86. 肺動脈性肺高血圧症の病態形成機構の解明

中岡　良和

国立循環器病研究センター研究所 血管生理学部

Key words：肺動脈性肺高血圧症，炎症性サイトカイン，interleukin（IL）-6，IL-21，抗サイトカイン療法

緒　言

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は肺動脈末梢の小動脈（細小動脈）レベルで特異的に内膜・中膜の肥厚・閉塞を来して、肺動脈圧の上昇から右心不全に至る可能性のある厚生労働省指定難病である。近年、PAH の治療ではプロスタグランジン I_2、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬などの肺動脈平滑筋細胞の収縮・弛緩の不均衡を標的とした肺血管拡張薬による治療が保険承認・導入されて、予後は著明に改善している。しかし、PAH のサブグループの 1 つである膠原病性 PAH の予後は依然として不良であり、PAH で肺血管拡張薬の治療の効果が不十分な unmet medical needs は未だ存在する。また、現在の PAH に保険適応のある薬剤は全て平滑筋の収縮・弛緩を標的としており、平滑筋の収縮・弛緩と作用機序の異なる新しい PAH に対する治療薬が必要である。

PAH の発症には遺伝的背景に加えて、「炎症」などの環境因子による刺激が必要と考えられる。Interleukin（IL）-6 は様々な炎症性疾患の病態形成に関わることが報告される炎症性サイトカインである。PAH 病態形成の鍵を握るサイトカインとして、これまで多くの報告がなされていた。PAH 患者の血清中で炎症性サイトカインの中で、特に IL-6 が高値の場合は予後が有意に悪い［1］。また、肺胞上皮特異的 IL-6 過剰発現マウスは PAH を自然発症するのみならず、低酸素曝露性肺高血圧症モデル（Hypoxia-induced PH：HPH）を作製すると PAH 病態が著明に増悪する［2］。以上より、IL-6 は PAH 病態形成の鍵であることが報告されていたが、その下流の分子機構は不明であった。

我々は HPH マウスの肺で、IL-6 が肺細小動脈の内皮細胞、平滑筋細胞で強く産生されること、そして HPH マウスに抗 IL-6 受容体抗体（MR16-1）を投与するとコントロールに比べて HPH 病態が著明に抑制されることを見出した。また、HPH マウス肺で IL-6 依存性のエフェクター細胞として働く Th17 細胞が有意に増加して、Th17 細胞が主に産生する IL-21 が肺胞マクロファージを M2 マクロファージへ極性化することで肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進することを明らかにして、以上の結果を 2015 年に報告した（図 1）［3］。

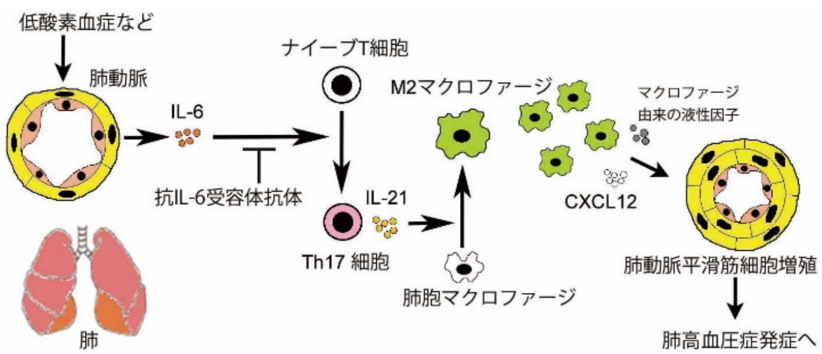

図 1.　PAH 病態形成と IL-6/IL-21 シグナルの関係
HPH マウス肺では低酸素刺激によって主に肺動脈内皮細胞から IL-6 が分泌誘導されて、IL-6 依存性に肺胞マクロファージの M2 極性化を介して肺動脈平滑筋細胞の増殖が誘導された。（文献 3）より改変引用）

この HPH マウスモデルは、右室収縮期圧（RVSP：正常値 15〜20 mmHg）が 30〜35 mmHg に上昇する中等症 PAH モデルであり、肺の細小動脈と小動脈の中膜肥厚のみ誘導するが、亜閉塞性病変を来さない点が問題点として存在する。我々は上記論文にて、MR16-1 による IL-6 阻害や IL-21 受容体欠損（IL-21RKO）マウスにおける IL-21 阻害は低酸素で誘導される中膜肥厚（筋性化）を抑制することを明らかにしたが［3］、重症 PAH 患者で見られる重症の病理像である新生内膜増殖や叢状病変の形成と血行動態の重症化が IL-6 や IL-21 などのサイトカインシグナルの阻害で防げるかは明らかでなかった。IL-6 や IL-21 を標的とした抗サイトカイン療法の有効性をヒトの重症 PAH 患者で検討する臨床試験を将来行うためには、PAH 重症病態におけるこれらのサイトカインの役割を明らかにする必要がある。そこで、本研究は PAH 病態重症化における IL-6／IL-21 シグナルの役割を解明することを目的として行った。

方　法

1.　CRISPR/Cas9 システムによる IL-6KO ラットと IL-21RKO ラットの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-6KO ラットと IL-21RKO ラットを作製した。

2.　Su／Hx／Nor モデルにおける野生型（WT）ラットと KO ラットでの PAH 表現型の比較・検討

ヒトの重症 PAH 患者では、病理学的に中膜肥厚だけでなく、内膜増殖病変・叢状病変のような亜閉塞性／閉塞性の病理像が見られる。ヒト重症 PAH に酷似する病理像と病態を呈するモデル動物として、Sugen5416／Hypoxia／Normoxia（Su／Hx／Nor）ラットがある［4］。Su／Hx／Nor モデルは VEGFR2 阻害薬（Su）を皮下注後、ラットを 3 週間低酸素曝露（Hx；10% O_2）して、更に 5 週間正酸素曝露（Nor；21% O_2）することで、RVSP が体血圧を凌駕するレベルまでに上昇して、病理学的にも叢状病変や新生内膜増殖などの病理像を誘導すると報告されている［4］。Su／Hx／Nor モデルラットを WT と IL-6KO および IL-21RKO ラットで計 8 週間の負荷により作製して、イソフルラン麻酔と人工呼吸器管理下で頚静脈アプローチによる右心カテーテル実験を施行して血行動態測定（RVSP 測定など）を行った。右心カテーテル終了後に、心臓や肺などの組織を採取して右心室／左心室＋心室中隔重量比（Fulton 比）を算出して、さらに肺組織標本を作製後に肺小動脈リモデリングを評価した。

結　果

1.　CRISPR/Cas9 システムによる IL-6KO、IL-21RKO ラットの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-6KO ラット、IL-21RKO ラットを作製した。IL-6KO については、LPS 腹腔内投与後の IL-6 発現誘導の有無を ELISA にて確認して、IL-21RKO については肺組織での IL-21R 蛋白質発現の欠損をウェスタンブロットによって確認して遺伝子欠損の確認を行った。

2.　Su／Hx／Nor モデルにおける野生型（WT）ラットと KO ラットでの PAH 表現型の比較・検討

まず、野生型ラットで Su／Hx／Nor モデルを作製したところ、従来の報告通りに、血行動態的には RVSP が 100 mmHg を超えるレベルの重症 PAH 病態を呈して、組織学的には新生内膜病変や叢状病変を遠位肺小動脈レベル、細小動脈レベルにおいて認めた［4］。本研究で作製した IL-6KO ラット、IL-21RKO ラットで Su／Hx／Nor モデルを作製すると、血行動態での RVSP の有意な改善、組織学的所見の有意な改善が観察された（図 2）。

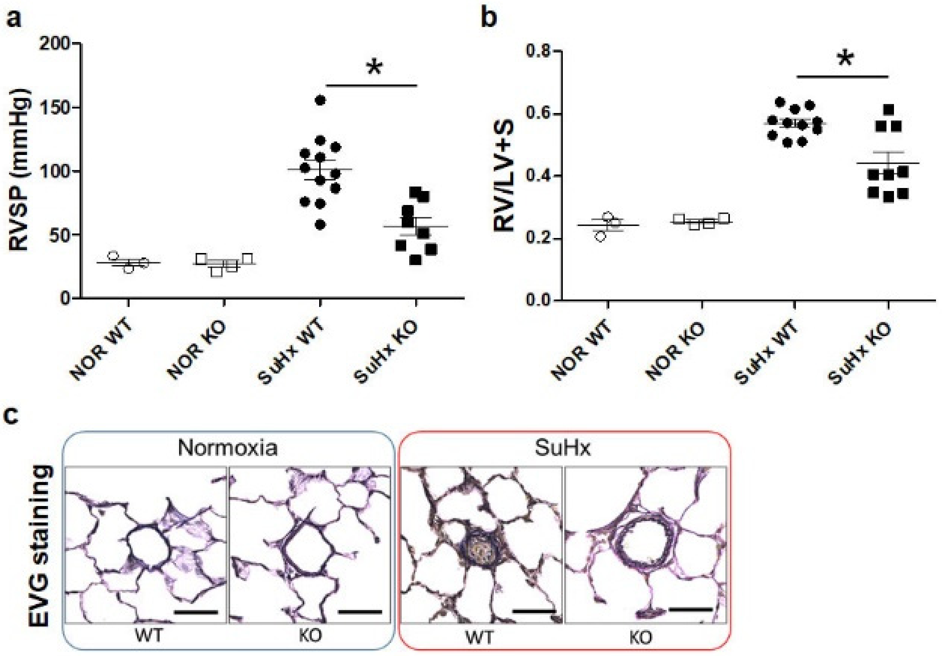

図 2. Su／Hx／Nor 重症 PAH モデルにおいて IL-6／IL-21 シグナルは重要な役割を担う
野生型ラットと KO ラットで Su／Hx／Nor 負荷を計 8 週間行った後、右心カテーテルによる血行動態測定を施行して、更に右心肥大の程度と肺血管リモデリングの評価を行った。
a）右室収縮期圧（RVSP）は KO ラットでは野生型より有意に低下していた。
*P< 0.05 （ANOVA 解析による）。
b）右室／左室＋心室中隔重量比（Fulton 比）は KO ラットでは野生型より有意に低下していた。
*P< 0.05 （ANOVA 解析による）。
c）Elastica van Gieson 染色による肺血管リモデリングの検討。（Bar ＝ 50 μ m）

また、IL-6KO ラット及び IL-21RKO ラットを野生型ラットと比較すると、肺の血管病変周囲への免疫細胞の浸潤に差が見られた。今後、Su／Hx／Nor モデルの各ラット群の肺から単離した細胞集団を用いて FACS 解析を詳細にすることで、IL-6 と IL-21 が PAH 病態の重症化で果たす役割を明らかにしたい。

考　察

重症 PAH モデル動物で現在最も広く使用される Su／Hx／Nor モデルラットで、今回、野生型と IL-6KO、IL-21RKO とを比較検討した結果、IL-6 シグナルや IL-21 シグナルの阻害が PAH 重症化を抑制できる可能性が示唆された。IL-6 シグナル阻害の治療薬としては、ヒト型化モノクローナル抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブと完全ヒト型化抗 IL-6 受容体抗体サリルマブの 2 つの薬剤が関節リウマチを中心に、わが国と世界各国で保険承認されて使用可能となっている。我々は、厚労省指定難病の大型血管炎である高安動脈炎に対してトシリズマブで治療するパイロット試験と治験をこれまで行い、2017 年に日本で保険適用の追加承認を得ている［5～7］。上記の臨床経験を踏まえて、ヒトの重症 PAH 患者を対象として、抗 IL-6 受容体抗体トシリズマブまたは抗 IL-21 抗体や抗 IL-21 受容体抗体を用いた治療の臨床試験を今後検討して、難治性 PAH に対する新しい治療法の開発に繋げたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立循環器病研究センター研究所血管生理学部の稲垣薫克、同病院心臓血管内科部門肺循環科／肺高血圧症先端医学研究部の大郷剛である。この場を借りて、感謝の意を表したい。

文　献

1) Soon E*, et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010 Aug 31;122(9):920-7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762. Epub 2010 Aug 16. PMID:20713898

2) Steiner MK*, et al.* Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2009 Jan 30;104(2):236-44, 28p following 244. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182014. Epub 2008 Dec 12.

3) Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawa S, Sawa Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takihara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata Y, Nakaoka Y.* Interleukin-6/interleukin-21-signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 May 19;112(20):E2677-86. doi: 10.1073/pnas.1424774112. Epub 2015 May 4. (*corresponding author)

4) Abe K, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010;121(25):2747-54. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927681

5) Nakaoka Y*, Higuchi K, Arita Y, Otsuki M, Yamamoto K, Hashimoto-Kataoka T, Yasui T, Ikeoka K, Ohtani T, Sakata Y, Shima Y, Kumanogoh A, Yamauchi-Takihara K, Tanaka T, Kishimoto T, Komuro I. Tocilizumab for the Treatment of the Patients with Refractory Takayasu Arteritis. *Int Heart J.* 2013;54(6):405-11. PMID:24309452　(*corresponding author)

6) Arita Y, Nakaoka Y*, Otsuki M, Higuchi K, Hashimoto-Kataoka T, Yasui T, Masaki T, Ohtani T, Kishimoto T, Yamauchi-Takihara K, Komuro I, Sakata Y. *Int J Cardiol.* 2015;187:319-21. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.399. Epub 2015 Mar 28. (*corresponding author)

7) Nakaoka Y*, Isobe M, Takei S, Tanaka Y, Ishii T, Yokota S, Nomura A, Yoshida S, Nishimoto N. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with refractory Takayasu arteritis: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial in Japan (the TAKT study). *Ann Rheum Dis.* 2018 Mar; 77(3):348-354. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211878. Epub 2017 Nov 30. (*corresponding author)