

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893035

研究課題名(和文)慢性血栓塞栓性肺高血圧症の血栓形成/内皮障害におけるIFN γ の関与と病態の解明研究課題名(英文)Contribution of IFN γ to thrombotic formation and endothelial damage and clarification of development in chronic thromboembolic pulmonary hypertension

研究代表者

重田 文子(Shigeta, Ayako)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・寄付講座教員

研究者番号：70436369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はIFN γ が血管炎症や血栓形成に関与しているという既存研究結果に着目し、慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)の病態形成におけるIFN γ の影響について検討した。CTEPH患者の血清IFN γ 濃度を測定範囲以下群と測定範囲以上群の2群に分けて検討すると、肺動脈造影による血栓部位は、後者の方が有意に末梢型であった。in vitro実験では、肺動脈内皮細胞はIFN γ 刺激により炎症性サイトカイン・細胞接着因子産生が亢進し、血栓由来内皮細胞はIFN γ 刺激がなくてもより強く炎症に関与したRNAが高発現している一方で、IFN γ 刺激によって凝固に関与するRNA発現は凝固抑制の方向に誘導された。

研究成果の概要(英文)：In this study, It was estimated if IFN γ would relate to development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. We divided patients with CTEPH into 2 group depending on serum IFN γ within measuring range of serum IFN γ or more than it. Patients with IFN γ more than measuring range had significant more peripheral thrombosis. IFN γ stimulation induced production of inflammatory cytokines and cell attachment molecules in pulmonary arterial endothelial cells. In terms of endothelial cells derived from removed thrombosis by pulmonary endarterectomy, RNA expression related to inflammation were much higher even without IFN γ stimulation and induced further with IFN γ stimulation. However interestingly, IFN γ stimulation reduced RNA expression related to coagulation.

研究分野：呼吸器：肺循環

キーワード：IFN γ 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 肺動脈内皮細胞 肺動脈平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) 患者の約半数は急性静脈血栓症の既往がなく、CTEPH は急性静脈血栓塞栓症が慢性化したものと単純に考えることは困難である。現在では下肢静脈から浮遊してきた血栓が詰まった結果以外に、肺動脈で血栓が *in situ* に生じる病態も提言されている。本来ならば自身の線溶系によって溶解するはずの血栓が肺動脈内に残存し続け、時に抗凝固療法にも抵抗する血栓であること、これは単に凝固線溶系のバランスが崩れただけでは説明できない CTEPH に特徴的な病態形成機序が存在していることを表しているのではないだろうか。この機序に關与する molecule とそのメカニズムが明らかになれば、CTEPH に対する新たな治療戦略につながると考える。

IFN は Th1 細胞・Tc 細胞・NK 細胞で産生されるサイトカインである。感染症・悪性腫瘍・慢性炎症性疾患罹患時や妊娠中には Th1 細胞や NK 細胞からの IFN 産生が亢進していることがわかっており、これら病態は血栓症の危険因子でもある。

我々は肺微小血管内皮細胞を IFN で刺激すると TNF・MCP-1・RANTES 産生が亢進し、細胞自体に Fas 関連アポトーシスが誘導される結果を得た。また TNF 刺激で誘導されたウシ大動脈血管内皮細胞の Endothelin-1 mRNA 発現と Endothelin-1 産生は、IFN 刺激が加わると有意に上昇し、nitric oxide 合成は抑制されるとの報告がある。更に、野坂らは下大静脈を結紮した深部静脈血栓塞栓症モデルを IFN ノックアウトマウスで作成すると MMP9 と VEGF の発現が高まり、野生型マウスで作成された群に比べて血栓溶解が促進したと報告した。また野生型マウスで

作成された群に IFN 中和抗体を投与しても血栓溶解が促進したことから、IFN 欠損が血栓溶解に關与していると結論付けている。これらの結果は、IFN 刺激は肺動脈内皮に炎症とそれに伴う血管内血栓を生じさせ、更に血栓自体の溶解をも抑制するという機序の存在を想像させる。もしも何らかの原因で血液内の IFN 濃度が高まり、その刺激が肺動脈に持続的に作用したならば、我々が時に CTEPH 症例で経験する溶けづらい血栓が肺動脈内で *in situ* に生成され続けはしないだろうか。以上より、肺動脈構成細胞における IFN 刺激の影響を明らかにすることは、CTEPH の病態形成メカニズムを考える上で重要ではないかと考えている。

2. 研究の目的

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) の血栓は、自身の線溶系や抗凝固療法に反応せず残存し続け、時に増悪することさえある。この疾患をただ下肢静脈血栓が肺動脈に到達した急性肺血栓塞栓症が慢性化したものと単純に捉えるには、あまりにも特異な経過を辿る症例を度々経験する。我々は CTEPH の血栓が肺動脈の内皮障害が発端で *in situ* に発生しそのまま残存し続けるのではないかとこの仮定に基づき、その誘因 molecule として過去の論文や自身の実験結果などから IFN に着目した。本研究の目的は、血清 IFN 濃度と重症度や予後との関係、IFN 刺激が肺動脈内皮細胞・肺動脈平滑筋細胞に及ぼす影響、また CTEPH 患者の肺動脈血栓内膜組織から得られた内皮細胞や平滑筋細胞での IFN 刺激での反応を調べ、IFN の CTEPH 病態形成への關与を解明することである。

3. 研究の方法

(1) CTEPH 患者の血清 IFN 濃度を ELISA に

て測定し、患者背景・肺血行動態・血栓部位・予後との関連を解析した。

(2) CTEPH 患者の肺動脈血栓内膜摘除術による摘出血栓内膜組織から磁気細胞分離にて血管内皮細胞 (CD31 陽性細胞) を単離した。

(3) コマーシャルベースの微小肺動脈内皮細胞と肺動脈平滑筋細胞培地上清に

IFN 4000 単位投与した 24 時間後に上清中のサイトカイン濃度を BioPlex システムによって測定した(測定項目: IL-1・IL-1ra・IL-2・IL-4・IL-5・IL-6・IL-7・IL-8・IL-9・IL-10・IL-12・IL-13・IL-15・IL-17・Eotaxin・FGF-b・G-CSF・IP-10・MCP-1・MIP-1a・MIP-1b・PDGF-bb・RANTES・TNF- α ・VEGF)。IFN 非投与群も作成し、IFN 刺激による両細胞のサイトカイン産生変化を確認した。

(4) CTEPH 患者から摘出された血栓内膜組織由来の血管内皮細胞(血栓由来内皮細胞)培地上清に IFN 4000 単位投与した 24 時間後に細胞を採取し、RT²ProfilerTM PCR Array を用いて増殖因子、接着因子、血管新生因子、凝固線溶因子の RNA 発現を網羅的に解析した。末梢肺癌に対して施行された際に摘出された肺動脈から単離培養した血管内皮細胞をコントロールとして用いた。これらの結果を比較することで血栓由来内皮細胞の RNA 発現の特徴や IFN 刺激による変化について検討した。

4. 研究成果

本研究では IFN が血管炎症や血栓形成に関与しているという既存研究結果に着目し、慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)の病態形成における IFN の影響について検討した。

(1) CTEPH 患者の血清 IFN 測定と臨床データ解析

CTEPH 患者 45 人の血清 IFN 濃度を測定、45 人中 33 人が測定範囲以下の結果であったため、測定範囲以下群(陰性群)と測定範囲以上群(陽性群)にわけた後に肺血行動態・血栓部

位・予後との関係について Mann-whitney U 検定にて解析した。肺血行動態と予後に関しては両群において有意差は認められなかったが、肺動脈造影による Central disease score(血栓部位評価法)では、陽性群の方が有意に低く、末梢優位型であることが示された(P=0.006)(図 1)。

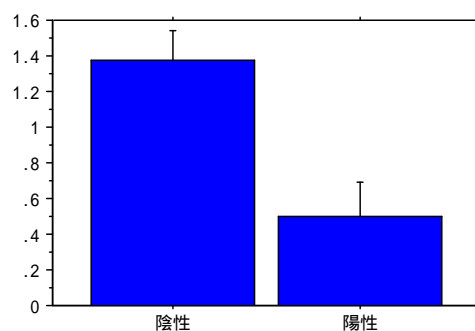


図 1. 血清 IFN 値と Central disease score の関係: 血清 IFN 値が測定範囲以上の患者群では Central disease score が有意に低い(P=0.006)。

(2) CTEPH 患者の肺動脈血栓内膜摘除術検体からの血管内皮細胞

CTEPH に対して施行した肺動脈血栓内膜摘除術にて摘出された血栓内膜組織から、CD31 抗体を用いた磁気細胞分離にて血管内皮細胞を分離することに成功した。

(3) 肺動脈内皮細胞と平滑筋細胞のサイトカイン産生と IFN 刺激による変化

肺動脈内皮細胞は IFN 刺激により IL-1・IL-1ra・IL-2・IL-4・IL-5・IL-6・IL-7・IL-9・IL-10・IL-12・IL-13・IL-15・IL-17・Eotaxin・IP-10・MCP-1・MIP-1a・MIP-1b・PDGF-bb・RANTES・TNF- α 産生の上昇、IL-8 産生の低下を認めた。以上より肺動脈内皮細胞は IFN 刺激により炎症性サイトカイン・ケモカイン産生が亢進することが示された。

同様の検討を肺動脈平滑筋細胞にて行うと IL-1・IP-10・RANTES 産生の上昇、IL-12・

IL-13・GM-CSF・PDGF-bb・TNF- α ・VEGF 産生の低下を認めた。以上より肺動脈平滑筋細胞は IFN γ 刺激により炎症性サイトカイン・ケモカイン産生亢進、抗炎症性サイトカイン産生低下することが示された。

IFN γ 刺激による TNF α の変化に関しては、平滑筋細胞では平均 8pg/ml が 5pg/ml へと有意に低下するが、内皮細胞では平均 2pg/ml が 40pg/ml へと約 20 倍の有意上昇をするため、肺動脈全体としては内皮細胞からの TNF α 量が重要であり IFN γ 刺激が炎症を誘導すると言えるであろう。逆に IFN γ 刺激による VEGF の変化に関しては、平滑筋細胞では平均 244pg/ml が 174pg/ml へと有意に低下するが、内皮細胞では定常状態では測定範囲以下、IFN γ 刺激により 6 検体中 3 検体が測定範囲以上になるも平均 0.56ng/ml と平滑筋細胞の産生する VEGF に比べればごく少量であった。従って、肺動脈全体としては平滑筋細胞からの VEGF 量が重要であり、IFN γ 刺激が平滑筋細胞からの VEGF 産生を低下させ、血栓形成を誘導すると言えるかもしれない。

(4) 肺動脈内皮細胞と血栓内膜組織由来の血管内皮細胞の RNA 解析

CTEPH 患者から摘出された血栓内膜組織由来の血管内皮細胞(血栓由来内皮細胞)は IFN γ 刺激がない状態でも CXCL1・IL8・MAP2K1・PTGS2 の RNA 発現の有意な上昇を認め、IFN γ 刺激によってコントロール細胞では低下する CSF1 の RNA 発現が上昇し、コントロール細胞では変化しない F2RL3 の RNA 発現低下と KDR の RNA 発現上昇を認めた。つまり、血栓由来内皮細胞は定常状態でもコントロールに比べて炎症関連 RNA 発現が上昇しており、IFN γ 刺激により更に発現が亢進することが明らかになった。また血栓由来内皮細胞は IFN γ 刺激により凝固に関与する RNA 発現は凝固抑制の方向に誘導されるという特徴を示した。

以上の結果より、肺動脈内皮細胞・肺動脈平滑筋細胞はともに IFN γ 刺激によって炎症性サイトカイン・ケモカイン産生が上昇し、それらによって細胞が活性化され、細胞表面の組織因子・トロンピン受容体・細胞接着因子などが発現することで血栓が形成されやすくなる可能性がある。血栓由来内皮細胞では定常状態でも炎症関連 RNA 発現が亢進しており、一度血栓が出来ると正常内皮細胞よりもより血栓が形成されやすい環境になることが示唆される。しかし凝固に関与する RNA 発現は凝固抑制の方向に誘導されるという結果であり、炎症亢進と凝固抑制のバランスが血栓残存に関与しているのかもしれない。

残念ながら今回は血栓由来平滑筋細胞の分離が出来なかったため、IFN γ 刺激有無による血栓由来平滑筋細胞の特徴を確認することが出来なかった。Bioplex の結果からは、正常平滑筋細胞では IFN γ 刺激による VEGF 産生低下を認め、それは内皮細胞の結果を相殺する結果であった。血栓由来平滑筋細胞では血栓内皮細胞の結果を相殺する程度の血栓形成に傾く RNA 発現の変化が認められるかもしれない。

患者検体による解析では IFN γ 陽性群では末梢血栓有意であった。これまでの結果と合わせると、IFN γ 刺激により肺動脈内皮細胞や肺動脈平滑筋細胞から炎症性サイトカイン・ケモカイン産生が亢進し、それらにより肺動脈自体に炎症が生じる。これが慢性的に続けば血管リモデリングが進み、また炎症自体が血栓形成を誘導する。そして一度血栓が形成されると正常内皮よりも更に炎症が進行しやすい状況となる。これらの状況が弾性繊維・膠原繊維が豊富な弾性血管である中枢肺動脈よりも平滑筋層が発達している筋性動脈である末梢肺動脈で起きやすいのかもしれない。更なる追加実験を進めることで、IFN γ の CTEPH 末梢型発症機序との関係を明

らかにしていきたい。

<引用文献>

Proc. Am. Thorac. Soc. 3, 609-614,
2006

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.
303:L141-51, 2012

J Clin Invest. 90879-887, 1992

J Clin Invest. 121: 2911-2920, 2011

5 . 主な発表論文等なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

重田 文子 (SHIGETA Ayako)

千葉大学・大学院医学研究員・寄付講座教
員

研究者番号：70436369