

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461457

研究課題名(和文) 膠原病性肺高血圧症の病態解明-骨髄由来免疫抑制細胞の分化とGATA-2の関与

研究課題名(英文) The role of myeloid derived suppressor cells and transcription factor GATA2 in collagen disease related pulmonary arterial hypertension

研究代表者

城田 祐子 (Shirota, Yuko)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20455819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈肺高血圧症(PAH)への転写因子GATA-2の関与、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)・マクロファージの役割.1) ヒトPAH肺組織ではGATA2+CD68+マクロファージ細胞浸潤が多数集簇. 2) ヒトPAHで末梢血MDSC増加を認めた.3) GATA2-KOマウスを樹立し、PAHを誘導. GATA2-KOでは、WTより右心負荷が低かった. 肺動脈リモデリングは有意差はなかった. 一方GATA-2 KOで炎症細胞浸潤を多く認めた. これらより、ヒトPAHではGATA2発現上昇、マウスGATA2-KOにて右心負荷が低いことと一致したが、炎症細胞浸潤は相反する結果で検討が必要である.

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of transcription factor GATA-2 and Myeloid derived suppressor cell (MDSC) and macrophage in pulmonary arterial hypertension (PAH). 1) In human pulmonary tissues, there are more GATA2+CD68+ macrophage cell infiltrated in PAH compared to healthy control. 2) Peripheral MDSC subsets were significantly increased in human PAH compared to controls. 3) We established GATA2 conditional knock out mice, and those mice and control mice were induced PAH in hypoxia condition. Right ventricle hypertrophies were highly occurred in controls compared to GATA2-KO. The pulmonary arteries remodeling was equally occurred in both group. On the other hand, there were more inflammatory cells infiltrated in GATA-2 KO. In human PAH, GATA2 expression might be upregulated, however, we could not have definite tendency in inducing PAH in GATA2-KO model. We would like to investigate additional experiments.

研究分野：膠原病

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 転写因子GATA2

1. 研究開始当初の背景

近年、PAH において肺血管拡張薬(エンドセリン受容体拮抗薬など)は著しく進歩し、病態の改善へつながっているが依然として予後は不良である。CTD-PAH では炎症性機序が重要視され、免疫抑制療法が非常に効果的である報告を数多く認めている。特に、当科では CTD-PAH に対して世界的に見ても積極的に免疫抑制療法を行い非常に優れた治療効果を認めた事を報告し、特に全身性エリテマトーデス(SLE)での免疫抑制療法の効果は良好で血管拡張薬との併用により約 70%の症例で肺動脈圧は正常化した。しかし、免疫抑制療法の効果をあまり認めない症例も少ないながら存在し、またステロイド増量に伴う副作用出現もあり、今後は、(1)CTD-PAH の病態のさらなる解明と(2)免疫抑制療法の適応症例を選択できるバイオマーカーの開発は必須であると考えた。

(1) CTD-PAH の病態の解明-MDSC・単球・マクロファージの役割

MDSC は、マクロファージ、樹状細胞や好中球の前駆体であり、癌や慢性炎症において、T 細胞の機能異常や、組織の再構築、線維化などをもたらす未成熟な骨髄性細胞の不均一な細胞集団として知られる。自己免疫疾患における MDSC の役割は報告が少なく、マウスの自己免疫性脳症では、Th17 細胞を誘導し自己免疫現象を増悪させる可能性を示唆されたが、ヒトではほとんど解明されていない。ヒト PAH において末梢血 MDSC が増加していることが報告されたが、その詳細は不明である。筆者は PAH において MDSC (特に単球系サブセット)と、それが分化したマクロファージ(特に M2 タイプ)が肺組織内で、組織の再構築、線維化、T,B 細胞の機能異常、分化異常などをもたらす重要な役割を持つ可能性は高いと考える。MDSC、マクロファージの活性化や、分化異常の機序として特に着目したいのは 単球やマクロファージの分化に不可欠な転写因子 GATA-2 の役割と 自然免疫作動に重要である Toll 様受容体(TLR)とそのリガンドの役割である。

転写因子 GATA-2 の役割

転写因子 GATA-2 は造血幹細胞の分化、及び間葉系幹細胞の機能に重要な役割を持ち、GATA-2 変異(発現障害)を原因とする MonoMac 症候群では末梢血の単球減少や肺泡マクロファージの著しい減少と機能障害を認め、抗酸菌感染、肺泡蛋白症を呈することが知られている。また、GATA-2 は強力な肺血管収縮物質で PAH の病因となるエンドセリンやその受容体発現を制御する重要な役割を果たす。筆者らは PAH において、GATA-2 の過剰発現が末梢血の単球、

MDSC、肺泡マクロファージの増加や機能亢進をもたらして炎症を起こす可能性や、エンドセリンやその受容体が過剰発現することで、肺血管収縮を増強する可能性を探究したい。

Toll 様受容体(TLR)とそのリガンドの役割

筆者は、マウス MDSC が TLR-9 を発現し、TLR-9 リガンド(CpG)刺激により成熟したマクロファージへ分化することを報告した。さらにヒト MDSC は単球系、顆粒球系サブセットがあり、筆者はヒト単球系 MDSC が TLR-2,4,7,8 を発現し、そのリガンド刺激により成熟した M1/M2 マクロファージへ分化することを見出した。CTD-PAH において、自己抗体である U1RNP 抗体と SSA/Ro 抗体陽性率は有意に高いと報告されたが、病態への関与は不明である。それらの抗体の対応抗原は U1RNA・70 k 蛋白質複合体と細胞質 uridine-rich RNA であり、これらは TLR リガンドとして作用する可能性がある。筆者はこのような自己抗体が単球系 MDSC を刺激、活性化して M2 マクロファージへ分化を促し、組織の炎症や線維化をもたらす可能性を探究する。

(2) 免疫抑制療法の適応症例を選択できるバイオマーカーの開発

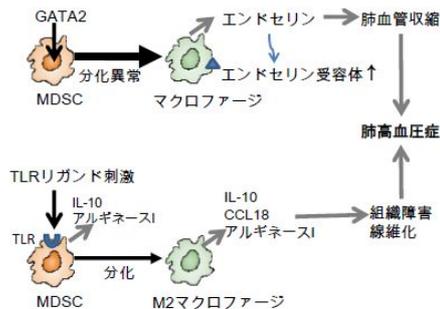
筆者は、SLE の末梢血 PBMC を分離し、その細胞分画をフローサイトメトリーにより詳細に調べることで、抗体産生する plasmablast やほかの B,T 細胞の分画異常が疾患活動性に関与し、加療により正常化する傾向があることを報告した。本研究において PAH 患者の末梢血の MDSC、単球や各種リンパ球サブセットを詳細に検討し、健康人との比較や、治療前後での変化をみることで、疾患活動性に関わるサブセットを探究し、免疫抑制療法の適応症例の選択に役立てたい。

2. 研究の目的

肺動脈肺高血圧症(PAH)、特に膠原病性肺動脈肺高血圧症(CTD-PAH)発症には炎症性機序が重要でだがその解明は十分でなく、免疫抑制療法適応の指標もない。近年骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)は慢性炎症で増加し、PAH 患者の末梢血 MDSC が増加していると報告されたが詳細は不明である。MDSC はマクロファージの前駆体であり、肺泡マクロファージは組織障害、線維化や再構築、T,B 細胞を活性化させる重要な役割を持つ。転写因子 GATA-2 は単球マクロファージ系の分化に根本的な役割を持ち、さらに肺血管収縮に重要なエンドセリン発現も制御する。また MDSC

は Toll 様受容体(TLR)を介して活性化する。本研究では PAH 病態解明のため、MDSC の TLR を介した分化や活性化と、GATA-2 の病態への関与、免疫抑制療法適応の指標を探究することを目的とする。

図1: PAHにおけるMDSCを介した GATA2とTLRの役割(仮説)



3. 研究の方法

(1) 転写因子 GATA-2 の肺組織への分布と発現の程度について

PAH 症例の肺組織と、正常肺組織を GATA-2 で免疫染色して、その分布と発現の程度を比較する。

(2) 末梢血単核球(PBMC)の各サブセット分画と GATA-2 の発現について

PAH 症例と健常人の末梢血単核球を分離し、単球、MDSC,各リンパ球サブセットの蛍光標識した表面マーカー(抗 CD14,CD3,CD56,CD19,CD27,CD33,CD38,CD43,CD44,CD45RA,CD5,CD11b,CD24, CD69, CD71, CD95,CCR7, CXCR3, CXCR4,CD200R,HLA-DR,IgD,IgM,IgG, IgA 抗体)に加え、抗 GATA-2,抗エンドセリン受容体抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて、各サブセット分画の割合や、数を調べ、健常者との比較、あるいは PAH の治療前後で比較することで、疾患特異性、疾患活動性の指標になるサブセットを探究する。さらにそれらの GATA-2 やエンドセリン受容体の発現を各サブセット間での比較し、また健常者と PAH 症例との間での比較をする。なお、筆者は MDSC が健常者でも存在していることを確認済である。また、健常者と肺高血圧症例の PBMC を分離し、さらに Macs beads にて単球を分離する。RNA を抽出して、RT-PCR を行い、GATA2 の発現量について検討する。

(3) 転写因子 GATA2 の PAH の病態への関与 GATA2 コンディショニングノックアウトマウスを樹立する。

GATA2^{flox} マウスは GATA2 の DNA 結合に重要なエクソン 5 両端に flox を入れており、そのマウスに ER-Cre マウスと掛け合わせる。マウスの ER-Cre は細胞特異的なプロモーターで制御されてなく、エストロゲン(タモキシフェン)投与により GATA2 のエクソン 5 が欠損することで全身の GATA2 の機能欠損を来す。生後 10-12 週のマウスを、低酸素室

(10%酸素)で飼育し、タモキシフェンは 1ug を day 1,2,3,8,9,10 に腹腔内投与し day 20-22 に PAH の誘導の有無を解析する。肺病変は、肺動脈のリモデリングの有無や、炎症細胞浸潤の程度をスコアリングをする。心臓は、右心負荷の有無を評価する。肺動脈性肺高血圧症を発症すると肺動脈の弾性板が解離し、この解離の程度を 100 力所の動脈で確認し、リモデリングの指標とする。

4. 研究成果

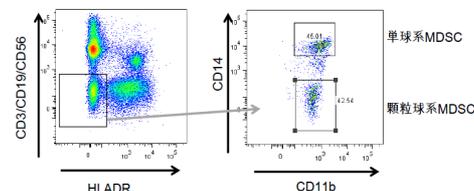
(1) 転写因子 GATA-2 の肺組織への分布と発現の程度について

ヒト PAH の肺組織と、正常肺組織を GATA-2 で免疫染色して、その分布と発現の程度を比較した。PAH 肺組織、肺胞周辺には細胞浸潤が多数集簇し、これらは GATA-2 を強く発現した。正常肺組織にも同様な細胞が散見されたがごくわずかであった。これらの細胞を CD68,サイトケラチンで染色し、これら GATA-2 発現細胞は CD68 陽性の MDSC・単球・マクロファージ系の細胞であることを確認した。これらの細胞の分化の程度や機能についてはさらに検討していく必要がある。

(2) PAH 症例における末梢血単核球(PBMC)の各サブセット分画について

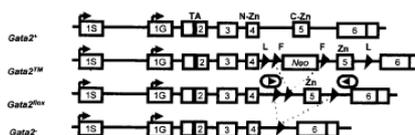
PAH 症例と健常人の末梢血単核球を分離し、単球、MDSC,各リンパ球サブセットの蛍光標識した表面マーカーで染色し、各サブセットの割合を PAH と健常人で比較した。MDSC 分画は健常人で 2% 以下で存在している。PAH 症例では 4-6% 程度に増加していることを確認した。これらの割合は、ステロイドや免疫抑制療法により変化する可能性があるが、さらに症例を蓄積して検討する必要がある。また、健常者と肺高血圧症例の PBMC を分離し、さらに Macs beads にて単球を分離する。RNA を抽出して、GATA2 やエンドセリン受容体の発現などについては今後検討していく予定である。

ヒト単球系MDSCと顆粒球系MDSCサブセット



(3) 転写因子 GATA2 の PAH の病態への関与 私たちは、図 2 のような GATA2 コンディショニングノックアウトマウスを樹立した。

図2 GATA2 コンディショニングノックアウトマウス



GATA2^{flox} マウスは GATA2 の DNA 結合に重

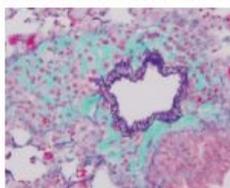
要なエクソン5の両端に flox を入れており、そのマウスに ER-Cre マウスと掛け合わせる。マウスの ER-Cre は細胞特異的なプロモーターで制御されてなく、エストロゲン（タモキシフェン）投与により GATA2 のエクソン5が欠損することで全身の GATA2 の機能欠損を来す。表のような条件で比較検討した。

表. GATA-KOマウスの比較

		タモキシフェン
1	GATA2flox/flox	-
2	GATA2flox/flox-ER-Cre	-
3	GATA2flox/flox	+
4	GATA2flox/flox-ER-Cre (GATA2-KO)	+

生後 10-12 週のマウスを、低酸素室(10%酸素)で飼育し、タモキシフェンは 1ug を day 1,2,3,8,9,10 に腹腔内投与し day 20-22 に PAH の誘導の有無を解析する。肺病変は、肺動脈のリモデリングの有無や、炎症細胞浸潤の程度をスコアリングをする。心臓は、右心負荷の有無を評価する。マウスは表 2 のような条件で比較する。GATA2-KO マウスでは、図 3 のように、一部、肺動脈の弾性板が解離しており、この解離の程度を 100 カ所の動脈で確認し、リモデリングの指標とした。

図3. 肺動脈リモデリング



GATA2-KO と WT マウスを、低酸素室で飼育し PAH を誘導した。タモキシフェンを腹腔内投与し解析。動脈の弾性版解離をみて肺動脈リモデリング、炎症細胞浸潤、心重量で右心負荷を評価。GATA2-KO マウスでは、WT より右心負荷が低い傾向であった。肺動脈リモデリングは GATA 2 -KO, WT の両者で認めたが有意差は明らかでなかった。一方 GATA-2 KO で炎症細胞浸潤を比較的多く認めた。これらより、ヒトにおいて、PAHではGATA2発現上昇を認め、マウスでは GATA2-KO にて右心負荷が低いことと一致したが、炎症細胞浸潤について相反する結果となり、細胞の種類や機能について更なる検討が必要である。

4) 膠原病 PAH に関して、炎症性機序を病態とするシェーグレン、全身性エリテマトーデスと、線維化を病態とする強皮症に関して、免疫抑制療法の効果を比較検討して学会発表した。

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. Shirai T, Fujii H, Saito R, Nasu K, Kamogawa Y, Fukuhara N, Fujita Y, Shirota Y, Ishii T, Harigae H. Relapsing Polychondritis Complicated by Myelodysplastic Syndrome Is Resistant to Immunosuppression: Comment on the Article by Dion et al. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Mar;69(3):682-683.DOI:10.1002/art.39969. Epub 2017 Feb 2. 査読有
2. Tomiyama F, Watanabe R, Ishii T, Kamogawa Y, Fujita Y, Shirota Y, Sugimura K, Fujii H, Harigae H. High Prevalence of Acute Exacerbation of Interstitial Lung Disease in Japanese Patients with Systemic Sclerosis. *Tohoku J Exp Med*. 2016;239(4):297-305.DOI:10.1620/tjem.239.297. 査読有
3. Saito S, Ishii T, Kamogawa Y, Watanabe R, Shirai T, Fujita Y, Shirota Y, Fujii H, Ito K, Shimokawa H, Yamaguchi T, Kawaguchi Y, Harigae H. Extracorporeal Shock Wave Therapy for Digital Ulcers of Systemic Sclerosis: A Phase 2 Pilot Study. *Tohoku J Exp Med*. 2016;238(1):39-47. DOI: 10.1620/tjem.238.39. 査読有
4. Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood*. 2016;128(4):508-18.doi:10.1182/blood-2016-02-698118. Epub 2016 Jun 3. 査読有
5. Yoshida M, Watanabe R, Ishii T, Machiyama T, Akita K, Fujita Y, Shirota Y, Sugimura K, Fujii H, Shimokawa H, Harigae H. Retrospective analysis of 95 patients with large vessel vasculitis: a single center experience. *Int J Rheum Dis*. 2016;19(1):87-94.DOI:10.1111/1756-185X.12777. Epub 2015 Oct 7. 査読有
6. Watanabe R, Ishii T, Araki K, Ishizuka M, Kamogawa Y, Fujita Y, Shirota Y, Fujii H, Harigae H. Successful multi-target therapy using corticosteroid, tacrolimus, cyclophosphamide, and rituximab for rapidly progressive interstitial lung disease in a patient with clinically amyopathic dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2016;26(3):465-6.DOI: 10.3109/14397595.2015.1012797. Epub 2015 Jun 29. 査読有
7. Ishizuka M, Watanabe R, Ishii T, Machiyama T, Akita K, Fujita Y, Shirota Y, Fujii H, Harigae H. Long-term follow-up of 124 patients with polymyositis and

- dermatomyositis: Statistical analysis of prognostic factors. *Mod Rheumatol.* 2016;26(1):115-20.DOI:10.3109/14397595.2015.1054081. Epub 2015 Jun 13. 査読有
8. Shirota Y, Wang J, Bayik D, Shirota H, Tross D, Gulley JL, Wood LV, Berzofsky JA, Klinman DM.. Effect of TLR agonists on the differentiation and function of human monocytic myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2015;194(9):4215-21.DOI:10.4049/jimmunol.11402004. Epub 2015 Mar 30. 査読有
9. Takada N, Watanabe R, Fujii H, Kamogawa Y, Fujita Y, Shirota Y, Saito S, Ishii T, Harigae H. Pseudothrombocytosis caused by cryoglobulin crystals in a patient with primary Sjögren's syndrome. *Mod Rheumatol.* 2015 Sep;25(5):814-5. DOI: 10.3109/14397595.2014.926851. Epub 2015 Jul 29. 査読有
10. Watanabe R, Ishii T, Yoshida M, Takada N, Yokokura S, Shirota Y, Fujii H, Harigae H. Ulcerative keratitis in patients with rheumatoid arthritis in the modern biologic era: a series of eight cases and literature review. *Int J Rheum Dis.* 2015 Jul 14.DOI: 10.1111/1756-185X.12688. 査読有
11. Tomiyama F, Watanabe R, Fujii H, Kamogawa Y, Fujita Y, Shirota Y, Nakamichi T, Sato H, Ishii T, Harigae H. Synovitis in a Patient with IgG4-related Disease. *Intern Med.* 2015;54(11):1427-32.DOI:10.2169/internalmedicine.54.4320. Epub 2015 Jun 1. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

- 1.二宮高洋、城田祐子、星陽介、石井悠翔、藤田洋子、白井剛志、藤井博司、石井智徳、張替秀郎
難治性中耳炎で発症し、診断に苦慮した ANCA 関連血管炎中耳炎(OMAAV)の一例、第 26 回日本リウマチ学会 (JCR) 北海道・東北支部学術集会、2016 年 11 月 26 日、コラッセふくしま (福島)
- 2.Yuko Shirota, Katsutoshi Furukawa, Manabu Tashiro, Tsuyoshi Shirai, Hiroshi Fujii, Tomonori Ishii, Hideo Hasrigae.
Positron Emission Tomography Images with an Amyloid-Specific Tracer 11C-BF-227 in Systemic Amyloidosis Patients. 2016ACR Annual Meeting, 2016 年 11 月 14 日, Walter E. Washington Convention Center (USA)
- 3.城田祐子、石井悠翔、星陽介、藤田洋子、白井剛志、藤井博司、杉村宏一郎、下川宏明、石井智徳、張替秀郎
強皮症とシェーグレン症候群合併肺動脈性肺高血圧症の治療
第 1 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会、2016 年 10 月 1 日、京王プラザホテル (東京)

- 4.城田祐子、武藤智之、町山智章、秋田佳奈恵、鴨川由起子、藤田洋子、藤井博司、石井智徳、張替秀郎
膠原病関連肺動脈性肺高血圧症 (CTD-PAH) における活動性・長期予後の検討 - 集学的免疫抑制療法の効果について
第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016 年 4 月 23 日、パシフィコ横浜 (神奈川)
- 5.Tomonori Ishii, Hiroshi Fujii, Yuko Shirota, Yoshiya Tanaka, Atsushi Kawakami, Kazuyoshi Saito, Kunihiro Ichinose, Hideo Harigae. The first randomized control trial to evaluate the effectiveness of Bortezomib for refractory Systemic Lupus Erythematosus. 2015 ACR Annual Meeting, 2015 年 11 月 9 日, Moscone Center (USA)
6. 城田祐子、町山智章、秋田佳奈恵、鴨川由起子、中村恭平、渡部龍、藤田洋子、藤井博司、石井智徳、張替秀郎
当院の全身性エリテマトーデス (SLE) における抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 陽性の臨床的意義について 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015 年 4 月 25 日、名古屋国際会議場 (愛知)
7. 城田祐子、町山智章、秋田佳奈恵、鴨川由起子、中村恭平、渡部龍、藤田洋子、齋藤真一郎、藤井博司、石井智徳、杉村宏一郎、下川宏明、張替秀郎
全身性エリテマトーデスに伴う肺動脈性肺高血圧症の治療経過-5 年間の観察期間-、PH サミット 2014、2014 年 8 月 3 日 (岡山)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0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0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

<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/index.html>(東北

大学血液免疫病学分野)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

城田 祐子 (SHIROTA, YUKO)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20455819

(2)研究分担者

石井 智徳 (ISHII, TOMONORI)

東北大学・大学病院・特任教授

研究者番号：10282138

藤井 博司 (FUJII, HIROSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30531321

藤原 亨 (ISHII, TOMONORI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：60333796

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()