

時空間的マルチスケールイメージングによる難治性循環器疾患の病態解明

藤原隆行

東京大学医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

薬物治療やデバイス治療で予後が改善しつつある心血管疾患において、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) や大動脈瘤・解離症候群 (TAAD) など以前予後不良な疾患も存在する。これら 2 つの疾患群は、遺伝子異常によって発症することが知られているが、その病態に対する理解は不十分であり、薬物治療の選択肢は限定されている。

従来の分子生物学的手法では、二次元組織切片では複雑な血管形態の正確な理解が難しいこと、ヒト遺伝子変異を反映しない人為的誘導モデルが多いこと、実際のヒト組織を用いた病態仮説の検証が困難であること、などの障壁が存在し、PAH および TAAD の基礎病態研究における大きな妨げとなっていた。

【目 的】

ヒト疾患家系で認められた遺伝子変異 (PAH: *BMPR2* 変異、TAAD: *MYH11* 変異) をマウスに導入し、生理的な動物モデルの確立を試みる。またマウス臓器三次元可視化システムの確立・改良を推し進め、遺伝子変異導入により確立した PAH・TAAD モデルマウスの解析を行い、従来の手法では知りえなかった PAH・TAAD における血管リモデリング像の解明を推し進める。また動物モデルにおいて示された病態仮説について、ヒト検体を用いた検証を行う。

【方 法】

複雑な血管形態の描出のため、組織透明化技術 CUBIC¹ および多光子顕微鏡を用いて三次元可視化システムの確立を試みる。また過去に報告されているヒト疾患家系で認めた遺伝子異常 (PAH: *BMPR2*^{Y247X/+})、TAAD: *MYH11*^{L1264P/+}) を遺伝子導入技術 CRISPR-Cas9 を用いてマウスに導入し、より生理的なモデル作成を試みる。また手術時のヒト肺ならびに大動脈検体を採取し、動物モデルで得られた知見の検証を試みる。

【結 果】

組織透明化技術 CUBIC ならびに多光子顕微鏡を用いた三次元可視化システムを確立²⁾し、肺血管・大動脈の三次元構造を臓器全体から微細構造に至るまで描出することに成功した。この三次元可視化システムを用いて、従来のモデルである低酸素負荷 PAH モデルマウスにおいて、代償的血管新生が引き起こされることを発見し、この血管新生像は血管新生因子である肺内皮細胞における PGC-1 α の発現と相関していた。または肺内皮細胞特異的 PGC-1 α ノックアウトマウスでは、低酸素負荷 PAH モデルにおいて血管新生像が抑制されるとともに PAH は増悪するのに対し、PGC-1 α 作動薬である Baicalin の投与により血管新生反応は増強、PAH は改善し、低酸素負荷 PAH における代償的血管新生は肺内皮細胞 PGC-1 α により制御されることが示された³⁾。

またヒト PAH 家系で認めた変異 (*BMPR2*^{Y247X/+}) を CRISPR-Cas9 を用いてマウスに導入 (*Bmpr2*-KI マウス) したところ、右室圧上昇は認めず、PAH 発症には至らなかった。しかしながら早期の PAH においてみられる血管中膜・平滑筋の肥厚や、その要因となるエンドセリン 1 の発現上昇を認め、PAH 発症の前段階である可能性が示唆された。そこで先の結果より従来

の低酸素負荷 PAH モデルマウスで代償的血管新生に関与すると考えられた PGC-1 α を、*Bmpr2*-KI マウスにおいて肺内皮特異的にノックアウトさせたところ、PAH は増悪した。また中膜・内膜増殖や叢状病変といったヒト PAH 重症病変で見られる病理像を認め、三次元解析でも叢状病変と考えられる像の描出に成功し、生理的な PAH モデルの確立に成功した。このマウスにおいてシングル核 RNA-seq を施行したところ、野生型マウスと比較して異なる複数の内皮細胞集団を認めた。疾患特異的内皮細胞の亜集団においては、DNA 細胞老化や炎症反応亜集団に関連する遺伝子群の有意な上昇を認め、病態に大きく関与していると考えられた。そのなかでも CD74 はすでにヒト PAH の肺組織において上昇が認められていた因子であるが⁴⁾、本マウスモデルにおいても有意に上昇しており、本マウスモデルのモデルとしての妥当性を実証するとともに、PAH に対する新規治療ターゲットとして期待が持たれる結果が得られた。今後は CD74 のリガンドである MIF (Macrophage migration inhibitory factor) 阻害薬の投与を行い、PAH 新規治療標的としての検証を行う予定である。

TAAD においてはヒト疾患家系で認めた変異 (*MYH11*^{L1264P/A}) を模した変異 (*Myh11*-KI マウス: *Myh11*^{L1261, Q1262del/A}) の導入に成功した。このマウスでは上行大動脈瘤を自然発症し、大動脈平滑筋の異常構造を認め、新規 TAAD モデルマウスとしての確立に成功した。RNA-seq では DNA 修復に関連する遺伝子群の有意な低下を認め、活性酸素種の上昇とともに DNA 損傷マーカーである γ H2.AX の発現が上昇していることより、DNA 損傷 (Double strand brake) がその病態に大きく関与する可能性が考えられた。さらに DNA 修復因子のなかでも特に *Xrcc6* の低下が顕著であり、その意義を解明すべく、*Xrcc6* 欠損マウスの作成のため、CRISPR-Cas9 を用いて *Xrcc6* flox マウスを作成した。今後はこの *Xrcc6* flox マウスと平滑の特異的に Cre タンパクを発現する Sm22- α -Cre マウスを掛け合わせて平滑筋特異的 *Xrcc6* 欠損マウスを作成し、大動脈瘤進展における役割について検証を行う予定としている。

さらにすでに TAAD 治療薬として用いられているロサルタンを *Myh11*-KI マウスに投与したところ、活性酸素種および γ H2.AX の発現が軽減しており、大動脈瘤は改善した。ロサルタンが著効した機序については現在不明であるため、大動脈 RNA-seq などを施行し、今後改善機序について解明を推し進めていく予定としている。

【考 察】

ヒト疾患家系における遺伝子変異の導入およびそのほかの遺伝子変異の組み合わせにより、新規 PAH および TAAD モデルマウスの作成に成功した。新規 PAH モデルマウスにおいては三次元的な病態像の描出に成功し、またシングル核 RNA シーケンスより、炎症反応関連遺伝子群の有意な発現上昇を認めた。そのなかでも特に CD74 はヒト PAH 肺において発現上昇していることが報告されている因子であり、PAH の新規治療標的として期待される。今後は CD74 のリガンドである MIF の阻害薬を用いて、PAH の治療標的としての検証を行っていききたい。

また新規 TAAD モデルマウスにおいては、RNA シーケンスにより DNA 修復因子群の有意な発現低下、活性酸素種および DNA 損傷マーカーである H2.AX が発現上昇していた。DNA 修復関連因子については特に *Xrcc6* の発現低下に我々は着目し、意義解明のために *Xrcc6* flox マウスを作成した。今後は平滑筋特異的 *Xrcc6* 欠損マウスを作成し、TAAD 病態進展における DNA 修復機構の関連について解明を推し進めていきたい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

難治性血管疾患において、新規の手法や、より生理的な疾患動物を用いることにより、過去には知りえなかった血管リモデリング様式の解明やその背景に存在する分子メカニズムを解明し、新規治療薬開発につながる研究であると考えられる。また本研究において確認された、PAH における慢性炎症の存在、TAAD における活性酸素種および DNA 損傷の上昇とそれに引き続く細胞老化が、病態進展のキー現象と考えられ、これらの制御が新規治療法開発につながる可能性が示唆された。

【参考・引用文献】

1. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization, Tainaka K, et al. Cell. 2014;159:911-24
2. Three-Dimensional Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice. Fujiwara T, et al.

Circulation. 2021;144:1452-55

3. PGC-1 α -mediated angiogenesis prevents pulmonary hypertension in mice. Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Katoh M, Maemura S, Suzuki T, Takiguchi H, Yanase T, Kubota Y, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Nishimura S, Komuro I. JCI Insight. 2023 Sep 8;8:e 162632.
4. Proinflammatory Signature of the Dysfunctional Endothelium in Pulmonary Hypertension. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor/CD74 Complex. Le Hiress M, Tu L, Ricard N, Phan C, Thuillet R, Fadel E, Dorfmueller P, Montani D, de Man F, Humbert M, Huertas A, Guignabert C. Am J Respir Crit Care Med. 2015;192:983-97.