

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790942

研究課題名(和文) 膠原病合併肺動脈性肺高血圧症における血管内皮前駆細胞の役割の解明

研究課題名(英文) A role of endothelial precursor cells in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease

研究代表者

白井 悠一郎 (SHIRAI YUICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：70528801

研究成果の概要(和文):

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、肺血管壁が厚くなり、血管内が狭くなる病態である。膠原病における生命予後不良の病態だが、未だ原因不明である。そこで、血液中の単球に着目し、その関与を追究した。強皮症 PAH 例と非 PAH 例の血液から単球を分離し、PCR アレイ法による網羅的な遺伝子解析を行った。その結果、PAH 症例では4遺伝子(*CCL5*, *CCR6*, *LTBP1*, *OCLN*)の発現上昇が認められた。これらは病変部への細胞遊走、接着、線維化に関わるため、膠原病患者における肺動脈病変の治療標的になると考えられた。

研究成果の概要(英文):

Pulmonary arterial hypertension is characterized by occlusion of pulmonary artery. It is an intractable condition with poor prognosis in connective tissue diseases (CTDs), but the pathogenesis remains unknown. We have investigated the role of circulating monocytes. We collected monocytes samples from scleroderma patients. Subsequently we conducted gene expression analysis by PCR array method and compared the gene expression level between patients with PAH and without PAH. The expression of *CCL5*, *CCR6*, *LTBP1*, and *OCLN* proved to be elevated higher in patients with PAH. Since they are involved in cell recruitment, adhesion, and fibrosis, they were considered to be a therapeutic target in PAH with CTDs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学、肺高血圧症

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)はMCTD、全身性強皮症(SSc)を含む膠原病患者において生命予後を悪化させる難治性病態の一つである。病態の基本は肺動脈の内腔狭窄で、血管平

滑筋および内皮細胞の増殖と線維化からなるリモデリングによって形成される。肺動脈における収縮因子(Endothelin-1)・拡張因子(NO, prostacyclin)が明らかになり、これらを標的にした新規治療薬が開発され、生存期間の延長が

報告されている。しかし、進行を抑制できない症例も存在し、生命予後は依然として不良である。従って、根治的治療の開発が望まれており、そのためには新たなアプローチからの病態の追究が必要と考えられる。

MCTD や SSc では末梢動脈をはじめ全身の血管に内腔狭窄病変を高率に生じる。近年、循環血液中の CD14+単球が局所にリクルートされ、血管新生や線維化病態に関わることを示す知見が集積されている (Seta N, et al. *Exp Hematol* 2010)。PAH における肺動脈の内腔狭窄病変も末梢動脈病変と病理像が類似していることから、病態への末梢血単球の関与が示唆される。

2. 研究の目的

PAH を有する症例の末梢血単球における遺伝子発現を網羅的に検討することで、PAH 病態における末梢血単球の役割を追究することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象

米国リウマチ学会の分類予備基準 (1980 年) を満たす SSc 患者 31 例、厚生労働省研究班の診断基準 (2004 年) を満たす MCTD 患者 9 例を対象とした。右心カテーテル検査で平均肺動脈圧 25mmHg かつ肺動脈楔入圧 12mmHg、肺疾患・慢性血栓塞栓症・先天性心疾患・左心疾患の除外により PAH と診断した。

アレイによる遺伝子発現解析には PAH を有する SSc3 例と PAH のない SSc3 例を用いた。これら症例は背景因子が一致するように選択し、全例が女性、高齢者 (59 歳以上)、limited cutaneous SSc、間質性肺疾患がなく、Beraprost を服用中であった。採血時期は 10 月～11 月とした。

(2) 患者末梢血単球の遺伝子発現の網羅的解

析

患者末梢血 20ml から分離した末梢血単核球 (PBMC) より、CD14+単球を磁気細胞分離法 (Magnetic cell sorting; MACS system, Miltenyi Biotec) を用いて分取した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。3 例の total RNA をプールし、PCR アレイ (SABiosciences) を用いて遺伝子発現を PAH と非 PAH の 2 群間で比較した。各アレイは、ケモカイン、細胞外マトリックス、TGF- β /BMP シグナル、血管内皮に関連する 84 遺伝子の解析が可能で、重複遺伝子を除き、計 318 遺伝子の解析を行った。

遺伝子発現量は一定の DNA 量まで増幅するのに必要な PCR サイクル数 (Ct 値) として得られた。特定の遺伝子について発現差を比較するには、まずその遺伝子発現に要した Ct 値から *GAPDH* の Ct 値を引いた Ct 値を PAH、非 PAH の各群で求めた。両群間の Ct 値の差から、非 PAH に対する PAH における発現量を fold change として求めた。fold change が 6 倍以上または 1/6 倍以下、少なくとも 1 群の Ct 値が信頼できる定量範囲内 (35 以下)、の両者を満たす遺伝子を 2 群間で発現差のある遺伝子として抽出した。

(3) 候補遺伝子の RT-PCR 条件設定

抽出された候補遺伝子のプライマーを作成し、健常人 CD14+細胞の由来 cDNA を用いて、RT-PCR の条件設定を行った。発現量の定量的な比較検討に耐えられるよう、40 サイクル以下で PCR 産物のバンドが確認できるものとした。PCR は 95℃ 4 分間の後、95℃ 30 秒、設定アニーリング温度 30 秒、72℃ 30 秒を設定サイクル数で繰り返し、72℃ で 7 分間反応後に 4℃ に保存した。PCR 産物は、1.5% アガロースゲルで電気泳動し、ChemiDoc VES; UV transilluminator (BIO-RAD) で検出した。

4. 研究成果

(1) 患者末梢血単球の遺伝子発現の網羅的解析

PCR アレイで PAH 群と非 PAH 群の遺伝子発現差を fold change として求めた。318 個の遺伝子発現比(fold change)は 0.1-101.1 (平均 1.2 ± 5.5)の範囲に分布し、両者における発現は正の相関を示した。このうち、fold change が 6 倍以上または 1/6 倍以下の遺伝子として 12 遺伝子が抽出された(表 1)。

PAH 群で発現亢進と判定された 4 遺伝子には、ケモカインとその受容体 (*CCL5*, *CCR6*)、TGF シグナル分子 (*LTBP1*)、血管内皮接着分子 (*OCLN*) が含まれていた。一方、発現低下と判定された 8 遺伝子には、ケモカインとその受容体 (*GPR31*)、細胞外マトリックス構成・分解分子 (*ADAMTS1*, *ITGA8*, *LAMA3*, *MMP15*)、TGF シグナル分子 (*TGFB2*)、血管新生関連分子 (*CPB2*, *PGF*) が含まれていた。

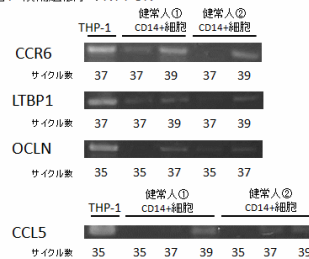
表1 PCRアレイで抽出された12遺伝子

遺伝子	Tested sample Ct	Control sample Ct	Fold change
<i>OCLN</i>	7.61	14.27	101.13
<i>CCL5</i>	7.91	11.02	8.63
<i>CCR6</i>	11.33	14.31	7.90
<i>LTBP1</i>	10.92	13.62	6.53
<i>LAMA3</i>	15.92	13.18	0.15
<i>MMP15</i>	11.03	13.18	0.15
<i>PGF</i>	15.32	12.38	0.13
<i>CPB2</i>	14.60	11.48	0.12
<i>ITGA8</i>	13.10	9.92	0.11
<i>TGFB2</i>	15.28	12.07	0.11
<i>GPR31</i>	15.67	12.34	0.10
<i>ADAMTS1</i>	12.11	8.83	0.10

(2) 候補遺伝子の RT-PCR 条件設定

抽出された候補遺伝子の RT-PCR の条件設定を行い、40 サイクル以下で PCR 産物のバンドが確認できるものとして、*CCL5*, *CCR6*, *LTBP1*, *OCLN* の 4 遺伝子が抽出された。*CCL5*・*CCR6*・*LTBP1* は、アニーリング温度 62 °C、39 サイクル、*OCLN* はアニーリング温度 56 °C、37 サイクルの条件下でバンドが確認できた(図 1)。

図1 候補遺伝子のRT-PCR



(3) 膠原病関連 PAH における末梢血単球の役割

今回、PAH の有無により層別化された 2 群間で遺伝子発現を比較したところ、発現量が異なる 12 の遺伝子候補が抽出された。抽出された遺伝子のうち、さらに mRNA 発現が確認された 4 遺伝子がスクリーニングの結果として抽出され、PAH 群で発現が上昇していた 3 遺伝子 (*CCL5*, *CCR6*, *OCLN*) は細胞遊走・接着に関わる既知の遺伝子クラスターに含まれていた。

CCL5 は、T 細胞とともに単球が主な産生細胞であり、病変局所への T 細胞・単球・好酸球・好塩基球のトラフィッキングやホーミングを促し炎症性の病態に関与することが知られている。さらに、血管内皮細胞に作用し、Endothelin-1 の分泌を促進することが報告されている (Molet S, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2000)。Endothelin-1 は PAH 病態の最も重要な因子であるため、病態形成への関与が強く示唆される。

MCTD や SSc では、末梢動脈を始め全身の血管に内腔狭窄病変を来すことが知られている。当研究グループにおいて、SSc では多分化能をもつ末梢血単球サブセットによる脈管形成能が傷害されており、修復不全状態にある一方、その代償として血管新生因子の産生が亢進していることを報告している (Yamaguchi Y, et al. *Arthritis Res Ther* 2010)。今回の結果では、さらに PAH の有無により SSc の末梢血単球の遺伝子発現プロフィールが異なることが示された。中でも、PAH 病態を有する患者群で *CCL5* 産生亢進が示唆された。病変局所への動員と、血管内

皮細胞への Endothelin-1 の発現亢進の促進作用を介して、末梢血単球が肺血管病変形成に関与する可能性が示唆された。今後、PAH 病態形成に関わる末梢血単球の分子メカニズムが解明できれば、肺動脈リモデリングを人為的に制御する治療法の開発につながる可能性がある。

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1件)

Imura Y, Shirai Y, Nojima T, et al. NEFA / nucleobindin-2 is a target autoantigen of the anti-Wa antibody and is associated with transfer RNA. Mod Rheumatol. 2012 [ahead of print]. 12人中2番目. 査読有.

[学会発表](計1件)

Shirai Y, Yasuoka H, Takeuchi T, Satoh T, Kuwana M. “Outcomes of intravenous epoprostenol in patients with pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue disease” 2nd Systemic Sclerosis World Congress. 2012.2.3, Madrid, Spain.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

白井 悠一郎 (SHIRAI YUICHIRO)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：70528801