

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591565

研究課題名(和文) BMPR2 関連遺伝子改変マウスを用いた炎症性肺高血圧モデルの作成

研究課題名(英文) Induction of pulmonary hypertension by inflammatory stimuli in mice with genetically reduced BMPR2

研究代表者

澤田 博文 (Sawada, Hirofumi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30362354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：BMPR2遺伝子変異は肺動脈性肺高血圧患者で見られるがその役割は明らかではない。炎症機序は、肺動脈性肺高血圧の病態で関与が示されている。BMPR2を減少させたマウスにおいて、TNF- $\alpha$ 投与による、肺高血圧モデルが作成を試みた。BMPR2ヘテロノックアウトマウス(+/-)とコントロールマウスにTNF- $\alpha$ を投与し、肺高血圧、血管病変を検討したが、BMPR2(+/-)において肺高血圧は惹起されなかった。GM-CSF投与は、野生型マウスにおいて、低酸素誘発肺高血圧を悪化させ、抗GM-CSF抗体投与は低酸素誘発肺高血圧を改善した。これらから、BMPR2減少により上昇する炎症機序と病変との関連を示した。

研究成果の概要(英文)：Role of BMPR2 mutation in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH) has not been established. The inflammatory mechanisms are shown to be involved in clinical and experimental pathology of PAH. This study was planned to clarify the association of inflammatory mechanisms and BMPR2 gene mutation in the context of pulmonary hypertension by using the genetically modified animal models. We administered TNF alpha to BMPR2 hetero knockout (+/-) mice or control mice and assessed pulmonary hypertension and vascular lesions. Two week administration of TNF alpha did not induce pulmonary hypertension or pulmonary vascular disease in the BMPR2 (+/-) mice. GM-CSF administration aggravated hypoxia induced pulmonary hypertension in wild type mice, and anti GM-CSF antibody administration improved the hypoxia induced pulmonary hypertension. Thus, an association of inflammatory mechanisms induced by reduced BMPR2 with pulmonary hypertension was demonstrated using animal models.

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児循環器

キーワード：肺高血圧 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧 (PAH) は、原発性以外に先天性心疾患、新生児呼吸器疾患、門脈圧亢進症、自己免疫疾患など幅広い疾患に関連して発症する、難治性の病態である。2000 年に TGF $\beta$ -superfamily である BMP (bone morphogenetic protein) に対する受容体遺伝子 (BMPR2) が肺動脈性肺高血圧の疾患責任遺伝子と同定されて以来 10 年が経過したが、BMPR2 遺伝子異常がいかに肺血管病変を来すのかは未だ不明である。疫学研究から、BMPR2 遺伝子異常保持者が臨床的 PAH を発症するのは約 20% に過ぎないことが明らかとなった。このことは、BMPR2 遺伝子異常の肺高血圧における意義は、『肺高血圧発症において他の遺伝的、環境的因子に対する感受性が増すことである』ことを示唆する。組織学的には内膜中膜を中心とした血管壁の構成要素の肥厚と叢状病変 (plexiform lesion) で特徴づけられる。これらの血管病変形成には、血管壁の各層を構成する、血管内皮、血管平滑筋、繊維芽細胞ばかりでなく、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球などの炎症細胞も重要な役割を担っていると考えられている。さらに、PAH 患者では IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  など血中の炎症性サイトカインの上昇が認められ、臨床的にも炎症機序の関わりが示唆されている。しかし、BMPR2 と炎症の関連に関する知見は極めて限られており、また炎症がどのような機序で血管リモデリングを来すかは、明らかではない。我々は、siRNA を用いて BMPR2 の発現レベルを減少させた培養肺動脈血管内皮細胞において、TNF- $\alpha$  刺激時の p38MAPK リン酸化が遷延し、その結果 Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) の産生が促進されること、さらにヒト肺動脈性肺高血圧患者の肺組織において GM-CSF 蛋白レベルが上昇し、GM-CSF 蛋白は主に病変血管に局在することを示した。(Sawada H, Circulation 2009; 120 (18): S339)。GM-CSF の PAH における役割は、これまでに、検討されていないが、臨床的並びに実験的動脈硬化病変における内皮細胞増殖においては、GM-CSF は病変促進的に働くことが報告されている。また、GM-CSF は血管平滑筋増殖や骨髄からの血管内皮由来細胞の動員作用も報告され、これらの機序は、肺高血圧でも関与が示唆されている。これらの研究結果から、BMPR2 のもつ抗炎症効果の破綻が、肺高血圧発症において重要であるという仮説に至り、今回の研究を計画した。

本研究のもう一つの目的は、ヒト PAH の病変を再現するマウスモデルの作成である。ヒト PAH において、その病態に最も悪影響のある、つまり治療の標的とすべき病変は、血管閉塞性の内膜肥厚である。従来 PAH 研究に用いられる動物モデルの血管病変は中膜肥厚が主体であり、内膜肥厚を来すマウス PAH モデルの報告は非常

に限られている。ごく最近、血管内皮増殖因子受容体阻害剤 Sugen 投与と低酸素環境に暴露されたラットは、内膜肥厚や叢状病変などヒト PAH と類似の病変を形成することが示され、血管内皮の生存が病変形成に重要であることが示唆された。一方で、BMPR2 は、肺動脈血管内皮細胞の生存を促進する因子であると考えられており、そのシグナルの欠損は、血管内皮細胞の生存を阻害すると考えられる。そこで本研究では、BMPR2 の抗炎症効果並びに抗アポトーシス効果の肺動脈病変形成における役割を示すため、BMPR2 自体のヘテロノックアウトマウス、さらに最近新しく同定された BMPR2 シグナルの下流因子、Math6 ノックアウトマウスを用いることとした。Math6 はクロマチン免疫沈降により最近同定された BMPR2 の下流シグナルで、その欠損マウスでは、血管新生が阻害されることが示されている。これらの動物モデルを用い、IL-6、TNF- $\alpha$  など炎症性刺激を加えることにより、肺動脈圧上昇を伴う肺血管病変を作成することを試みる。さらに、その機序を明らかにするため、GM-CSF を含む炎症性メディエーターを測定し、上昇を認めた場合、それらの阻害により、病変形成が抑制されるか否かを明らかにする。

## 2. 研究の目的

肺動脈性肺高血圧の責任遺伝子 (BMPR2) が同定されたが、BMPR2 遺伝子変異の肺動脈性肺高血圧の病変形成における役割は明らかではない。炎症機序は、肺動脈性肺高血圧の病態において臨床的にも実験的にも関与が示されている。最近 BMPR2 の抗炎症効果について、p38 のリン酸化を介した GM-CSF 発現亢進と肺動脈性肺高血圧の病変との関連を示した。今回、2種類の BMPR2 シグナル関連遺伝子改変動物モデルを用いて、in vivo において、BMPR2 遺伝子変異と炎症機序の関連、炎症機序と肺高血圧病変形成との関連、を明らかにするために、本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

## 動物モデルの作成

BMPR2 (+/-) マウスは、東京大学宮園浩平教授から供与を受け、当施設で飼育する。Recombinant murine TNF- $\alpha$  は Peprotech 社から入手し、1.5 $\mu$ g を 1 日 1 回、2 週間、腹腔内投与する。

肺高血圧、右心室肥大の評価ペンタバルビタール麻酔下に、1.4F Micro Tip Catheter (Millar 社) を右頸静脈から右心室内に挿入し、右心室収縮期圧を測定する。摘出心を用いて、右室重量と左室重量を測定し、重量比を求め、右心室肥大の指標とする。

## 肺血管病変の評価

右心室圧測定後、肺を PBS にて還流後、

摘出し左肺をホルマリン固定し、H&E染色、エラスチカワングゾン染色にて評価する。病変構成細胞の同定には、抗PECAM-1(CD31)抗体、(BD Bioscience)、抗 $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体(DAKO)を用いた免疫染色を行なう。抹消の肺動脈の筋性化については、当研究室から報告した方法により定量評価する。

#### 炎症機序の評価

圧測定後、心穿刺により血液を採取し、血清分離後-80にて保存する。血清GM-CSFレベルをELISA(Quantikine kit, R&D system)により測定する。肺組織の炎症細胞浸潤はマウスマクロファージマーカー抗体(Mac-3, BD Bioscience)、T-cellマーカー(CD-3, BD Bioscience)、B-cellマーカー(B220, BD Bioscience)、樹状細胞マーカー(CD11c, Abcam)による免疫染色により評価する。

#### 抗GM-CSF抗体投与による病変抑制の検討

TNF- $\alpha$ 投与マウスまたは、低酸素誘発肺高血圧マウスに、抗GM-CSF中和抗体(22E9, ProBio Science)またはコントロールIgG2(100 $\mu$ g/dose)を2回/週、腹腔内投与する。抗GM-CSF中和抗体投与群コントロールIgG2投与群において、上記の方法で、肺高血圧、血管病変、炎症機序の評価を行う。

#### 4. 研究成果

培養細胞を用いて、siRNAによりBMPR2を減少させた場合、TNF- $\alpha$ などの炎症刺激や低酸素によるストレスが増強されることを示した。(2011 American Heart Associationで発表)これらの、培養細胞で見られる現象のin vivoでの意義を検討するため研究を行っている。まず、これまでに、動物モデルの確立を目指し、TNF- $\alpha$ の投与による、肺高血圧モデルが作成可能か検討を行った。まず、野生型マウスを用いて、TNF- $\alpha$ (0.5, 1.5, 4.5  $\mu$ g)による、in vivoでのGM-CSF誘導能を検討したところ、4.5  $\mu$ g投与したマウスで、血中GM-CSFが検出可能であった。しかし、これらのマウスは、24時間以内に死亡した。これらから、in vivoでGM-CSFはTNF- $\alpha$ により誘導されることが示されたが、GM-CSFを検出可能なまでに上昇させるTNF- $\alpha$ は、致死性である可能性が考えられた。そのため、投与量を1.5 $\mu$ gとし、BMPR2(+/-)とコントロールマウスに投与し、肺高血圧、血管病変を検討した。2週間後、肺高血圧を評価した。BMPR2マウスで優位な右室圧の上昇は見られなかった。野生型マウスにおいては、GM-CSF投与は、低酸素誘発肺高血圧を悪化させ、抗GM-CSF抗体投与は低酸素誘発肺高血圧を改善した。(Sawada H, J Exp Med. 2014)依然 BMPR2の肺高血圧病変形成での

役割は不明である。また、炎症反応は、臨床的、疫学的に血管病変形成に関与が示唆されるが、いかに病変形成に関わるかは不明である。上記のTNF- $\alpha$ を含め、炎症刺激さらには炎症に関わる機序について、BMPR2異常マウスを用いて今後検討を行っていく予定である。

#### 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11件)

(1) Sawada H, Saito T, Nickel NP, Alastalo TP, Glotzbach JP, Chan R, Haghghat L, Fuchs G, Januszyk M, Cao A, Lai YJ, Perez Vde J, Kim YM, Wang L, Chen PI, Spiekerkoetter E, Mitani Y, Gurtner GC, Sarnow P, Rabinovitch M. Reduced BMPR2 expression induces GM-CSF translation and macrophage recruitment in humans and mice to exacerbate pulmonary hypertension. J Exp Med. 2014 Feb 10;211(2):263-280.

(2) Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, El-Bizri N, Sawada H, Rabinovitch M. FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. J Clin Invest. 2013 Aug 1;123(8):3600-3613.

(3) Yamada Y, Maruyama J, Zhang E, Okada A, Yokochi A, Sawada H, Mitani Y, Hayashi T, Suzuki K, Maruyama K. Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. J Anesth. 2014;28(1):26-33

(4) Mitani Y, Ohta K, Yodoya N, Otsuki S, Ohashi H, Sawada H, Nagashima M, Sumitomo N, Komada Y. Public access defibrillation improved the outcome after out-of-hospital cardiac arrest in school-age children: a nationwide, population-based, Utstein registry study in Japan. Europace. 2013 Sep;15(9):1259-1266.

(5) Razavi H, Stewart SE, Xu C, Sawada H, Zarafshar SY, Taylor CA, Rabinovitch M, Feinstein JA. Chronic effects of pulmonary artery stenosis on hemodynamic and structural development of the lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013 Jan 1;304(1):L17-28.

(6) de Jesus Perez VA, Yuan K, Orcholowski ME, Sawada H, Zhao M, Nickel N, Rajagopalan V, Spiekerkoetter E, Wang L, Dutta R, Bernstein D, Rabinovitch M. Loss of adenomatous poliposis coli- $\alpha$ 3 integrin

interaction promotes endothelial apoptosis in mice and humans. *Circ Res.* 2012 Dec 7;111(12):1551-1564.

(7) Alastalo TP, Li M, Perez Vde J, Pham D, Sawada H, Wang JK, Koskenvuo M, Wang L, Rabinovitch M. Disruption of PPAR $\gamma$ / $\beta$ -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J Clin Invest.* 2011 Sep;121(9):3735-3746.

(8) Kim YM, Haghghat L, Spiekerkoetter E, Sawada H, Alvira CM, Wang L, Acharya S, Rodriguez-Colon G, Orton A, Zhao M, Rabinovitch M. Neutrophil elastase is produced by pulmonary artery smooth muscle cells and is linked to neointimal lesions. *Am J Pathol.* 2011 Sep;179(3):1560-1572.

(9) Razavi H, Zarafshar SY, Sawada H, Taylor CA, Feinstein JA. Quantitative characterization of postnatal growth trends in proximal pulmonary arteries in rats by phase-contrast magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Sep;301(3):L368-379.

(10) Perez VA, Ali Z, Alastalo TP, Ikeno F, Sawada H, Lai YJ, Kleisli T, Spiekerkoetter E, Qu X, Rubinos LH, Ashley E, Amieva M, Dedhar S, Rabinovitch M. BMP promotes motility and represses growth of smooth muscle cells by activation of tandem Wnt pathways. *J Cell Biol.* 2011 Jan 10;192(1):171-188.

(11) Lee SJ, Smith A, Guo L, Alastalo TP, Li M, Sawada H, Liu X, Chen ZH, Ifedigbo E, Jin Y, Feghali-Bostwick C, Kim HP, Rabinovitch M, Choi AM. Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Mar 1;183(5):649-658.

〔学会発表〕(計5件)

(1) Otsuki S, Sawada H, Yodoya N, Shinohara T, Kato T, Ohashi H, Imanaka K, Shimpo H, Zhang E, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells and Related Inflammation in the Development of Experimental Obstructive Pulmonary Vasculopathy in Rats. American Heart Association 2013年11月17日 Dallas, USA

(2) Sawada H, Mitani Y, Nakayama T, Fukushima H, Kogaki S, Igarashi T, Ichida F,

Ono Y, Nakanishi T, Doi S, Ishikawa S, Matsushima M, Yamada O and Saji T. Early Detection of Pediatric Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension by School Electrocardiography Screening: a Nationwide Survey in Japan. American Heart Association 2013年11月20日 Dallas, USA

(3) 澤田博文, 三谷義英, 大槻祥一郎, 淀谷典子, 大橋啓之, 丸山一男, 駒田美弘, Marlene Rabinovitch 肺高血圧において、BM $\text{PR}$ 2減少から炎症細胞浸潤に至る機序 第2回日本肺循環学会 シンポジウム『肺高血圧発症の分子生物学的アプローチ』 2013年6月22日 東京

(4) 澤田博文, 三谷義英, 大槻祥一郎, 淀谷典子, 大橋啓之, 丸山一男, 駒田美弘, Marlene Rabinovitch. Reduced BM $\text{PR}$ -II Induces GM-CSF Translation by Impaired Stress Granule Response, Exacerbating Pulmonary Hypertension 第76回日本循環器学会学術集会 シンポジウム『肺高血圧治療の最前線』 2012年3月16日 福岡

(5) Sawada H, Alastalo TP, Glotzbach JP, Chan R, Fuchs G, Januszyk M, Lai YJ, Perez VDJ, Kim YM, Wang L, Saito T, Spiekerkoetter E, Gurtner GC, Sarnow P and Rabinovitch M. Reduced BM $\text{PR}$ -II Increases GM-CSF mRNA Translation by Inhibiting eIF2 $\alpha$ -Mediated Stress Granule Formation and Propensity to Pulmonary Vascular Disease. AHA Scientific Session 20113CPR Cournand & Comroe Young Investigator Award Competition 2011年11月13日 Orlando, USA

〔図書〕(計1件)

(7) Maruyama J, Zhang E, Yokochi A, Sawada H Maruyama K. Nitric oxide in the pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension. *Pulmonary Hypertension.* ISBN 980-953-307-704-3 InTech .<http://dx.doi.org/10.5772/55680>

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

澤田博文 (SAWADA HIROFUMI)  
三重大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30362354

##### (2) 研究分担者

丸山一男 (MARUYAMA KAZUO)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20181828

##### (3) 連携研究者

三谷義英 (MITANI YOSHIHIDE)  
三重大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：60273380