

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790759

研究課題名(和文) 肺血管平滑筋細胞のBMPシグナル異常に着目した肺高血圧症発症機転の解明

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension focusing on BMP signaling in pulmonary arterial smooth muscle cells.

研究代表者

武田 昌也 (Takeda, Masaya)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80534685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：原発性/二次性肺高血圧症(PAH/SPH)の肺動脈平滑筋細胞(PASMC)の増殖におけるBMP・PPARの作用について検討した。PPAR 発現レベルはSPH細胞で減弱し、PDGF・ET-1・BMPによるPAHの細胞増殖作用はPPARで抑制された。PAHではPPAR 発現の減弱が血管作動物質によるPASMC増殖に関与しており、PAH/SPHともにPPAR 活性化によりBMP受容体の発現低下を認め両シグナル間のフィードバックが存在する。血管作動因子やBMPによる細胞増殖作用においてPASMC内のPPAR は増殖抑制活性をもつが、その応答性はPAHとSPHで異なることが示された。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of primary arterial hypertension (PAH) was investigated by focusing on bone morphogenetic protein (BMP) and PPARs in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC). The expression of PPAR-gamma was decreased in PASMC from secondary pulmonary hypertension (SPH) compared with that from PAH. PAH cell proliferation induced by PDGF, ET-1 and BMP was suppressed by PPAR-gamma activation. The reduction of PPAR-gamma expression was related to proliferation of PASMC in response to various vasoactive agents. The expression of BMP receptors was suppressed by the activation of PPAR-gamma in both PAH- and SPH-PASMCs, suggesting the existence of a feedback system of BMP-PPAR in PASMCs. Thus, PPAR-gamma in PASMCs is likely to be involved in the suppression of PASMC proliferation in different ways between PAH and SPH.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：原発性肺高血圧症 二次性肺高血圧症 骨形成蛋白 PPAR

1. 研究開始当初の背景

原発性肺高血圧症(PAH)は若年の女性に好発する非常に予後の悪い進行性疾患である。PAHの本態は原因不詳の肺動脈壁内膜・中膜の肥厚による前毛細血管性肺高血圧であり、現時点では有効な内科的治療に乏しく、肺移植・心肺同時移植といった移植医療も容易な治療法ではない。膠原病由来に発症する二次性肺高血圧症(SPH)も、原疾患の病勢と独立して発症・増悪する症例もみられ、治療に難渋するケースも多い。

PAH症例の約6%は家族性に発生することが知られ、その本態が骨形成蛋白(BMP)の2型受容体(BMPRII)遺伝子変異であることが明らかになった。BMPシグナルの異常がPAHの病態形成に重要であることが示唆されたが、BMPRII受容体変異が実際にどのように肺高血圧症の発症・進展に寄与するかという機序については未だ不明確である。

2. 研究の目的

PAHの肺血管平滑筋細胞におけるBMP受容体シグナル異常の検出や、PAH肺血管組織におけるBMPRIIシグナルの生理活性・機能的意義の探索などを通じて、原発性肺高血圧症の分子病態における骨形成蛋白の関与を明らかにし、新規内科的治療ストラテジーの構築を目指すことを今回の研究の目的とした。

3. 研究の方法

当院循環器内科との共同にて、施設倫理委員会承認のもと肺移植手術の際に得られたPAH/SPHおよび正常肺の摘出組織からPASCを単離培養した。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)、定量リアルタイムPCR法、ウエスタンブロット

法を用いて、BMPのリガンド・受容体・結合蛋白(Follistatin, Noggin, Chordinなど)、BMP転写因子であるSmad 1/5/8、BMP転写制御因子であるSmad 6/7・Smurf 1/2、BMP関連シグナル(MAPキナーゼ: ERK/p38/JNK, Aktなど)の発現と活性について検討した。またPASC増殖能の検討のために、トリチウム標識チミジン(³H-thymidine)またはチミジンアナログ・ブロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込み能を評価し、BMPを含む種々の増殖因子のPASCへの反応性を検討した。特異的BMP中和抗体あるいは結合蛋白の存在下で、PAH/SPHのPASCと正常PASCの培養を実施し、細胞増殖に關するBMP作用を決定した。加えて、PAH/SPH PASCのDNA合成能、Smad転写活性の変化を、ウエスタンブロット法やレポーターアッセイ(Id-1, 3TP, Tlxなど)により検出した。核内受容体PPARシグナルの細胞増殖抑制活性について、チアゾリジン誘導体を用いてBMPシグナルとの機能的連関を検討した。

4. 研究成果

(1)血管作動因子によるPASCの増殖作用:

PAH/SPH由来PASCを単離培養し、PASCの増殖に關する因子の検索を行った。両者のPASCには、BMP 1型受容体(ALK-2, -3, -4, -6)、2型受容体(BMPRII, ActRIIA, ActRIIB)、並びに転写因子 Smad1/5/8, Smad4, Smad6/7の発現を認めた。

BMP-2およびBMP-7(各100 ng/mL)によるPASCの増殖反応はPAH/SPH PASC両方で認められた(チミジン取り込み 1.5~1.75倍、1%ウシ胎児血清(FCS) 24時間培養下)。各種血管作動因子によるPASC増殖作用を検討したところ、PDGF-BBとET-1による細胞増殖反応はPAH/SPH両由来のPASCで同様に認められた(チミジン取り込み 2~2.5倍: PDGF-BB 100

ng/mL, 1.5倍: ET-1 100 nM, 1%FCS 24時間培養下)。しかしアルドステロン(Aldo)による増殖反応はSPH-PASMC (チミジン取り込み 1.2倍: Aldo 100 nM, 1%FCS 24時間培養下)よりもPAH-PASMC(同条件でチミジン取り込み 1.5倍)において有効に認めた。これは以前の我々の報告とも一致しており、PAH発症におけるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の役割が示唆された。また、ウエスタンブロットの結果から、ET-1やAldoに由来する細胞増殖効果にはMAPキナーゼの活性化が関与することが示され、BMP受容体シグナルはこれらの血管作動因子の受容体発現と細胞内シグナルの増強に関与していることが示された。

(2) PASMC増殖におけるシグナル制御やPPAR活性の影響:

これまで我々は、血管作動物質であるPDGFに由来するPASMCの増殖機転において、PDGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブ、ならびにMAPキナーゼ上流のRas/Rho活性化を抑制するスタチンに着目して検討してきた。PDGFによるPASMC増殖刺激下ではイマチニブは細胞をアポトーシスに導く方向に働き、その機序にAkt経路が関係すること、脂溶性スタチンの一種であるシンバスタチンは、細胞周期を抑制させるp27の発現を増強させてPDGFによるPASMC遊走能を抑制し、RhoAの活性化を抑制して、PAH PASMCで特異的に増殖を制御することを示してきた。

これらの結果を背景に、脂質や糖質の代謝に関連する核内転写因子であるPPARに着目した。PPARは、血管を構成する細胞において抗炎症作用・アポトーシス誘導作用を示すことが知られている。我々はこれまで、骨や下垂体などの内分泌組織において、PPARの活性化がBMPシグナルを抑制することを明らかにした。近年、PPARやアポリポ蛋白Apo-E

発現の減少に関連するインスリン抵抗性が肺高血圧症の危険因子の一つと考えられており、PPARアゴニスト投与により肺高血圧のモデル動物の病態やPASMCの増殖誘導が抑制されたことも報告されている。

今回の研究において、PAH/SPH由来のPASMC培養系でPPARの発現について検討したところ、両細胞系でPPARの発現パターンは異なっており、PPARの発現レベルは正常PASMCに比較して、SPHにおいてPAHよりも減弱していた(PPAR mRNA: SPH 0.47倍、PAH 0.91倍)。PPARのアゴニストであるフェノフィブラートはPAH PASMC増殖に影響を与えなかった。一方、PPARアゴニストであるピオグリタゾン(10 μM)の濃度下においてPASMC増殖に抑制的に作用した(BrdU取り込み 74%, 1%FCS 24時間培養下)。この抑制効果は、PDGF-BB, ET-1およびBMP-2によるPASMCの増殖刺激にも同様に働いた(BrdU取り込み 順に 20%, 24%, 22%)。BMP-2, -7添加によって、PAH/SPH PASMC両方とも、PPAR発現は抑制される(PPAR mRNA: 50%抑制)ことから、BMP由来のPASMC増殖作用にPPAR発現の減弱が関与している可能性も示唆された。

血管作動物質ET-1, Aldo, PDGF-BBはPAH PASMCにおけるPPARの発現を抑制し、SPH PASMCでは発現に影響を与えなかったことから、PAH PASMCにおいてはPPARの発現減弱が血管作動物質由来のPASMC増殖に関与している可能性が示唆された。また、PAH/SPH PASMCともにBMPシグナルはPPAR発現に抑制的に働いた。一方で、PPARアゴニスト処理によりBMP 1型受容体(ALK-2, -3, -6)や2型受容体(BMPRII, ActRII)の発現が抑制され、この反応はPAH/SPH PASMC両方で同様に認められたことから、PPAR活性の増強がBMP反応性を抑制するフィードバックシステムの存在が示唆された。BMPのオートクライン作用について検

討するため、BMPに結合して作用を中和する蛋白であるNogginを添加して内因性BMPを抑制したところ、PPAR 発現はPAH PASM Cでは増加(PPAR mRNA 1.39倍)したのに対しSPH PASM Cでは減少した(同 0.59倍。Noggin 100ng/mL, 1%FCS 24時間培養下)。したがって、内因性BMPは、PAHではPPAR の発現抑制的に作用し、SPHではPPAR の発現促進的に作用している可能性が示唆された。つまり、PAHでは血管作動因子(ET-1, PDGF, Aldo)によりPPAR 発現が抑制され、SPHでは内因性BMPがPPAR 発現誘導に部分的に関与している可能性がある。

以上の結果より、血管作動因子やBMPによるPASM C増殖作用において、PASM C内のPPAR活性は基本的には増殖抑制的に作用するが、その応答性はPAH/SPHで差異があることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

大塚文男、勝山隆行、武田昌也、中村一文：ヒト肺高血圧症における肺血管平滑筋細胞の増殖機転の解明と応用。臨床薬理の進歩、査読無、35巻、2014, in press.

Nakamura E, Otsuka F, Inagaki K, Tsukamoto N, Ogura-Ochi K, Miyoshi T, Toma K, Takeda M, Makino H: Involvement of bone morphogenetic protein activity in somatostatin actions on ovarian steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. 査読有 134 2013, 67-74. DOI 10.1016/j.jsbmb.2012.10.018

Matsumoto Y, Otsuka F, Inagaki K, Tsukamoto N, Takano-Narazaki M,

Miyoshi T, Nakamura E, Ogura-Ochi K, Takeda M, Makino H. An in vivo role of bone morphogenetic protein-6 in aldosterone production by rat adrenal gland: J Steroid Biochem Mol Biol. 査読有 132, 2012, 8-14. DOI 10.1016/j.jsbmb.2012.04.004

Miyoshi T, Otsuka F, Nakamura E, Inagaki K, Ogura-Ochi K, Tsukamoto N, Takeda M, Makino H: Regulatory role of kit ligand-c-kit interaction and oocyte factors in steroidogenesis by rat granulosa cells. Mol Cell Endocrinol. 査読有、358, 2012, 18-26. DOI 10.1016/j.mce.2012.02.011

6 . 研究組織

研究代表者

武田 昌也 (TAKEDA MASAYA)

岡山大学医学部 客員研究員

研究者番号：80534685