

研究報告書

「内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中岡 良和

1. 研究のねらい

生活習慣の欧米化で、本邦でも生活習慣病を背景とした虚血性心疾患が増加の一途にある。虚血性心疾患での冠血管新生には、胎生期の冠血管発生と同様の分子機序が一部は共有されていると考えられ、虚血性心疾患に対する革新的な新規治療法開発を考える場合には胎生期の冠血管発生の詳細な解明が必要である。胚発生期には最初は心筋細胞に酸素や栄養物は受動的拡散で供給されるが、心臓の成長で心室壁厚が肥厚するとともに冠血管が形成され、冠血管による供給へ移行する。よって、心臓発生に冠血管は必須であるが、冠血管内皮の発生起源とそれを制御する分子機構は不明であった。

そうした状況で、Stanford 大学のグループは冠動脈内皮と冠静脈内皮はともに右房に隣接する静脈洞の内皮細胞が遊走して心室に進入する直前に脱分化して、心室筋内の未知のシグナル機構で心外膜直下を走行する血管は冠静脈に、一層内側の心筋層内を走行する血管は冠動脈となると報告した(Red-Horse et al. *Nature* 464, 549, 2010)。また、Albert Einstein 医科大学のグループは冠動脈内皮の起源は心内膜内皮に依存し、その血管新生は心筋から分泌される VEGF-A が心内膜細胞に発現する VEGFR2 に作用することが必要と報告した(Wu et al. *Cell* 151, 1083, 2012)。一方、冠静脈形成の分子機構は全く不明であったが、申請者らは心筋から分泌される血管新生因子 angiopoietin-1(Ang1)が冠静脈形成に必須である可能性を見出していた。以上より、胎生期の心臓発生で冠動脈と冠静脈の起源はそれぞれ心内膜内皮と静脈洞内皮にあり、心筋由来の異なる血管新生因子が冠動脈と冠静脈の形成を制御する可能性が考えられる。胎生期の心臓発生での冠血管新生の制御機構を解明して、さらに成体での虚血性心疾患に対する新規治療法に敷衍することが第 1 の狙いである。

また、肺高血圧症のような血管の慢性炎症が背景にある難病で、IL-6 などの炎症シグナルに対して Ang1 を介した内皮細胞を起点としたシグナルが拮抗して恒常性破綻を防ぐ可能性が近年示唆されている。そこで Ang1 を介した内皮保護シグナルと IL-6 シグナル、そしてこれら 2 つのシグナルのクロストークに焦点を当てて、肺高血圧症に対する新しい治療法を開発することが第 2 の狙いである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明を目指して、まず胎生期の冠血管新生機構の解明に取り組んだ。心筋細胞由来 Ang1 が胎生期の心臓での血管新生で担う役割を解明するため、心筋特異的 Ang1 欠損マウス(Ang1CKO)を作製した。Ang1CKO マウスは CD31 の免疫組織学的解析で心外膜直下の血管、すなわち冠静脈の形成不全を呈することが示唆された。Ang1CKO マウスで形成不全を来す血管が冠静脈かを確認

するため、静脈マーカーの APJ, EphrinB4, COUP-TFII の発現状態を免疫組織染色、in situ hybridization、動脈内皮、静脈内皮特異的 lacZ ノックインマウスでの X-gal 染色で検討したところ、Ang1CKO マウスは冠静脈形成不全を呈することが明らかになった。また、心臓に隣接する静脈洞内皮細胞のうち、APJ 陰性の未分化内皮細胞が Ang1 の作用で心臓内に誘引されて進入して、冠静脈形成がなされることが経時的な免疫組織学的解析で明らかとなった。また、Ang1 は未分化内皮細胞に作用して静脈分化を促進することも明らかとなった。以上の成果は 2014 年 7 月 29 日 *Nature Communications* 誌に掲載された。さらに成体での薬剤誘導性心筋細胞特異的 Ang1 欠損マウス (Ang1ICKO) を作製して、急性心筋梗塞を誘導して Ang1 欠損の影響を検討したが、野生型と Ang1ICKO では心筋梗塞サイズ、梗塞後の心機能、梗塞後の血管新生に有意な差異を認めなかった。

また、内皮保護因子の Ang1 シグナルと拮抗する炎症性サイトカインの interleukin-6 (IL-6) が血管病の肺高血圧症の病態を促進する分子機構の解明にも取り組んだ。低酸素誘発性肺高血圧症モデルマウスの系を用いて、低酸素刺激で主に肺動脈内皮細胞から分泌される IL-6 が肺組織で Th17 細胞を誘導すること、Th17 細胞から分泌される IL-21 が肺内のマクロファージを M2 マクロファージ優位な状態に極性化すること、M2 マクロファージ由来の液性因子が肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進して肺高血圧症の病態形成に働くことを明らかにした。以上の成果は 2015 年 5 月 4 日 *PNAS* 誌電子版に掲載された。今後、IL-6 と IL-21 に対する生物学的製剤が新しい肺高血圧症の治療薬に発展することが期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A 「胎生期の冠血管新生機構の解明」

心筋細胞由来 Ang1 が胎生期の心臓での血管新生で担う役割を解明する目的で *Ang1^{fllox}* マウスと *α-MHC-Cre* トランスジェニックマウスを交配して心筋特異的 Ang1 欠損マウス (Ang1CKO) を作製すると、Ang1CKO は E12.5-14.5 で胎生致死を呈した。研究開始時点で、

- ① 野生型の心外膜直下に観察される CD31 陽性像が Ang1CKO では著明に減少すること
- ② ホールマウント免疫染色後に薄切すると 2 層の CD31 陽性冠血管像で、外側の冠静脈と考えられる血管が特異的に Ang1CKO では心臓背側から側壁で著減していること
- ③ 心外膜直下に見られる 2 層の CD31 陽性血管像で内側の冠動脈と考えられる血管数に野生型と Ang1CKO で有意差は認めないこと
- ④ 免疫染色での静脈マーカー APJ の発現解析、そして静脈内皮特異的に *lacZ* 遺伝子を発現する *EphB4-lacZ* ノックインマウスとの交配マウスでの Xgal 染色解析から、Ang1CKO で APJ 陽性、EphB4 陽性の冠静脈が欠損すること (図 1a-l の写真, q, r: 定量)

を見出して、心筋由来 Ang1 が冠静脈形成に必須の役割を担う可能性が示唆されていた。

そこで Ang1CKO での冠静脈欠損を更に確認するため、静脈分化に必須の転写因子 *COUP-TFII* の発現を in situ hybridization で検討すると、野生型では *COUP-TFII* の発現

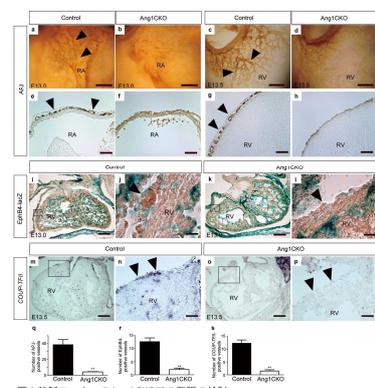


図 1 静脈マーカーの Ang1CKO での発現の検討

が見られたが Ang1CKO では欠損していた(図 1m-p, s:定量)。また、インク注入での冠動脈造影と動脈内皮特異的に *lacZ* 遺伝子を発現する *EphrinB2-lacZ* ノックインマウスと Ang1CKO と交配したマウスで X-gal 染色すると、Ang1CKO マウスで冠動脈形成に異常を認めなかった。

Ang1 の受容体である *Tie2* 遺伝子に *lacZ* 遺伝子をノックイン(KI)した *Tie2-lacZ* KI マウスを用いて、心臓に冠血管が入る直前の E10.5 に *Tie2* の発現がどこに見られるかを検討すると、*Tie2* の発現は静脈洞の内皮に強く観察された(図 2a,b)。右心房に隣接する静脈洞の内皮が心臓へ進入して冠血管を形成するとする Red-Horse らの報告(*Nature*. 2010;464:549-553)を踏まえて、E10.5 の野生型及び Ang1CKO から心室と心外膜を単離して、E10.5 の *Tie2-lacZ* ノックインマウスから単離した静脈洞と心房とを密着させて器官培養した。*Tie2* 陽性(X-gal 染色陽性)内皮細胞は野生型の心室へは進入したが、Ang1CKO の心室への進入は有意に減少していた。よって、心室筋由来 Ang1 は静脈洞の *Tie2* 陽性内皮細胞を心臓内へ誘引する可能性が示唆された(図 2c-f: X-gal 染色像、g 定量結果)。

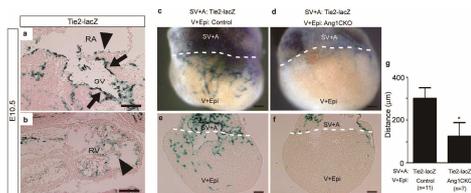


図2 心筋由来Ang1はTie2陽性静脈洞内皮を心臓内へ誘引する

更に免疫組織染色による検討で、E10.5 のマウス胚の静脈洞には APJ 陽性と APJ 陰性の内皮細胞が混在することを見出した。静脈洞の APJ 陽性、APJ 陰性の 2 種類の細胞集団で、APJ 陰性 CD31 陽性の未分化内皮細胞が E10.5~E11.5 には右心房へ進入、さらに E12.5 には心室へと進入して、その後の心筋由来 Ang1 の作用により APJ 陽性静脈内皮細胞に分化することが、経時的に詳細な免疫組織学的解析を行うことで明らかとなった(図 3)。

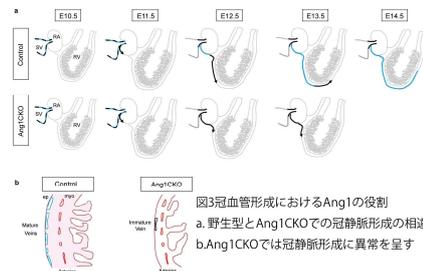


図3冠血管形成におけるAng1の役割
a.野生型とAng1CKOでの冠静脈形成の相違
b.Ang1CKOでは冠静脈形成に異常を呈す

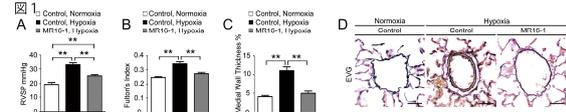
また、ES 細胞由来 Flk1(VEGFR2)陽性血管内皮前駆細胞の未熟な内皮細胞分化系を用いて、Ang1 が静脈分化誘導を促進するか検討した。ES 細胞由来 Flk1 陽性血管内皮前駆細胞に VEGF+cAMP を添加すると動脈内皮マーカーEphrinB2 の発現が誘導されるが(Yamashita JK et al. *Nature*. 2000;408:92-96)、この系に Ang1 活性化アナログ(COMP-Ang1)を添加すると EphrinB2 の誘導は抑制されるのに対して静脈マーカーCOUP-TFII の発現が逆に誘導されて、Ang1 は静脈分化を促進して動脈分化を抑制することが示唆された。また、Ang1 による静脈分化は *Tie2* のノックダウンでキャンセルされることも分かった。以上の研究成果をまとめて 2014 年 7 月 29 日に *Nature Communications* 誌で報告した。

研究テーマ B 「心筋梗塞後の血管新生での Ang1/Tie2 シグナルの役割の解明」

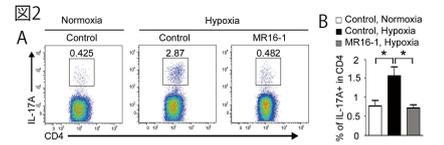
成体での薬剤誘導性心筋細胞特異的 Ang1 欠損マウス(Ang1CKO)を作製して、急性心筋梗塞を誘導して Ang1 欠損の影響を検討した。しかし、野生型と Ang1CKO では心筋梗塞サイズ、梗塞後の心機能、梗塞後の血管新生に有意な差異を認めず、進展させられなかった。

研究テーマ C 「Ang1/Tie2 シグナルと interleukin-6(IL-6)シグナルに着目した肺高血圧症の病態形成機構の解明」

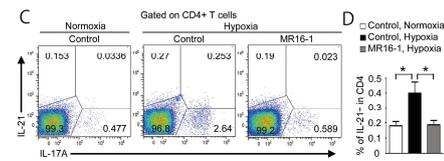
本研究を開始する時点で、Ang1/Tie2 シグナルは血管難病の1つ肺高血圧症の発症を抑制する内皮保護シグナルとして機能する可能性が報告されており(Kugathasa et al. *J. Exp Med.* 206-2221, 2009)、一方で炎症性サイトカインの IL-6 は肺高血圧症病態を促進する可能性に関する報告がなされていた(Steiner et al. *Circ. Res.* 104, 236, 2009)。研究開始時にマウスを空気中の酸素濃度(21%)より低い酸素濃度(10%)に曝露して作製する低酸素負荷誘発性肺高血圧症(Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension; HPH)マウスの肺で、①IL-6 が低酸素負荷後2日目をピークに肺細小動脈の内皮細胞で強く発現誘導されること、②HPHマウスに抗IL-6受容体モノクローナル抗体MR16-1を投与するとコントロール抗体の投与群に比べてHPH病態が有意に抑制されることを見出していた(図1A-D)。



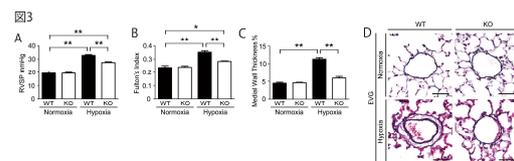
ヘルパーT細胞の1サブセットのTh17細胞が関節リウマチなどの自己免疫疾患の病態で重要であることが報告されていたが、肺高血圧症でのTh17細胞の役割は不明であった。そこでHPHマウス肺でのTh17細胞の動態とTh17細胞の産生するサイトカインを解析した。HPHマウス肺では低酸素負荷後3日目に、Th17細胞が著明に増加して



(図2A,B)、さらにTh17細胞が主に産生する炎症性サイトカインのIL-17やIL-21が共に低酸素負荷により肺組織での発現が有意に増加していた。また、HPHマウス肺において低酸素負荷で増加するTh17細胞、IL-17, IL-21の動態は、MR16-1投与で有意に抑制された(図2C,D)。



そこでHPHマウスに抗IL-17中和抗体を投与してHPH病態への影響を検討すると、IL-17阻害ではHPH病態形成に有意な阻害効果を認めなかった。一方、IL-21受容体ノックアウト(IL-21RKO)マウスでは野生型マウスに比べてHPH病態が有意に抑制されている(図3:A右室収縮期圧、B右室/左室重量比、C中膜肥厚係数)、IL-6の下流でIL-21がHPH病態形成に重要である可能性が示唆された。



HPHマウス肺ではM2マーカーのFizz1やMrc1などの発現が優位なM2マクロファージが増えて、M2マクロファージ極性化がHPH病態で重要とされていたが(Vergadi et al. *Circulation* 123:1986, 2011)、そのM2極性化機構は不明であった。抗IL-6受容体抗体を投与されたマウス肺ではコントロール抗体を投与されたマウスに比べて肺組織のM2マクロファージの集積が有意に抑制されて、またIL-21RKOマウス肺では野生型マウス肺に比してHPH病態でのM2マクロファージの集積が有意に抑制されていた。また、マウス肺から気管支肺泡洗浄で単離した肺泡マクロファージをIL-21添加条件で*in vitro*培養するとM2マクロファージマーカーの発現が誘導された。以上より、IL-21がHPHマウスでのM2マクロファージ極性化に重要であることが示唆された。

次に肺高血圧症病態で最終的に観察される肺動脈平滑筋細胞の増殖、中膜肥厚と上記シグナルとの関連を検討した。ヒト肺動脈平滑筋細胞(HPASMC)を血清除去後、IL-6、IL-6と

遊離型 IL-6 受容体の共刺激、または IL-21 で刺激したが、何れでも増殖反応は見られなかった。一方、マウス肺から気管支肺胞洗浄で単離したマクロファージを IL-21 処理して M2 極性を誘導した細胞を HPASMC と共培養すると HPASMC の増殖が誘導された。また、肺移植を受けた特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 患者での IL-21 と M2 マクロファージマーカー (Mrc1 と Arg1) の発現を検討したところ、IPAH 患者肺では非肺高血圧症患者肺に比べて有意に IL-21 と M2 マクロファージマーカーの発現が亢進していた (図 4)。

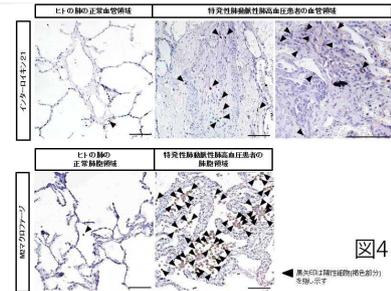


図4

以上より、主に肺動脈内皮細胞から分泌される IL-6 は肺組織で Th17 細胞を誘導して、Th17 細胞から分泌される IL-21 が肺内のマクロファージを M2 極性化することで肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進して肺高血圧症の病態形成に関与

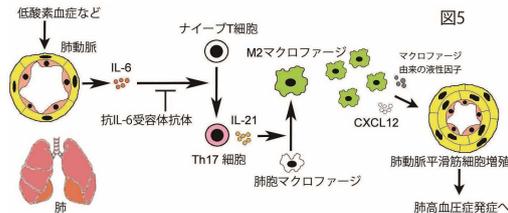


図5

することが明らかとなった (図 5)。IL-6 による肺高血圧病態形成機構の解析は予定通り進捗して、研究成果は 2015 年 5 月 4 日 *PNAS* 誌電子版に掲載された (*Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(20): E2677-86, 2015)。一方、Ang1/Tie2 シグナルと IL-6 による肺高血圧病態のクロストークの検討は十分に進捗をはかれなかった。

3. 今後の展開

研究テーマ A では心臓発生における冠血管形成で Ang1 が特に未分化内皮を心臓に遊走させて、静脈内皮に分化する作用を担うことを明らかにした。未分化内皮細胞に対して静脈分化を誘導するシグナルについては不明な点が非常に多く、静脈化に重要な役割を果たすことが明らかになった Ang1 の機能解明を今後進めると、血管新生の効率化に繋がれると期待される。

また、研究テーマ C では難病の肺高血圧症に対して新たに炎症性サイトカインの IL-6 や IL-21 を標的とした生物学的製剤 (抗体医薬) が治療薬になる可能性が示唆されている。肺高血圧症に対する薬物治療はこの 10 年間の発展は目覚ましいものがあるが、何れの薬剤も平滑筋細胞の弛緩・収縮制御を標的とした薬剤ばかりである。そうした状況で炎症が肺高血圧症の病態促進の鍵を握ると、学会でも考えられており我々の成果は注目を集めている。近い将来にヒトの難治性肺高血圧症患者を対象とした臨床試験を立ち上げて、炎症性サイトカインを標的とする新しい肺高血圧症の治療法の開発へ繋げたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

- 心臓の胎生期の冠血管形成の分子機構でこれまで明らかでなかった冠静脈の形成機構について、心筋由来の Ang1 が静脈洞内皮を心臓内へ誘引して静脈分化も促すことで制御される分子機構を明らかにした。
- 成体マウスで心筋梗塞モデルを作製して、この胎生期の冠血管形成のメカニズムを敷

衍することは難しい結果が得られた。仮説と異なる結果が出た場合の対処を綿密に考えておく必要があるが、このテーマについてはあったと反省している。

- ・ 低酸素誘発性肺高血圧症マウスで、低酸素刺激により肺動脈内皮から分泌される IL-6 が Th17 細胞/IL-21/M2 マクロファージ極性を介して肺高血圧症病態を促進することを解明した。IL-6 や IL-21 のシグナルを阻害する生物学的製剤が新しい肺高血圧症の治療法になる可能性が示唆されて、近い将来に難治性の肺高血圧症患者を対象にした臨床試験でこれらの薬剤の有効性を検討することで、新しい肺高血圧症の治療法開発に繋がる可能性がある。
- ・ 科学技術の社会への情報発信を目的として上記2つの研究成果をプレスリリースしたところ、新聞報道(2014年7月23日、7月24日)や TV ニュース(2015年5月5日)で取り上げられ、社会から一定の反響を得ることが出来た。
- ・ 研究テーマ「内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明と制御」で掲げた3つのテーマのうち、2つで論文をはかり成果をまとめることが出来て、研究目的の70%程度を達成したと考える。未達成の部分は、今後の課題として取り組みたい。
- ・ 研究の実施体制は、一緒に大学院生 2 名と実験を進めた。また、さきがけ研究期間の途中で独立ポジションを得る幸運に恵まれたが、阪大循環器内科の大所帯でシェアしていた研究設備から離れることで、多数の実験機器を購入する必要が生じた。こうした研究費面での困難は春日雅人・総括と JST から適切な追加支援、増額支援のサポートを頂けたため、何とか乗り切れた。その他の研究費執行は問題なく遂行した。
- ・ 本さきがけ研究の成果が認められ、厚生労働省難治性血管炎研究班の大型血管炎分科会・分科会長を 2018 年から拝命する予定であり、本さきがけ研究は私の研究者としての飛躍につながったと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は、胎生期の心臓発生での冠血管新生の制御機構を解明して、成体での虚血性心疾患に対する新規治療法に敷衍すること、および、肺高血圧症に対して内皮保護シグナルと炎症シグナルのクロストークに焦点を当てて、肺高血圧症に対する新しい治療法を開発することが目的である。心筋特異的 Ang1 欠損マウス(Ang1CKO)を用いて、未分化内皮細胞からの冠静脈形成過程に Ang1 が重要な働きをしていることについて論文報告したが、成体での急性心筋梗塞モデルでの検討結果では Ang1 の効果が認められなかった。一方、IL-6 および IL-21 が肺高血圧症の病態形成に働くことを明らかにして論文発表した。今後、IL-6 と IL-21 に対する生物学的製剤が新しい肺高血圧症の治療薬に発展することが期待される。このようにさきがけ研究をまとめた論文を発表することが出来ている。

さきがけ研究期間の途中で国立循環器病センターへの異動があり、新たに研究室を主宰することになった。このように着実に成果を積み上げ、新しいポジションも得て、今後の飛躍が十分期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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-Takahara 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)
2. Arita Y, **Nakaoka Y.***, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Hashimoto-Kataoka T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. *Nature Communications* 2014 Jul 29; 5: 4552. doi: 10.1038/ncomms5552. (*corresponding author)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者: 中岡 良和、片岡 崇弘

発明の名称: 肺高血圧症治療薬およびそのスクリーニング方法

出 願 人: 国立大学法人大阪大学

出 願 日: 2014/9/8

出 願 番 号: 特願2014-181860

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(主要な学会発表)

1. 中岡良和. 炎症性シグナルに焦点を当てた肺高血圧の病態形成機構. 第1回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 シンポジウム「PHに対する最新基礎研究の成果」(2016年10月2日京王プラザホテル)
2. Nakaoka Y. "Angiopoietin-1 derived from myocardium is essential for coronary vein formation in the developing heart" 日本血管生物医学学会春季特別シンポジウム・招請講演(2015年5月13日大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂)
3. Nakaoka.Y. The role of angiopoietin-1 in coronary vessel formation in the developing heart. Symposium on Arterial Disease. The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014) (2014年4月14日、京都みやこめっせ)

(受賞)

4. 大阪大学総長奨励賞「冠血管形成の分子機構の研究」2014年7月

(プレスリリース)

5. 「心不全につながる難病 肺高血圧症の発症メカニズムを解明」

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150505/>

2015年5月1日大阪大学・JST共同プレスリリース

⇒2015年5月5日NHKのTVニュースで放送

6. 「心臓の血管新生の新メカニズムを解明～心筋梗塞などの新しい治療法開発へ光～」

http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2014/20140722_1

2014年7月18日大阪大学プレスリリース

⇒2014年7月23日毎日新聞、産経新聞、日経新聞、7月24日朝日新聞の4紙に掲載