

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15948

研究課題名(和文) 病的高シエアストレスが生じる肺動脈病変の発症・進行メカニズムの解明とその治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of initiation and progression of pulmonary artery lesions caused by pathological high shear stress and its therapeutic application

研究代表者

篠原 務 (Shinohara, Tsutomu)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：50745932

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)：病的高シエアストレスを受けた肺動脈内皮細胞は、血管内皮細胞のマーカーの発現を低下させ、間葉系マーカーの発現を増加させ、内皮間葉転換を示した。さらに転写因子ERGの低下が、内皮間葉転換をきたす主要な原因であることが分かった。そこで左-右短絡マウスを、下行大動脈と下大静脈の隣接部を25ゲージ針で穿刺して作成した。術後8週で左-右短絡術マウスは肺高血圧となるが、アデノ関連ウイルスを用いてERGを肺血管に過剰発現させた左-右短絡術マウスは有意に肺高血圧が改善した。病的高シエアストレスは肺動脈内皮細胞の転写因子ERGを低下させ内皮間葉転換をきたし肺血管が閉塞していくことを見出した。

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の治療薬は血管拡張・収縮物質産生の不均衡理論に基づいている。しかしすでに病期の進行した症例においては治療抵抗性を指摘する数多くの報告がなされている。そこで本研究は、シミュレーション医学によって見出された、肺血管病変部に生じる病的高シエアストレスに焦点を当てた、血管リモデリングの機序の解明と新たな治療ターゲットを同定することを目的として行った。肺循環の血管リモデリングの機序を病的高シエアストレス刺激に着目し、転写因子ERGの低下により内皮間葉転換が起こることを見出した本研究は独自性が非常に高く、新たな抗リモデリング治療のターゲットに繋がる可能性を秘めており、創造性が極めて高い。

研究成果の概要(英文)： High shear stress (HSS) induced endothelial to mesenchymal transition (EndMT), as assessed by decreased endothelial cell (EC) markers, and increased mesenchymal markers. The transcription factor ERG was reduced with HSS. Indeed ERG siRNA under LSS caused EndMT whereas under HSS, transfection of ERG prevented EndMT. We created an aortocaval (AV) shunt in mice and compared PAH in those sham operated vs transfected with an adeno-associated viral vector selectively targeting PAEC with a luciferase (control) or an ERG expressing construct. Eight weeks after AV shunt, right ventricular systolic pressures was 21.9 ± 0.6 mmHg in sham, 37.2 ± 1.0 mmHg in AV shunt with luciferase vector and 29.2 ± 0.8 mmHg in ERG-vector. Our study is the first to document pathological HSS as an inducer of EndMT and PAH and to show that this results from reduced pulmonary artery EC ERG.

研究分野：Pulmonary Hypertension

キーワード：肺高血圧 シエアストレス 内皮間葉転換 ERG 左右短絡マウス

1. 研究開始当初の背景

左-右短絡を伴う先天性心疾患は、肺細動脈を閉塞させ肺動脈性肺高血圧を進行させる疾患である。しかし、肺血管リモデリングを起こす機序は不明である。近年のコンピュータシミュレーション技術により、心室中隔欠損に伴う肺動脈性肺高血圧の肺細動脈病変には病的な高シエアストレスが生じていることが示された。

2. 研究の目的

病的な高シエアストレス自体が肺細動脈のリモデリングをきたす物理的刺激であるとの仮説を立て、その物理的刺激がどのように肺血管リモデリングをきたすのか、その機序を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

シエアストレスをヒト肺動脈内皮細胞に与える実験は、ibidi社のフローポンプシステムを用いて培養容器の高さと培養液を流す速度を変えることで、正常シエアストレスまたは病的な高シエアストレスを与えた。正常シエアストレスは 15 dyn/cm^2 を 48 時間与え、病的な高シエアストレスは 15 dyn/cm^2 を 24 時間与えた後に 100 dyn/cm^2 で 24 時間刺激して RNA の発現やタンパク発現を解析した。

左-右短絡マウスは、下行大動脈と下大静脈の隣接部を 25 ゲージ針で穿刺して作成した。対照群は開腹・閉腹術のみ行った。肺血管内皮細胞特異的な ERG 過剰発現は、既報のアデノ関連ウイルス (AAV2-ESGHGYF) を用いて行い、左-右短絡作成術の 1 週間前に静注して予防投与した。対照として luciferase を過剰発現させた。術後 8 週で血行動態と組織学的評価を行い、4 群 (N=10) を比較検討した。

4. 研究成果

細胞培養実験において病的な高シエアストレスは、血管内皮細胞マーカーである PECAM1 や CDH5 の発現を低下させ、間葉系マーカーである ACTA2 や FSP1 の発現を増加させ、内皮間葉転換を示した。また、血管内皮細胞マーカーの遺伝子を発現させる転写因子 ERG を低下させ、内皮間葉転換を抑える BMPR2 の発現を低下させた。そこで siRNA を用いて ERG の機能低下実験を行うと、正常シエアストレス下において PECAM1、CDH5 や BMPR2 は低下し、ACTA2 の発現が増加し、内皮間葉転換が再現できた。さらに、レンチウイルスを用いて ERG の機能亢進実験を行ったところ、病的な高シエアストレスにおいて、PECAM1、CDH5 や BMPR2 は増加し、ACTA2 の発現は減少し、内皮間葉転換がレスキューされた。

左-右短絡マウスは、術後 8 週で短絡の自然閉鎖を除外するために腹部エコーを行い、下大静脈内において左-右短絡により生じる乱流が示すモザイクカラーを確認した。またアデノ関連ウイルスの肺特異的なトランスフェクションは luciferase による発光を光学画像で確認した。左-右短絡術 + luciferase マウスは右室収縮期圧 $37.2 \pm 1.0 \text{ mmHg}$ であり、開腹・閉腹術 + luciferase の $21.9 \pm 0.6 \text{ mmHg}$ に比べ有意に高値であった。左-右短絡術 + ERG マウスは $29.2 \pm 0.8 \text{ mmHg}$ と有意に改善したが正常化はしなかった。右室重量や肺細動脈の筋性化も同様の結果だった。左-右短絡術 + luciferase マウスは肺組織で ERG タン

PAK発現が有意に低下し、内皮間葉転換をきたしており、それらは左-右短絡術+ERG マウスで改善していた。

病的高シエアストレスは転写因子 ERG の発現を低下させ、内皮間葉転換を起こし、肺細動脈のリモデリングを起こす。ERG をレスキューさせる治療薬は、肺動脈性肺高血圧の新たな治療薬の候補となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 篠原務
2. 発表標題 肺血管に対する新たな薬物治療の開発 ~ 肺動脈に対する病的高シェアストレスをターゲットにした戦略 ~
3. 学会等名 第126回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠原務
2. 発表標題 左右短絡肺高血圧マウスはERGの低下により内皮間葉転換を来し肺動脈をリモデリングさせる
3. 学会等名 第59回日本小児循環器学会総会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠原務
2. 発表標題 病的高シェアストレスが生じる 肺動脈病変の発症・進行メカニズムとその治療応用
3. 学会等名 第15回血流会
4. 発表年 2024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
---------	---------