

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16110

研究課題名（和文）新規三次元イメージングシステムを用いた遺伝性肺動脈性肺高血圧症の病態解明

研究課題名（英文）Investigation of pathophysiology of hereditary pulmonary hypertension using novel 3D imaging system

研究代表者

藤原 隆行 (Fujiwara, Takayuki)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40836441

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：BMP2ミスセンス変異(p.Tyr247X)の導入および肺内皮細胞Pgc1 特異的ノックアウトにより、新規肺高血圧症モデルマウスの作成に成功した。このマウスを三次元可視化システムにより解析したところ、plexiform lesionと思われる病変の三次元可視化に成功した。またシングルセルRNA解析を施行したところ、内皮細胞において特異的なクラスターを複数認め、その一部ではDNA損傷に応答する因子の発現が上昇しており、病態の背景にはDNA損傷が関与してい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

ヒト肺動脈性肺高血圧症の遺伝子異常を背景とする生理的な肺高血圧症モデルマウスの作成に成功した。これにより、過去の人為的な肺高血圧症モデルマウスでは十分に知りえなかった病態生理についての検討が可能となると考えられる。またこのマウスを三次元可視化することにより、過去には報告のないplexiform lesionの可視化に成功することができた。さらにはこのマウスのシングルセルRNA解析により、異常な内皮細胞亜集団を特定・発現変動遺伝子を解析することにより、新規治療ターゲットの探索につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A novel mouse model of pulmonary hypertension was successfully created by introducing a BMP2 missense mutation (p.Tyr247X) and knocking out the pulmonary endothelial cell Pgc1 . When this mouse was analyzed by a three-dimensional visualization system, we succeeded in three-dimensional visualization of plexiform lesions. In addition, single-cell RNA analysis revealed multiple specific clusters in endothelial cells, some of which showed increased expression of factors that respond to DNA damage, suggesting that DNA damage is involved in the background of the pathology.

研究分野：循環器内科

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 三次元可視化 シングルセルRNA解析

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における死因第2位で、全死亡の15.3%を占める心血管疾患は、多くの薬物治療およびデバイス治療開発などによりその予後は大きく改善し、またその背景にある生活習慣病のコントロールにより発症予防も進められてきた。しかしながら一部の心血管疾患ではそのメカニズムが解明されておらず、依然として予後不良なものも存在する。その一つに難治性疾患である肺動脈性肺高血圧症(PAH)が挙げられる。PAHでは肺動脈中膜肥厚、内膜の同心円状線維化などの肺動脈リモデリングの結果として、肺動脈圧・肺血管抵抗の上昇とともに呼吸・循環不全(右心不全)が進行し、従来、診断からの平均生存期間は2.8年と非常に予後不良であった(推定患者数:約3,000人)。近年の診断や治療方法の進歩により生命予後は著明に改善した一方で、現在の血管拡張薬の多剤併用療法を用いても治療抵抗性を示す患者は多数存在し、肺移植待機中に右心不全や多臓器不全などで亡くなる患者が後を絶たない。

PAHなどの肺高血圧症(PH)の病態解明は、長らく剖検例や肺移植時の病理学的検討に基づいて行われてきたが、病状末期の肺組織を用いた検討では、発症や進展課程に関わる因子・病態の解析は難しい。また、従来のPH動物モデルについてはモノクロタリン(毒性物質)投与、低酸素負荷、低酸素負荷+血管内皮増殖因子(VEGF)受容体阻害薬(Sugen)投与などで人為的にPHを誘発したモデルが多く、これらを用いた病態解析や前臨床試験が本症の発症・進展機序や治療反応性を正確に反映するのかという判断すら難しい。そのため、より生理的な、ヒト肺動脈性肺高血圧症を反映する動物モデルに対する需要は昨今高まっている。

ヒトPAHの原因遺伝子として、TGF-スーパーファミリーの受容体をコードするBMP2, ALK1, ENGなどが報告されており、我々の施設でもPAH患者診療において遺伝子検査を広く行い、新規変異の報告を行ってきた。これらの遺伝子群はPAHにおける血管リモデリングの制御の中心を担っていると考えられるが、これらのヒト遺伝子変異を反映した動物モデルは乏しいことに加え、従来の二次元病理組織的解析では、血管リモデリングの評価は血管内腔側への狭窄像の評価にとどまり、複雑な血管構造の変化に関する評価は困難であった。これらの障壁によって、PAHにおける血管リモデリングの分子機構や進展過程は不明のままであり、その中心に位置するVEGFシグナルの動態・役割ですら十分に理解されていない。

現在臨床応用されているPAH治療薬の多くは、従来の知見である血管狭窄の解除を目的とした血管拡張薬であり、PAH治療戦略の視点からはより多くの機序解明・またその治療応用が望ましく、新規治療につながる病態の解明が期待されている。その実現のため、血管リモデリングに対する新規評価体系の確立、ヒトPAHを十分に反映する動物モデルの確立、ならびに実際のヒトPAHにおける病態仮説の検証が、PAH基礎研究における重要課題といえる。

## 2. 研究の目的

PAH患者の肺組織やPHモデルマウスの肺組織においてVEGFの発現が上昇していることは知られているが、従来VEGFの上昇は血管構成細胞の異常増殖に関与すると考えられており、VEGFの発現制御の一端を担う上流転写因子・低酸素誘導因子(HIF)の欠損によりPHは改善することが知られている。しかしながら本来はPHを改善すると予測されたVEGF受容体阻害薬の投与によってPHが増悪するなど、PHにおけるVEGFの役割に関する知見は混沌としている。これらの病態解明が進んでいない理由として、従来の組織学的評価は二次元に留まり、三次元構造を呈する複雑な血管リモデリングの評価が困難であったことが挙げられる。

申請者が所属する研究室では、世界に先駆けて多光子励起レーザー顕微鏡を用いたin vivo生体イメージングシステムを確立し、組織浅層の慢性炎症や、比較的大きな血管の構造や機能変化の瞬間を三次元で捉えるなどして病態解明に努めてきたが、心血管病での観察深達度は表層から数十 $\mu\text{m}$ 程度が限界であった。一方で、近年の組織透明化技術の目覚ましい発展により、高い透明度を得やすい脳組織などでは、低解像度であればその観察深度は数mmにまで拡大してきている。申請者は、我々の最先端の顕微鏡技術と組織透明化技術CUBICを複合し改変することで、心血管疾患の臓器深部までの複雑な構造・機能の変化を三次元的に解析できるのではないかと考えた。

これまでの検討で、申請者は世界に先駆けて、マウス肺葉全体での微小構造や機能の変化の一部を三次元的に一細胞解像度で描出することに成功しており、病理切片像(二次元)では評価困難であった血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、炎症細胞、線維化などの微小構造変化を肺葉全体の三次元画像として描出可能とした。

さらに、予備的検討として従来のPHモデルをこの新規三次元イメージングシステムを用いて観察したところ、従来のPHモデルマウスにおいて、過去に報告のない病態初期に特

徴的な「微小血管リモデリング」現象を見出し(図 2)、新規手法による新たな病態解明の可能性が示唆された。モデル間で「微小血管リモデリング」の様相が大きく異なることも判明しており、本手法を用いて、ヒト原因遺伝子変異を反映した PH モデルマウスの全肺での血管リモデリングの空間分布と時系列的变化を詳細に解析することなどによって、血管内皮増殖因子(VEGF)シグナルの役割を解明し、新たな PH 病態概念も確立し、分子メカニズムに沿った治療・予防戦略の開発に資するシーズを獲得することができるのではないかと考える。

### 3. 研究の方法

本課題では、PH の基礎研究における課題点である、(1)従来の 2 次元病理組織学的評価では、PH の病態解明の推進に必要な、生体での活動期(進展期)の血管構造・機能の評価が困難である点、(2)ヒト遺伝子変異を反映しない人為的 PH 誘導モデルが多く、さらに PH 動物モデル間の相違も大きく、これらを用いた二次元的病理切片的解析やシグナル解析が本症の発症・進展機序や治療反応性を正しく反映するののかという判断すら極めて困難である点、(3)実際のヒト組織を用いた病態仮説の検証が困難である点、を解決すべく、イメージングシステムを中心とした新規評価手法の確立、ならびに新規 PAH 動物モデルの確立を行って病態解明および創薬にも応用・展開する。

課題点(1)については、申請者が開発・改良中の三次元的可視化システムによる PAH の評価手法を最適化し、肺や右心室の血管リモデリング様式やその病期・活動性を反映する指標を解析・探索し、時空間的变化や治療介入の可能性について検証する。また課題点(2)については、従来の PH モデル(上記①～③の人為的モデル)の評価にくわえて、浸透率の極めて高い家族性 PAH 家系の BMPR2 ミスセンス変異(p. Tyr247X)を導入した新規 PAH モデルマウス(Bmpr2-K1)を CRISPR-Cas9 システムを用いて作成(F0 作出済)し、その相違点を含めた検証も行う。

申請者はすでに、低酸素誘発性 PH モデルマウスを用いた予備的検討により、これまでに報告のない、二次元病理切片では描出しえない病態初期に特徴的な「微小血管リモデリング」現象を見出しており(図 2)、VEGF シグナルの意義の解明につながるキー現象と推測している。またこの現象の背景には、HIF とは独立した血管新生シグナル調節因子であり、肺血管のミトコンドリア機能の維持に必須である転写因子 PGC-1 が、この現象および VEGF paradox の解明にも重要な役割を担う可能性を疑っている(図 2)。肺内皮細胞特異的 Pgc1 ノックアウトマウスでは、低酸素環境下で VEGF 発現ならびに血管新生がともに抑制されて PH が増悪するという現象を見出しており(未発表)、PGC-1 が PH に病態初期の代償的な VEGF 発現調整に関与することを示唆するが、新規 PAH モデルマウス(Bmpr2-K1)においても確認されるか、さらなる検討を推進していく。

さらに、多くの PAH 患者診療を行い、肺移植実施施設である当施設の特徴を生かし、肺移植時のヒト PAH 患者(レシピエント)の生体試料(肺移植時に採取、肺・血液等)を用いて、PAH マウスとの類似点・相違点も検証し(課題点(3)の解決)、将来的にヒト試料(生検)を用いた病期(活動性)の推定や治療方法の選択に役立つシーズの開発を目指す。

### 4. 研究成果

申請者が開発した三次元可視化システムを用いて、低酸素誘導性肺高血圧症(PH)マウスモデルにおける、特徴的な血管新生像を捉えることに成功した

(Fujiwara et al. *Circulation*, 2021)。この血管新生反応は VEGF 阻害薬によって消失し、PH が増悪することから、低酸素負荷に対する代償的な反応と考えられた。この代償的血管新生の背景には肺内皮 PGC-1 が大きく関与しており、新規治療標的として期待される結果が得られた。

この現象をより生理的な PH モデルで検証すべく、浸透率の極めて高い家族性 PAH 家系の BMPR2 ミスセンス変異(p. Tyr247X)を導入した新規 PAH モデルマウス(Bmpr2-K1)の解析を行った。Bmpr2-K1 マウスは有意な圧の上昇は示さず、臨床的観点からは PH には至っていなかったが、病理学的評価では PH に特徴的な肺動脈中膜の増生を認め、PH の前病変の可能性が考えられた。そこで我々は既に低酸素誘導性 PH で代償に必要と判明した Pgc1 を、Bmpr2-K1 マウスの内皮で特異的にノックアウトさせる試みを行った。すると通常大気下で右室圧は有意に上昇し、肺動脈平滑筋のみならず内皮細胞も異常増殖を呈し、最重症病変であり plexiform lesion 様

の変化も見られた。このマウスを三次元可視化システムにより解析したところ、plexiform lesion と思われる病変の三次元可視化に成功した。またシングルセル RNA 解析を施行したところ、内皮細胞において特異的なクラスターを複数認め、その一部では DNA 損傷に応答する因子の発現が上昇しており、病態の背景には DNA 損傷が関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0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 Fujiwara Takayuki	4. 巻 144
2. 論文標題 Three-Dimensional Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056219	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 -
1. 著者名 Suzuki Takaaki, Hirose Kimihiko, Tabei Fumiko, Sugishita Yasuyuki, Oka Teruaki, Ishii Satoshi, Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi, Komuro Issei, Itoh Nobuhiko	4. 巻 62
2. 論文標題 An Autopsy Case of Pulmonary Veno-Occlusive Disease Complicated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Severe Pulmonary Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 1186 ~ 1190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.21-133	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 -
1. 著者名 Hatano Masaru, Jimba Takahiro, Fujiwara Takayuki, Tsuji Masaki, Bujo Chie, Ishida Junichi, Amiya Eisuke, Kinoshita Osamu, Ono Minoru	4. 巻 21
2. 論文標題 Late-onset right ventricular failure after continuous-flow left ventricular assist device implantation: case presentation and review of the literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 364-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2021.12.009	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 -
1. 著者名 Nakayama Atsuko, Kodera Satoshi, Morita Hiroyuki, Fujiwara Takayuki, Takeda Norifumi, Komuro Issei	4. 巻 63
2. 論文標題 Cost-Effectiveness of Management for Hospitalized Patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 264 ~ 270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.21-451	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takayuki Fujiwara
2. 発表標題 PGC-1a mediated angiogenesis ameliorates pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayuki Fujiwara
2. 発表標題 PGC-1a mediated angiogenesis ameliorates pulmonary hypertension in mice
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 隆行
2. 発表標題 新たな三次元病理病態解析が解き明かす肺高血圧症における微小血管リモデリングの意義とその治療応用
3. 学会等名 第50回日本心脈管作動物質学会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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