

新たな三次元的病態解析システムを用いた肺高血圧症の発症メカニズムの解明

武田憲文

東京大学医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

肺高血圧症(PH)は肺動脈平滑筋細胞・内皮細胞の異常増殖による肺動脈狭窄・肺血管抵抗上昇を特徴とする難治性疾患である。この背景には肺組織における血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現上昇が関与していると考えられ、VEGF 発現制御を司る低酸素誘導因子(HIF)の抑制により PH は改善する。その一方で VEGF 受容体阻害薬(Sugen)の投与で PH は増悪するなど、血管新生シグナルの分子機構については不明な点が多い(VEGF パラドックス)。これらは、従来の評価手法(病理切片などの二次元情報)では微小血管新生の評価(描出)が困難であること、従来の PH 病態解析が毒性物質投与によって誘発される炎症惹起性 PH モデルによって行われてきたこと、なども病態評価を困難にしてきた要因であったと考える。

【目 的】

近年、臓器透明化技術の進歩により、特にマウス全脳の三次元構造解析が飛躍的に進歩したが、心血管組織における一細胞解像度での深部解析は困難であった。最近、我々は臓器透明化技術の一つである CUBIC 法を改変し、さらに我々独自の多光子レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* イメージング技術を改良することで、マウス心臓・肺葉内の微細構造を全層(数 mm)かつマルチスケール(1 細胞解像度まで)で三次元視覚化することに成功した。過去には評価困難であった PH における肺毛細血管網の三次元高解像度描出を可能とする可能性があるため、本課題ではその PH 形成過程における三次元時空間的な変化の詳細を明らかとするとともに、それらの特徴づける新たな分子機構の探索とその治療応用について検討する。

【方 法】

(1)臓器透明化技術の一つである CUBIC 技術(改変)と多光子顕微鏡を用いて、マウス肺高血圧症モデル(低酸素負荷モデル、*Alk* ヘテロ欠損マウス、VEGF 受容体阻害薬・Sugen 投与モデル)での PH 形成過程における三次元時空間的な変化を観察する。(2)上記で明らかとなった現象を特徴づける分子機構の探索・解明とその治療応用について検討する。

【結 果】

軽症～中等度までの PH を呈する、低酸素負荷群および遺伝的 PH モデルマウス *Alk*^{+/−} 群では、病初期に VEGF の発現上昇とともに、従来の病理切片では検出困難であった肺末梢側へ伸展する特徴的な微小血管増生を視覚化できた。その一方で、低酸素+VEGF 阻害薬(Sugen)負荷の急性重症 PH モデルでは、VEGF 上昇および微小血管増生ともに欠落していた。遺伝子発現解析と照合しこれらが血管新生促進因子 X の発現に依存した現象であり、軽症 PH または遺伝性 PH の初期に特徴的な病態で、PH 発症・進展に抑制的な(代償的な)変化である可能性を疑った。

次に、この微小血管増生および X の PH における役割について検証するため、肺内皮細胞特異的 X ノックアウトマウスを作製し、低酸素負荷による PH 病態を解析したところ、低酸素下でも VEGF 発現増加が抑制され、微小血管増生を来すことなく PH 病態が増悪した。また、内皮細胞において X の発現を増加させることが知られている薬剤を低酸素負荷 PH マウス

に投与したところ、*Vegfa* の発現は増加し、より顕著な微小血管新生を認め、PH が改善した。

【考 察】

代償的微小血管新生が存在し、その制御には因子 X-VEGF 経路が大きく関与している可能性が示唆される。しかしながら、PH モデル動物は人為的な生物モデル(低酸素惹起、炎症惹起物質投与)が多く、ヒト遺伝性肺動脈性肺高血圧症 (HPAH)の病態の反映という点では、適正な動物モデルはほぼ存在しない。我々は、ヒト特発性肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子の大半を占める *BMPR2* のうち、浸透率が高く、さらに臨床的に重症化の経過をたどる遺伝子変異 (p.Tyr247X) について、CRISPR-CAS9 システムを用いてノックイン・マウス作製に成功している。今後、この新規 PH マウスを用いた解析も進め、過去の PH マウスモデルとの比較も行いながら、PH の病態解明および新規治療標的の探索する予定としている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

PH 発症過程の血管新生シグナルの分子機構の一部を明らかにすることができた。因子 X-VEGF 経路を介した PH 治療薬は過去には存在せず、新規の PH 治療ターゲットとして期待される。