

ヒト終末期特発性肺動脈性肺高血圧症と比較した肺血管改築誘発マウスモデルに関する遺伝子発現変動解析

下平佳代子

東邦大学医学部小児科学講座 (大森)

従前, pulmonary arterial hypertension (PAH) の代表的な実験的モデル動物は低酸素や monocrotaline への暴露によるものであるが, これらは肺動脈以外の病変を有するものや薬物への反応がヒト PAH とは異なるものなど, ヒト PAH の病態と一致しない部分も多く含んでいる. われわれはこれまでに, 一般環境内に広く存在している真菌の 1 つである *Stachybotrys chartarum* (*S. chartarum*) をマウスの気管内に反復接種することで, 右室圧の上昇や右室重量の増加を伴った肺動脈内・中膜の肥厚が誘発されることを明らかにした. 今回, PAH 病態解明の一助として, この病理学的・血行力学的にヒト PAH に類似している実験的 PAH モデルマウスの肺組織における遺伝子発現変動を解析し, ヒト idiopathic PAH (IPAH) で報告されている変動様式と比較することから, ヒト IPAH の病態に本質的に関与する遺伝子発現変動を抽出することを試みた.

初めに, 本モデルで使用した *S. chartarum* のヒトへの暴露状況を剖検例を用いて確認した. IPAH 症例と肺動脈病変のない対照例, 各 9 例の肺に含まれる本菌の deoxyribonucleic acid (DNA) 検出頻度は両群ともに差がなく, 本菌 DNA 検出の有無にかかわらず病理組織学的所見も相違がなかった (図 1). この結果から, 本菌は一定の頻度で通常よりヒトの肺に取り込まれている真菌の 1 つに過ぎないことを確認した.

本菌の胞子懸濁液をマウス (DDY・雄・6 週齢) へ経気管的に反復接種 (8 週間・計 12 回) し PAH モデルマウスを作製した. 対照群には懸濁液に用いた培地のみを接種した. 肺組織は最終接種終了後 7 日目に摘出し, 病理組織学的, 形態学的に有意な病変形成の再現性を確認した後 (表 1), 肺組織より精製した ribonucleic acid (RNA) の発現変動様式をマイクロアレイ (GeneChip® Mouse Genome 430 2.0

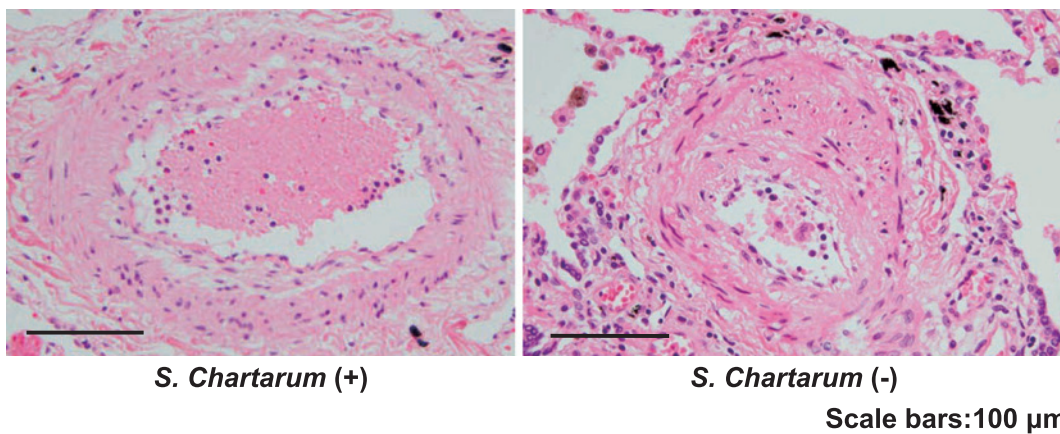


図 1 ヒト idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) の病理組織像 *Stachybotrys chartarum* (*S. Chartarum*) DNA 検出の有無にかかわらず, 著しい炎症細胞の浸潤等の病理組織学的所見の相違はなかった.

表1 肺動脈内膜・中膜の肥厚の程度
組織切片上に観察された肺動脈より計測して算出した肺動脈内・中膜の肥厚の程度は、血管径によらず実験群で有意に増加していた。

肺動脈径	内膜肥厚の程度 Mean ± SD (%)		中膜肥厚の程度 Mean ± SD (%)	
	対照群	実験群	対照群	実験群
50 μm 未満	3.2 ± 1.6	38.4 ± 4.6 **	28.6 ± 2.3	34.9 ± 3.3 **
50-100 μm 未満	1.4 ± 0.8	34.2 ± 3.8 **	23.2 ± 3.1	34.7 ± 3.4 **
100 μm 以上	0.6 ± 0.4	39.6 ± 5.1 **	16.7 ± 2.6	31.2 ± 3.6 **

** : p<0.01

表2 PAH モデルマウス発現変動遺伝子の Pathway 解析

発現上昇	発現低下
Immune System	Axon guidance
Integrin alpha X beta 2 binds JAM-C	Myogenesis
GPCR ligand binding	Signaling by VEGF
Eicosanoid ligand-binding receptors	Integrin cell surface interactions
Mouse JAK2 binds human common beta chain	PDGF binds to extracellular matrix proteins
Hemostasis	I-Smad competes with R-Smad1/5/8 for type I receptor
Endogenous sterols	SOS phosphorylation and dissociation
Vitamin B2 metabolism	Cell-Cell communication
Stat5 tyrosine phosphorylation	Metabolism of nitric oxide
IL7ra is phosphorylated on Y449	Ethanol oxidation
Ubiquitination of phospho-p27/p21	FMO oxidizes nucleophiles
Synthesis, Secretion, and Deacylation of Ghrelin	Apoptotic execution phase
	Aquaporin-mediated transport
	MAPK targets/Nuclear events mediated by MAPKs

PAH : pulmonary arterial hypertension, JAM-C : junctional adhesion molecule-C, GPCR : G protein-coupled receptor, JAK2 : janus kinase 2, Stat5 : signal transducer and activator of transcription, IL7ra : interleukin-7 receptor alpha chain, VEGF : vascular endothelial growth factor, PDGF : platelet-derived growth factor, SOS : son of sevenless, FMO : flavin mono-oxygenase, MAPK : mitogen-activated protein kinase

array ; Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いて解析した。全データは Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) に公開している (Accession number : GSE23178)。発現変動遺伝子の抽出条件には、①シグナル値の有意性 (Flag : Present), ②シグナル比 (Log2 ratio : ±1.3), ③差の有意性 (p value ≤0.05) を設定した。発現上昇・低下していた遺伝子数は各 337・503 であった。発現上昇群の gene ontology (GO) 解析では免疫応答や、修復に関する GO term を多く含む 696 の GO term を検出したが、発現低下群からは有意な GO term を検出しなかった。Pathway 解析では、発現上昇群からは immune system や Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling, hemostasis 等を検出し、発現低下遺伝子からは vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF),

apoptosis などに関する pathway を検出した (表2)。同時に、マイクロアレイによる解析結果の妥当性の評価として、real-time polymerase chain reaction による定量的解析を施行し、2つの解析方法における変動様式とその程度は相違がないことも確認している (図2)。

ヒト IPAH の肺組織での発現変動遺伝子の情報は文献的に集積した。解析に用いられた肺組織は全て移植時に得られた検体であった。公開されているヒト IPAH のマイクロアレイ data は参照し解析を施行したが、IPAH に共通する発現変動を呈する遺伝子はなかった。既報より集積した個々の変動遺伝子が関連する GO と pathway を検索した結果、transforming growth factor beta (TGFβ) や bone morphogenetic protein (BMP) signaling は発現低下、PDGF や VEGF signaling 等の発現上昇を検出した。これらの結果をもとに、PAH モデル動物での発現変動様式と比

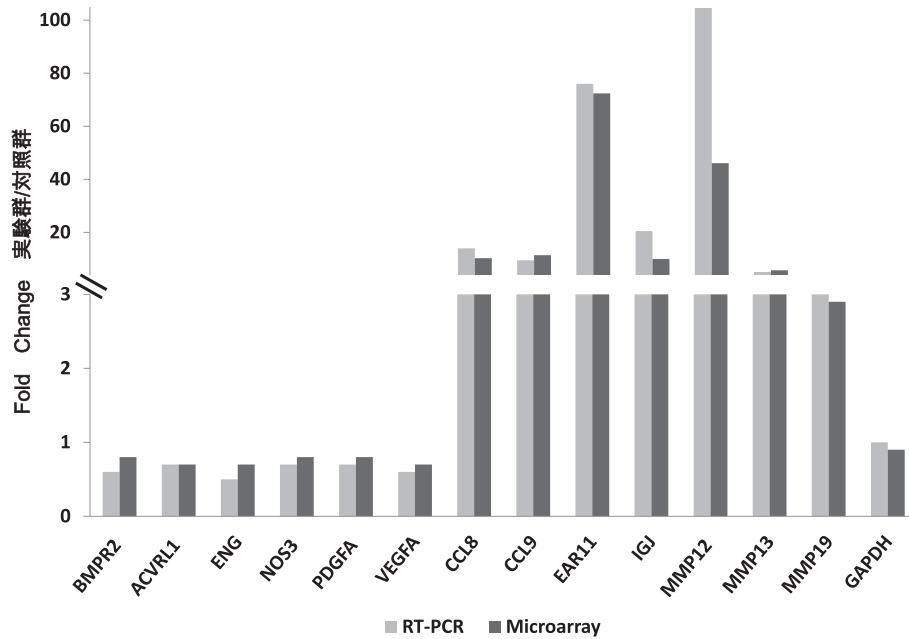


図2 マイクロアレイ法と RT-PCR 法による解析

2つの解析方法より得られた各遺伝子の変動様式とその程度（実験群/対照群）は相違がなかった。

RT-PCR: real-time polymerase chain reaction, BMPR2: bone morphogenetic protein receptor type II, ACVRL1: activin receptor-like kinase 1, ENG: endoglin gene, NOS3: nitric oxide synthase 3, PDGFA: platelet-derived growth factor alpha polypeptide, VEGFA: vascular endothelial growth factor A, CCL8: chemokine ligand 8, CCL9: chemokine ligand 9, EAR11: eosinophil-associated ribonuclease, IGJ: immunoglobulin joining chain, MMP: matrix metalloproteinase, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

較した。

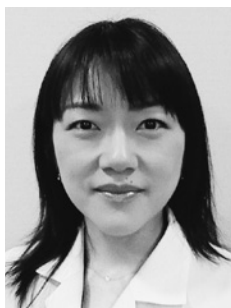
ヒト IPAH と本モデルではシグナル伝達の上流に位置する BMP signaling の他、下流に位置する estrogen receptor signaling, serotonin receptor signaling, JAK/STAT pathway, hemostasis でヒトと変動様式が一致していた。一方、これまでの PAH モデル動物では、本モデルと比較してヒト IPAH と一致する変動が少なく、一致している pathway においても下流に位置するものであった。これより、本モデルのヒト IPAH の病態への高い類似性が示唆された。これらの、ヒト IPAH と本モデルで共通する変動、つまり、実験的に誘発可能な変動を差し引いて、本研究の目的である、ヒトに特異的な変動を呈する pathway を抽出した。その中で特にシグナル伝達の上流に位置する TGFβ の発現低下と wingless-type mouse mammary tumor virus integration site gene family (WNT)/planar cell polarity (PCP) pathway の発現上昇に注目した。両 pathway はともに、発現上昇を呈する Rho/Rho-associated coiled-coil forming

kinase (ROCK) pathway の上流に位置していることから、WNT/PCP pathway の発現上昇がこれに矛盾しない変動様式と言えた。

以上の結果から、WNT/PCP pathway を介した Rho/ROCK pathway の発現上昇がヒト IPAH の病態に深く関与している可能性が示唆された。WNT/PCP pathway は、細胞の形態形成・運動・細胞の増殖や分化に関与し、肺組織の発生に必須である。肺疾患への関与も示唆されているが、その詳細は明らかでない。本研究結果をもとに、本 pathway の肺動脈での発現とその局在、および病態への関連性を検討するため、現在、PAH 症例と肺動脈に病変のない対照の剖検例を用いて免疫組織染色法による検出を行い解析を進めているところである。

本講演の要旨は、*Respir Res* **13**: 103, 2012 doi:10.1186/1465-9921-13-103 に掲載された内容である。

下平佳代子先生 略歴



- 1976年11月 生
2002年3月 東邦大学医学部卒業
第96回医師国家試験合格（医籍登録 第426950号）
4月 東邦大学医療センター大森病院研修医
2004年4月 東邦大学医学部小児科学講座（大森）レジデント
2008年4月 小児科専門医取得（第30240号）
2013年3月 医学博士取得（東邦大学甲第468号）
4月 東邦大学医学部小児科学講座客員講師