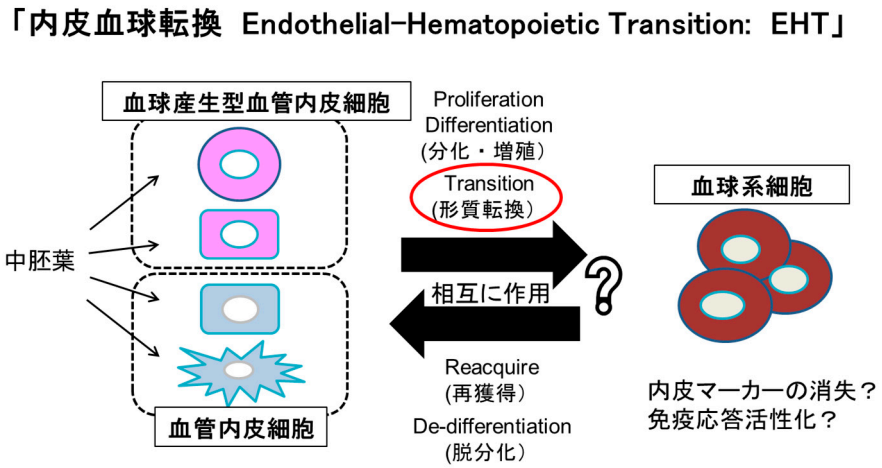
182　肺高血圧症疾患モデルにおける内皮血球転換機構の解明	関根　亜由美

【目的】呼吸器疾患における病態形成や組織再生応答において、内皮血球転換＝EHT がどのように関わっているのか未だその詳細なメカニズムは明らかにした報告はない。そこで本研究では肺高血圧症モデルを中心に肺循環系における EHT の分子メカニズムと血管新生機構を詳細に明らかにすることとする。

【方法】1. 肺高血圧症マウスモデルに対する右心カテーテル（Miller 社）を用いた血行動態評価と肺組織病理を解析した。2. マウス肺を使用した内皮血球転換（以下、EHT）における肺構成細胞の動態と機能解析を行った。3. 肺組織切片標本を用いて蛍光免疫染色を行い *in situ* での EHT 陽性細胞を可視化した。

【結果】Su5416 投与低酸素暴露 3 週マウス群（以下、SuHx 群）と慢性低酸素暴露モデル群（Hx 群）では、右室収縮期圧（RVSP）は両群ともに有意に上昇を認めた。組織学的評価でも SuHx 群と Hx 群では病態形成を反映する内皮の肥厚、筋性化レベルはほぼ同等であった。EHT 陽性細胞も病勢に一致して 2〜3 週にかけて有意に割合が増加していることを確認した。BrdU 標識を用いた増殖能評価では 3 週目で上昇している傾向を認めた。肺組織凍結切片上で Runx-1 VE-cadherin CD31 抗体を用いて 3 重染色を行った。コントロールとの評価では肺高血圧症モデルの肺血管での分布にてフローサイトメトリーでの結果に合致する傾向を認めた。以上から、Runx-1 を中心とする EHT 陽性細胞は肺高血圧症の病態形成に寄与している可能性が示唆された。

本研究の目的



182. 肺高血圧症疾患モデルにおける内皮血球転換機構の解明

関根　亜由美

千葉大学 大学院医学研究院 呼吸器内科学

Key words：内皮血球転換，血管新生，組織幹細胞，低酸素応答，肺循環

緒　言

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は肺血管の過剰な肺動脈収縮、内膜・中膜肥厚等による肺動脈リモデリングにより肺血管抵抗の上昇を来す難治性疾患である。異常な血管新生や病的なリモデリング形成には肺血管内皮細胞の機能不全が過剰な細胞増殖や不完全な血管新生を誘導することに起因する［1］。その過程で各肺血管構成細胞間（血管内皮細胞、間葉系細胞、血球系細胞）にはクロストークが存在し、細胞の形質変化や分泌因子を介した作用が病態形成に関与の後に線維芽細胞・平滑筋細胞等の間葉系細胞の活性化が血管の異常リモデリングの契機となることが提唱された［2］。

我々の研究グループは、血管内皮細胞が可逆的な間葉系細胞への形質転換（partial EndMT）を経由して内皮マーカーを維持しながら組織修復と再生に寄与する一方で、不可逆的な形質転換（complete EndMT）が間葉系の異常増殖を司り血管リモデリングを引き起していることを初めて明らかにした［3］。また近年、よく分化した血管内皮細胞に形態変化が生じ、細胞極性と細胞接着因子の喪失と遊走性を獲得して血球系細胞への形質転換（内皮血球転換＝EHT）を起こすという概念も提唱され始めている［4］。呼吸器疾患における病態形成や組織修復時において、この形質転換がどのように関わっているのか未だその詳細なメカニズムは明らかにした報告はない。そこで本研究の目的は肺高血圧症モデルにおける肺循環系における EHT の分子メカニズムと血管新生機構を詳細に明らかにすることを挙げる。

方　法

本研究に使用する疾患モデルマウスは、C57BL6/J を使用して、特発性肺動脈性肺高血圧症（IPAH）モデルとして VEGF 阻害薬である Su5416 投与処置を行った低酸素暴露 3 週マウスを、また比較モデルとして慢性低酸素暴露 3 週マウスを作製した。

1．肺高血圧症マウスモデルに対する右心カテーテル（Miller 社）を用いた血行動態評価と肺組織での病理評価を併せて行う。

2．マウス肺を使用した内皮血球転換（以下、EHT）における肺構成細胞の動態と機能解析

$CD31^{+}CD45^{-}$cell を血管内皮細胞（PVECs）、$CD31^{-}CD45^{+}$cells を血球系細胞、Runx /VE-cad^{+}PVECs を EHT 細胞と定義した。これらの細胞特性を複数の表面マーカーを組み合わせて多面的にフローサイトメトリーを用いて解析する。

結果および考察

１．肺高血圧症マウスモデルに対する右心カテーテルを用いた血行動態評価と肺組織での病理評価

Su5416 投与低酸素暴露 3 週マウス群（以下 SuHx 群）と慢性低酸素暴露モデル群（Hx 群）では、コントロールとの比較でマウス体重が低下、右室／左室・中隔比（fulton index）は上昇傾向であった。また、右室収縮期圧（RVSP）は両群ともに有意に上昇を認めた。一方で、心拍出量は Hx 群とコントロール群間では有意に減少も、SuHx 群とコントロール群間では有意差は認めず低下している傾向のみを認めた（図 1a）。組織学的評価でも SuHx 群と Hx 群では病

態形成を反映する内皮の肥厚、筋性化レベルはほぼ同等であった（図 1b）。一般に、C57BL6/J 系統を用いたマウス肺高血圧症モデルでは、Su5416 投与低酸素暴露 3 週マウスと慢性低酸素暴露モデル間では血行動態データに違いは認めにくいことが示唆されるため、今後さらに実験回数を増やしてデータの検証を行っていく方針とする。

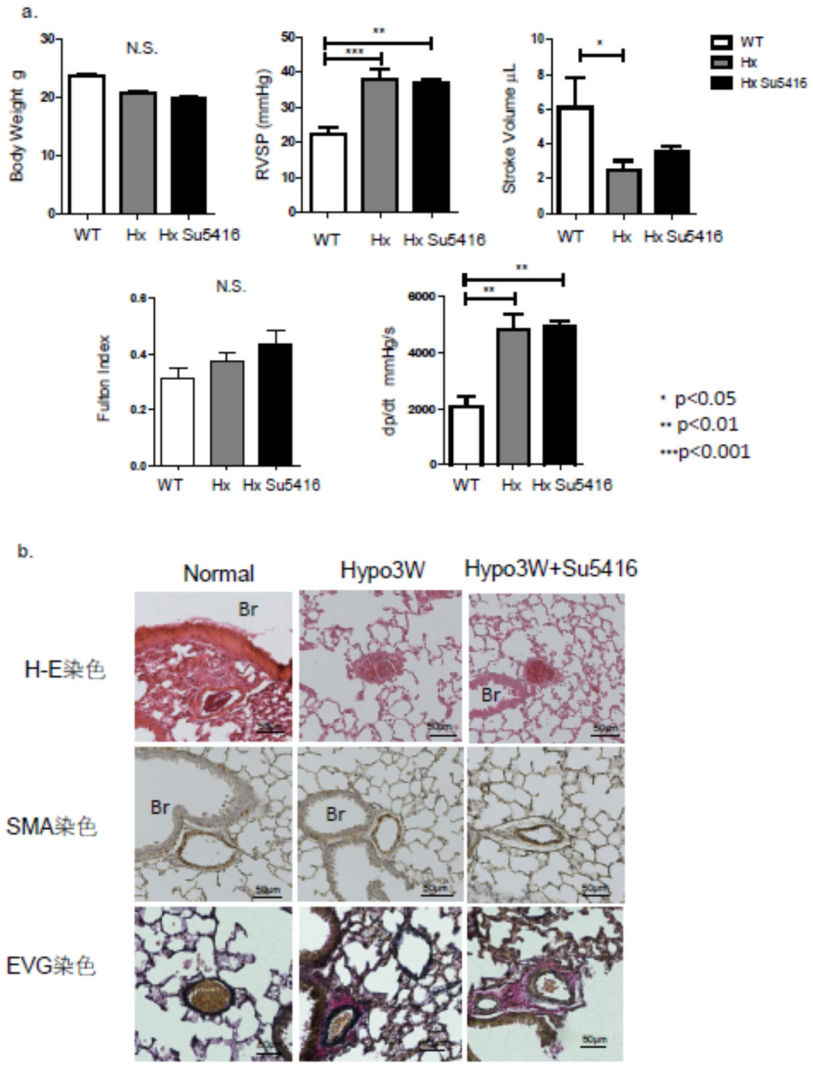


図 1. 肺高血圧症モデルの血行動態データおよび組織学的解析

a） 右心カテーテルを用いた血行動態データ。Bonferroni's Multiple Comparison Test 使用。

b） マウス肺組織免疫染色での組織学的評価。スケールバー：50 μ m。

2. マウス肺を使用した内皮血球転換（以下、EHT）における肺構成細胞の動態と機能解析

前述のように CD31^{+}CD45^{-}cell を血管内皮細胞（PVECs）、Runx-1 /VE-cad^{+}PVECs を EHT 細胞と定義した。これらの細胞特性を複数の表面マーカーを組み合わせ、フローサイトメトリーを用いて解析した。

肺高血圧症モデルにおいて血管内皮細胞（PVECs）PVECs は病勢に一致して 2～3 週にかけて有意に増加し、BrdU 標識を用いて増殖能を評価したところ薬剤投与 7 日目をピークに定常状態に回復していた（図 2a）。次に、まず Runx1 を用いた EHT 陽性肺血管内皮細胞が病勢に一致して 2～3 週にかけて有意に割合が増加していることを確認した。EHT 陽性肺血管内皮細胞の増殖能も同様に 3 週まで上昇傾向であることを確認した（データ未掲載）。また、CD133、CD34、c-kit などの幹細胞マーカーとの組み合わせた陽性率も評価したが、同様にコントロールと 3 週時点の比較で有意な上昇を認めた（図 2b）。

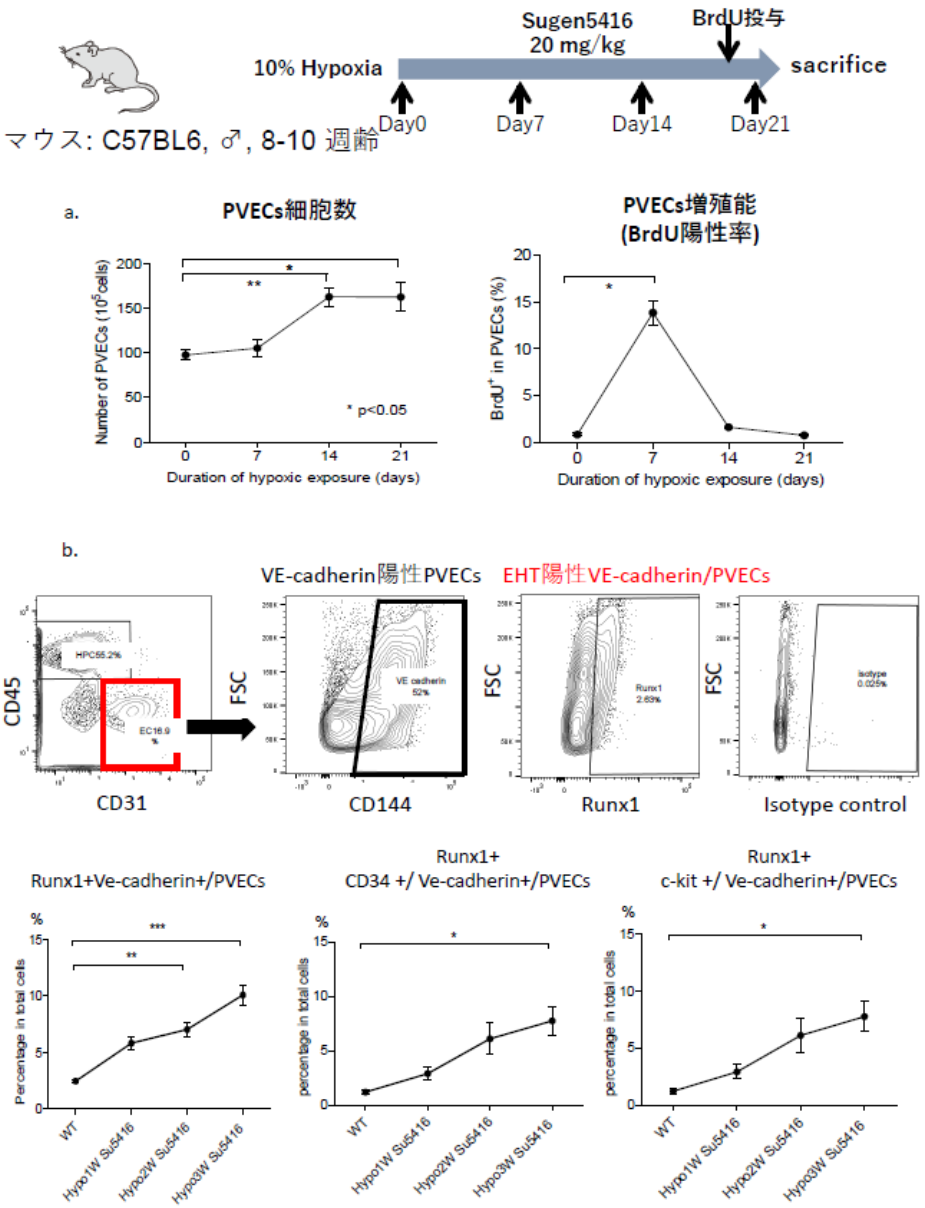


図 2. 肺高血圧症モデルにおける EHT 陽性細胞の推移

a) 肺血管内皮細胞数と増殖能の推移。

b) EHT 陽性細胞の割合の推移と幹細胞マーカー発現の推移。

Bonferroni's Multiple Comparison Test 使用（*p < 0.05、**p<0.01、***p<0.001）。

3. 今後の展望

2020 年度は新型コロナ感染症診療業務への参画により、本研究の遂行が大幅に困難な状況であった。上述のように、血行動態や組織学的解析とフローサイトメトリーでの評価により、肺高血圧症の病勢に一致して高い増殖能、前駆細胞能を保ちながら内皮血球転換＝EHT 陽性細胞が病態形成に参画していることが明らかとなった。これまでに得られた知見を踏まえて、現在は、1. 肺組織切片標本を用いた *in situ* での EHT 陽性細胞の可視化、2. 単離した EHT 陽性肺血管内皮細胞の *in vitro* での前向きな血管新生能の評価や関連する遺伝子・蛋白の網羅的解析、3. 細胞系譜追跡法を用いた EHT 陽性細胞の起源の探索、4. ヒト肺、血液サンプルを用いての網羅的 RNA シークエンス解析等に着手している。

また、今後は肺のみならず、骨髄、脾臓、肝臓など造血に関与する臓器別に EHT 陽性細胞の定量化や局在の探索も進めていく方針である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター幹細胞分子医学教室の岩間厚志教授、大嶋基彦助教、中島やえ子助教である。

文　献

1） Voelkel, N. F. and J. Gomez-Arroyo. "The role of vascular endothelial growth factor in pulmonary arterial hypertension. The angiogenesis paradox." Am J Respir Cell Mol Biol 51(4): 474-484.2014. DOI.10.1165/rcmb.2014-0045TR

2） Morrell, N. W., et al. "Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol 54(1 Suppl): S20-s31. 2009. DOI 10.1016/j.jacc.2009.04.018

3） Suzuki, T., et al. "Isolation and characterization of endothelial-to-mesenchymal transition cells in pulmonary arterial hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol..314(1): L118-l126. DOI.10.1152/ajplung.00296.2017

4） Kissa, K. and P. Herbomel (2010). "Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition." Nature 464(7285): 112-115. DOI.10.1038/nature08761