデルは、それぞれのマウスに対して 4 週間の低酸素 (10%O₂) 負荷をおこなうことにより肺高血圧症を誘発した。

HPH モデル作成後にイソフルラン麻酔下での心臓カテーテル検査により、体血圧、右心室圧および心拍数をモニターし、右心室収縮期圧 (RVSP) を測定した。カテーテル検査後に肺を生理食塩水により脱血し、4%パラホルムアルデヒドの気管内投与による伸展固定を行った。心臓は右心室と左心室及び中隔に切除して秤量した。固定した肺のパラフィン切片 (4 μ m) を作成して Elastica van Gieson (EVG) 染色を施し、画像解析により血管中膜肥厚度を定量した。

肺高血圧症モデルにおける免疫細胞の解析

gp130^{f/f} マウスおよび gp130^{f/f}; CD4-Cre マウスに対し、HPH モデルを適用し、低酸素負荷 3 日後、5 日後、および 21 日後の肺や脾臓を採取し、フローサイトメトリーによる免疫細胞の解析を行った。マウスの肺組織を 1 mm 程度に細切り、37 $^{\circ}$ C でコラゲナーゼ (1 mg/mL, Wako)、Dispase (0.5 mg/mL, Roche) 及び DNase1 (0.02 mg/mL, Roche) を含む DMEM 培地 (ナカライテスク) に 30 分間インキュベートした。次いで、得られた組織懸濁液に対して gentleMACS (Miltenyi) により細胞分散処理を行い、70 μ m メッシュを通して、ペレットを PBS-F (2%ウシ胎児血清 (FBS) を含む PBS) で再懸濁して、PBS-F で洗浄した。マウスの脾臓は 70 μ m メッシュに通して、ペレットを PBS-F で再懸濁して、PBS-F で洗浄した。細胞は、Fc γ レセプターをブロックするために CD16/32 (clone 93, BioLegend) でプレインキュベートした後に、表面抗原抗体を用いて 30 分間氷上で染色した。CD4 陽性 T 細胞におけるリン酸化 STAT3

の染色は、細胞を表面抗原で染色した後に 4%パラホルムアルデヒドによる固定、およびメタノールによる透過処理の後に行った。細胞内のサイトカイン染色の際には、細胞を Phorbol myristate acetate (0.5µg/mL, Sigma-Aldrich)、ionomycin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich)、及び brefeldin A (20µg/mL, Sigma-Aldrich)を含む IMDM 培地(ナカライテスク)で 37 °C で 4 時間培養した後に、CD4 の表面染色を行い、細胞を Fixation Buffer(Biolegend)により固定して Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer(Biolegend)で膜透過化した。洗浄後に細胞を抗体により 30 分間氷上で染色した。上記処理後の細胞をフローサイトメーターで測定して、FlowJo ソフトウェア(BD Biosciences)で解析を行った。

肺高血圧症病態形成に關与する IL-6 ファミリーサイトカインシグナルの同定
gp130 は、IL-6 のみならず、白血病阻止因子 (LIF) や、IL-27 など、IL-6 ファミリーサイトカインで共通して用いられている分子である。このため、gp130 を欠損させることによる肺高血圧症の病態改善は、IL-6 以外のサイトカインシグナル阻害に起因する可能性もある。いずれの IL-6 ファミリーサイトカインが肺高血圧症の病態に重要であるのかを調べるため、8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対し低酸素負荷を行い、低酸素負荷の 6 時間後および 48 時間後にマウスを安楽死させ、肺を摘出して RNA 抽出を行い、IL-6 ファミリーサイトカインの mRNA 発現を qPCR により定量した。

4. 研究成果

CD4 特異的な IL-6 シグナル欠損マウスにおける肺高血圧症モデルの解析

初めに、HPH モデルの作成と肺高血圧病態の解析を血行動態および肺・心臓における組織化学的解析により行った。その結果、対照群の gp130^{f/f} マウスと比較して gp130^{f/f}; CD4-Cre マウスでは右心室収縮期圧の有意な低下がみとめられ、右心肥大の抑制傾向および肺血管リモデリングの抑制がみとめられるといった、我々の先行研究の再現性が確認されたことから、CD4 陽性 T 細胞の gp130 シグナルを欠損させると肺高血圧症病態が改善することを明らかにした(図 1)。

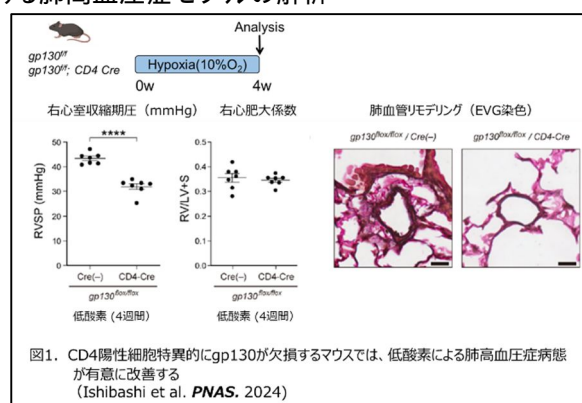


図1. CD4陽性細胞特異的にgp130が欠損するマウスでは、低酸素による肺高血圧症病態が有意に改善する (Ishibashi et al. *PNAS*. 2024)

肺高血圧症モデルにおける免疫細胞の解析
次に、HPH モデルの CD4 陽性 T 細胞における gp130 の欠損が、下流のシグナル伝達にどのような変化を引き起こすかを調べた。STAT3 は gp130 の下流に位置し、IL-6 が受容体に結合すると、JAK-STAT 経路が活性化され、STAT3 がリン酸化される。HPH モデルの肺において CD4 陽性 T 細胞が IL-6 シグナルを受容しているかを明らかにするために、肺における CD4 陽性 T 細胞におけるリン酸化 STAT3 発現の解析をフローサイトメトリーにより行った。我々の先行研究において、低酸素負荷の 2 日後では肺で IL-6 mRNA が上昇のピークを迎え、その後ベースラインまで低下することが確認されていることから、低酸素負荷の 3 日後の肺で解析を行った。その結果、正酸素下で飼育した対照群と比較して、低酸素負荷 3 日後の肺における CD4 およびリン酸化 STAT3 の共陽性細胞が有意に増加するが、gp130^{f/f}; CD4-Cre マウスの肺における CD4 陽性 T 細胞では、その増加が有意に抑制され、正酸素の対照群と同程度となることがみとめられた(図 2)。興味深いことに、低酸素により肺で生じる CD4 陽性 T 細胞における STAT3 のリン酸化は、脾臓の CD4 陽性 T 細胞では認められないことが明らかとなった。以上のことから、低酸素による肺高血圧症病態の形成には、肺で局所的に産生される gp130 リガンドが重要であることが示唆された。

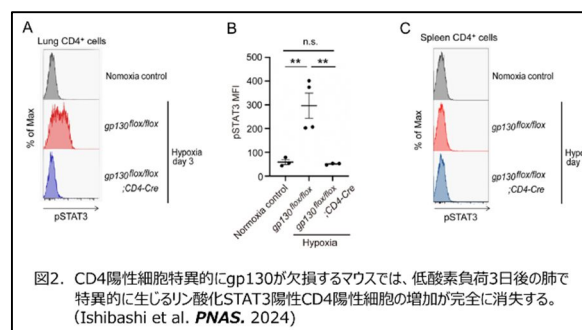


図2. CD4陽性細胞特異的にgp130が欠損するマウスでは、低酸素負荷3日後の肺で特異的に生じるリン酸化STAT3陽性CD4陽性細胞の増加が完全に消失する。(Ishibashi et al. *PNAS*. 2024)

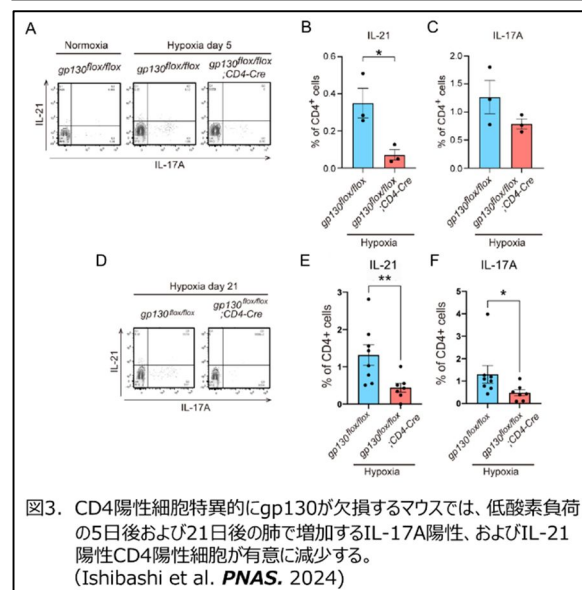


図3. CD4陽性細胞特異的にgp130が欠損するマウスでは、低酸素負荷の5日後および21日後の肺で増加するIL-17A陽性、およびIL-21陽性CD4陽性細胞が有意に減少する。(Ishibashi et al. *PNAS*. 2024)

CD4 陽性 T 細胞の IL-6 シグナルは、Th17 細胞や濾胞性 T 細胞などへの分化と関連することが報告されている。そこで、低酸素負荷により IL-6 シグナル依存的に Th17 細胞が肺で増加しているかについての検討を行った。以前の報告と一致するように、gp130^{f/f} マウスの肺では低酸素負荷 5 日後に IL17A 陽性、IL-21 陽性の CD4 陽性 T 細胞が増加することがみとめられたが (Hashimoto- Kataoka T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112: E2677)、gp130^{f/f}; CD4-Cre マウスの肺では、IL-21 陽性の CD4 陽性 T 細胞が有意に減少し、IL-17A 陽性の CD4 陽性 T 細胞も減少する傾向がみとめられた (図 3)。また、低酸素の慢性期においても、Th17 細胞と IL-21 産生 T 細胞の増加は、CD4 陽性 T 細胞における gp130 の欠損によって有意に抑制された (図 3)。

肺高血圧症病態形成に關与する IL-6 ファミリーサイトカインシグナルの同定

gp130 は IL-6 ファミリーサイトカインに共通するサブユニットであることから、低酸素曝露急性期の肺における IL-6 ファミリーサイトカインの mRNA 発現を調べた。IL-6 以外のファミリーサイトカインの発現は、低酸素曝露後ほとんど増加しなかった (図 4)。これらの結果から、IL-6 が低酸素曝露時の CD4 陽性 T 細胞における gp130 シグナル伝達を担うサイトカインであることが示唆された。

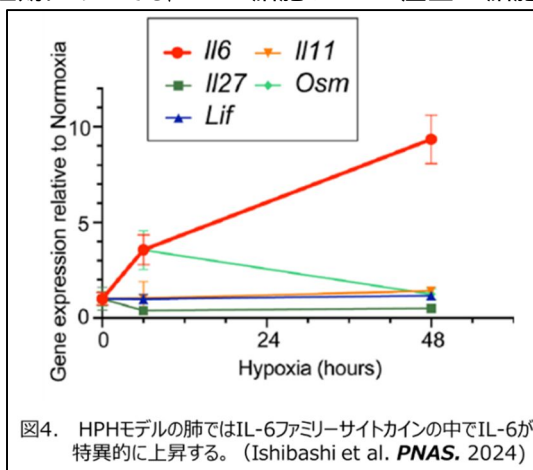


図4. HPHモデルの肺ではIL-6ファミリーサイトカインの中でIL-6が特異的に上昇する。(Ishibashi et al. *PNAS*. 2024)

以上の結果より、低酸素による肺高血圧症の病態形成において CD4 陽性 T 細胞における IL-6 シグナルが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。CD4 陽性 T 細胞における gp130 の欠損は、低酸素により生じる肺の CD4 陽性 T 細胞における STAT3 のリン酸化を抑制し、低酸素により増加する肺の Th17 細胞を減少することにより、肺高血圧症の表現型の改善に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yusuke Manabe*, Tomohiko Ishibashi* (*co-first author), et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 Gut dysbiosis is associated with aortic aneurysm formation and progression in Takayasu arteritis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-023-03031-9	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 -

1. 著者名 Ishibashi Tomohiko, Inagaki Tadakatsu, Okazawa Makoto, Yamagishi Akiko, Ohta-Ogo Keiko, Asano Ryotaro, Masaki Takeshi, Kotani Yui, Ding Xin, Chikaishi-Kirino Tomomi, Maedera Noriko, Shirai Manabu, Hatakeyama Kinta, Kubota Yoshiaki, Kishimoto Tadimitsu, Nakaoka Yoshikazu	4. 巻 121
2. 論文標題 IL-6/gp130 signaling in CD4+ T cells drives the pathogenesis of pulmonary hypertension	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2315123121	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomohiko Ishibashi, Yoshikazu Nakaoka
2. 発表標題 IL-6 signaling in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 CVMW2022
4. 発表年 2022年

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

1. 発表者名 Inagaki T, Asano R, Mitsui M, Ishibashi T, Okazawa M, Ogo T, Nakaoka Y
2. 発表標題 Anti-interleukin-21 aptamer treatment improves pathology in a rodent models of pulmonary 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

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 (CVMW2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣 薫克, 石橋 知彦, 岡澤 慎, 正木 豪, 真鍋 侑資, 浅野 遼太郎, 中岡 良和
2. 発表標題 肺高血圧症における IL-6 の重要性: 遺伝子改変ラットを用いた検討
3. 学会等名 第29回 日本血管生物医学会学術集会 (CVMW2021)
4. 発表年 2021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
研究 分担者	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・研究所・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
---------	---------