

## 論文の内容の要旨

論文題目 *Bmpr2* ノックインマウスを用いた肺動脈性肺高血圧症の発症機序に関する検討

氏名 石井 聡

[序文] 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺動脈内皮細胞のアポトーシス、内皮・平滑筋細胞の異常増殖、外膜の炎症細胞浸潤、血管収縮、血栓など複合的要因による肺血管リモデリングの結果、進行性の肺動脈内腔狭窄をきたし右心不全から死へ至る希少難治性疾患である。血管拡張薬の開発により PAH の予後は飛躍的に改善したが、薬剤治療抵抗性の症例は未だ予後不良であり、肺移植以外有効な根治治療が存在しないのが現状である。そして、慢性的な脳死ドナー不足の課題を抱えるわが国において両肺移植待機期間は約 3 年の長期に及び、移植まで間に合わずに右心不全で亡くなる重症 PAH 患者が後を絶たない。

PAH の原因遺伝子として、2000 年に *BMPR2* (bone morphogenic protein receptor type II) が同定された。脈管・血管新生において重要な役割を担う同遺伝子の変異により、内皮細胞のアポトーシスや平滑筋細胞の異常増殖が生じることが *in vitro* の実験で検証されてきたが、*in vivo* で *BMPR2* 変異から何等かのセカンドヒットを経て進行性の血管リモデリングを生じる過程の詳細については未解明である。臨床の側面においても、*BMPR2* 変異陽性者は非陽性者と比して死亡や肺移植へ至るリスクが高いと報告されており、*BMPR2* 変異から進行期 PAH へ至る機序の解明及び分子メカニズムに基づく新規治療の開発は急務である。

PAH の閉塞性病変の形成にはアポトーシス抵抗性の内皮細胞や平滑筋細胞の異常増殖が関与すると考えられており、悪性腫瘍類似の病態の存在が想定されている。実際 PAH 患者の内皮細胞では、ミトコンドリア機能不全や解糖系の亢進など悪性腫瘍と共通した代謝様式の変化が起きていることが指摘されている。ミトコンドリア生合成や抗酸化応答の主要制御因子である PGC1 $\alpha$  は様々な心血管疾患と関連することが知られるが、PH においても PGC1 $\alpha$  の発現低下が病勢進行と関連する可能性が示唆されている。PGC1 $\alpha$  を含むミトコンドリア生合成制御因子は、PAH の進展において重要な役割を果たすと共に新規治療ターゲットになる可能性があるが、現時点ではデータが不十分であり更なる検証が必要である。

病態機序の解明や新規薬剤の開発を試みる上では生体組織を対象とした研究が必要であるが、PAH 患者において定期的な肺生検は医学的観点から困難であり、唯一採取可能な肺移植時の検体も PAH として終末像かつ薬剤による修飾が加わっている等、ヒト検体を用いた PAH の発症・進展機序の研究には一定の制約を伴う。そこで、ヒトの PAH を体現するモデル動物に関する研究が近年盛んに行われてきた。Sugen 5416/Hypoxia ラットに代表される従来の肺高血圧 (PH) モデル動物が PH の病態解明や治療開発に貢献してきたことは間違いないが、薬剤投与や低酸素環境などにより人為的に PH を誘発したモデルが多く、これらを用いた病態解析や前臨床試験が PH の発症、進展機序や治療反応性を正確に反映するのかという判断すら難しい。そこで今回、CRISPR-Cas9 システムを用いて実際に症例

報告のあるヒト *BMPR2* 遺伝子変異を導入した新規遺伝子改変マウスを作成し、ヒト PAH の病理像を再現するモデルの確立及び PAH における肺血管リモデリング進行の機序の解明を目的として研究を実施した。

[目的] CRISPR-Cas9 システムを用いて、実際に症例報告のあるヒト *BMPR2* 遺伝子変異を導入した遺伝子改変マウスを作成し、PAH の発症過程における *Bmpr2* 遺伝子変異の役割に関して検証する。また、*Bmpr2* 変異に対するセカンドヒットとして、肺高血圧症の一般的な誘発法である慢性低酸素負荷や、ミトコンドリア生合成において中心的役割を担う *Pgcl1a* を肺内皮特異的にノックアウトしたマウスを作成し、ヒト PAH の病理像を再現するモデルの確立、並びに *Bmpr2* 遺伝子変異から進行期 PAH へ至る機序の解明を目指す。

[方法]

### 実験 1. 新規 *Bmpr2* ノックインマウスの作成と表現型解析

既知の *Bmpr2* ノックインマウスとしては *Bmpr2*<sup>R899X/+</sup>マウスの報告があるが、*BMPR2* の細胞質ドメインに変異を有する同マウスは肺高血圧症の表現型としては軽微であることが知られる。そこで、*BMPR2* の機能においてより重要と考えられるキナーゼドメインの変異を有するマウスの作成を検討することとした。実際に症例報告のある変異の中で、若年発症で妊娠時に増悪するなど PAH として一般的な特徴を有し、かつ浸透率が高い *BMPR2* c.741C>A, p.Tyr247Ter を候補として選択した。*BMPR2* の 247 番目の Tyr (tyrosine) はあらゆる種族間で保存されており重要配列である可能性が示唆されることを踏まえ、CRISPR-Cas9 により同変異をマウスに導入した。作成した *Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスを用いて、血行動態や肺組織など PH の表現型解析を実施した。解析においては 6 カ月齢の個体を用いた。

### 実験 2. *BMPR2* 変異から進行期 PAH へ至るセカンドヒットに関する検討

#### —慢性低酸素負荷

*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスの血行動態及び組織が慢性低酸素負荷によりどのように変化するかを調べるために、8 から 10 週齢の野生型及び *Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスを 8.5%酸素濃度の低酸素飼育装置で 3 週間または 5 週間飼育し、血行動態や肺病理組織の評価を行った。

### 実験 3. *BMPR2* 変異から進行期 PAH へ至るセカンドヒットに関する検討

#### —肺内皮特異的 *Pgcl1a* ノックアウト

*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスと *Pgcl1a*<sup>lox/lox</sup>マウス (*Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup>) を交配し、*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>; *Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup> マウスを作成した。肺内皮特異的に Cre 蛋白を発現する *Alk1-cre* (*L1-cre*) マウスと *Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup> マウスを交配し *L1-cre*; *Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup> マウスを作成した後、*L1-cre*; *Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup> マウスと *Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>; *Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup> マウスを交配し、産まれた仔 (*L1-cre*; *Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup> マウス、*L1-cre*; *Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>; *Pgcl1a*<sup>fl/fl</sup> マウス) を用いて PH の表現型、病態に関する解析を行った。解析においては 4 から 6 カ月齢の個体を用いた。

[結果]

### 実験 1. 新規 *Bmpr2* ノックインマウスの作成と表現型解析

新規に作成した *Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスにおいては野生型マウスと比して肺の *Bmpr2* mRNA

発現量が約半分へ低下しており、今回導入した *BMP2* c.741C>A, p.Tyr247Ter がナンセンス変異であることと矛盾しない結果と考えられた。21%酸素濃度下で飼育した 6 カ月齢の *Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスを用いた表現型解析において、カテーテルによる観血的右室圧測定では右室収縮期圧 (RVSP) 上昇を認めず、右室肥大の程度も野生型と有意な差を認めなかった。一方、EVG 染色を用いた肺組織学的評価において、*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスでは野生型マウスと比較して肺動脈中膜が有意に肥厚していた。また、*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスでは野生型マウスと比較して肺における *Endothelin-1* の遺伝子発現が有意に上昇しており、組織で観察された肺動脈中膜肥厚像と矛盾しない結果と考えられた。以上の結果から、*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスは自然発症的に PAH 初期に合致する血管リモデリング像を呈する可能性が示唆された。一方、PAH の進行期に特徴的な内膜病変や著明な右室圧上昇は認められず、PAH の進行には *Bmpr2* 変異に加えて何等かのセカンドヒットが必要である可能性が考えられた。

## 実験 2. *BMP2* 変異から進行期 PAH へ至るセカンドヒットに関する検討

### —慢性低酸素負荷

3 週間低酸素負荷の結果、21%酸素濃度条件下と比較して野生型、*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスともに右室圧上昇及び右室重量の増加を認めたが、両群間で明らかな差を認めなかった。5 週間低酸素負荷を実施した野生型、*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウスのいずれにおいても、3 週間低酸素負荷の場合と比較して右室圧、右室肥大共に有意な変化を認めず、野生型、*Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>マウス両群間の比較においても有意な差を認めなかった。EVG 染色を用いた肺組織学的評価では、3 週間及び 5 週間低酸素負荷のいずれの場合においても肺動脈中膜肥厚の他には PAH に特徴的な内膜病変は観察されなかった。以上の表現型解析の結果から、*Bmpr2* 変異から内膜病変を伴う進行期 PAH へ至るセカンドヒットとして、慢性低酸素負荷条件のみでは不十分であると考えられた。

## 実験 3. *BMP2* 変異から進行期 PAH へ至るセカンドヒットに関する検討

### —肺内皮特異的 *Pgc1a* ノックアウト

表現型解析において、*L1-cre; Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>; *Pgc1a*<sup>fl/fl</sup> マウスは通常酸素濃度下で RVSP 上昇を呈した。そして、EVG 染色及び免疫蛍光染色による肺組織学的評価では、内皮・平滑筋細胞の増殖、内腔の血栓像、肺動脈中膜解離様病変、細胞浸潤を伴う外膜肥厚など、進行期 PAH に合致する多彩な肺血管リモデリング像を認めた。加えて、病変部の免疫蛍光染色を用いた検討では、一部の内皮細胞において DNA2 本鎖切断の指標である  $\gamma$ H2AX 陽性所見が検出され、DNA 傷害が進行期 PAH の病態形成と関連している可能性が示唆された。修復困難な DNA2 本鎖切断を受けた細胞はアポトーシスもしくは老化へ進むことが知られていることから、病変部におけるアポトーシス、老化指標の免疫染色を行った。結果、内皮細胞の一部に cleaved caspase3、p21 の陽性所見を認め、*L1-cre; Bmpr2*<sup>Y247X/+</sup>; *Pgc1a*<sup>fl/fl</sup> マウスの肺血管内皮細胞では DNA 傷害からアポトーシス及び老化が生じている可能性が示唆された。病態機序に関する検討として、DNA2 本鎖切断修復機構を担う *Brcal* や血管内皮成長因子、内皮間葉転換に関わる因子の遺伝子発現について、全肺由来の RNA を用いた

今回の解析では *L1-cre; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウス、*L1-cre; Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウス間で有意な差を検出できなかった。一方、*L1-cre; Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウスでは *L1-cre; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較して肺における *Il6* の発現が有意に増加しており、老化細胞より分泌される SASP 因子が病態形成と関連している可能性が示唆された。

[総合考察]今回新規に作成した *Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>* マウスにおいては、*Bmpr2* ナンセンス変異の結果として血管収縮物質である *Endothelin-1* の発現上昇、肺動脈中膜の肥厚を認め、PAH 初期の血管リモデリングを生じている可能性が示唆された。しかしながら内膜病変を伴う組織学的変化や右室圧上昇は認めず、PAH の進行には *Bmpr2* 変異に何等かのセカンドヒットが必要であると考えられた。

セカンドヒットの探索として第一に慢性低酸素負荷を行ったが、野生型と *Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>* の両群間に血行動態上明らかな差を認めなかった。また、組織所見においても中膜の肥厚の他には進行期 PAH を示唆する病理像を認めなかった。低酸素環境は血管平滑筋収縮を介して PAH の病態形成へ寄与する可能性はあるものの、*BMPR2* 変異から内膜増殖を伴う進行期 PAH へ至るセカンドヒットとしては不十分である可能性が考えられた。

セカンドヒットの探索として第二に肺内皮特異的 *Pgc1a* ノックアウトを実施した。結果、*L1-cre; Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウスでは右室圧上昇及び進行期 PAH に合致する多彩な肺動脈リモデリング像を認めた。免疫染色及び定量 PCR による遺伝子発現の結果より、*L1-cre; Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウスでは背景の *Bmpr2* 変異に肺内皮特異的 *Pgc1a* ノックアウトによる酸化ストレス亢進等の要因が加わることで内皮細胞の DNA 傷害が生じ、内皮細胞のアポトーシス及び老化、SASP 因子の分泌といった機構を介して周囲の細胞の増殖や血栓形成傾向、炎症を惹起・助長することで進行期 PAH へ至る可能性が考えられた。

*L1-cre; Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウスは血行動態、組織の観点から進行期のヒト PAH に類似した病態を再現し得た可能性が高いが、遺伝子改変の観点からは *Bmpr2* 変異に加えて先天的に肺内皮特異的 *Pgc1a* ノックアウトを施したモデルともいえる。これまで *PGC1a* 遺伝子異常を有する PAH 家系の報告はなされておらず、そのような観点においては人為的なモデル動物である。また、実験 3 の *L1-cre; Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウスの全肺由来の RNA を用いた遺伝子発現解析では、*Brcal* や *Il6* 以外の SASP 因子等の遺伝子発現に関して有意な変化を認めず、サンプル数や解析手法の再検討が必要である。本実験には上記を含む限界点があるが、*L1-cre; Bmpr2<sup>Y247X/+</sup>; Pgc1a<sup>fl/fl</sup>* マウスは、従来の肺高血圧症モデル動物に用いられてきた低酸素環境などの非生理的な外的要因の付加なく、*Bmpr2* 変異を背景として通常大気下で進行期 PAH の病態を再現する世界初の疾患モデル動物となる可能性がある。そして、モデル動物として確立することが出来れば、*BMPR2* 変異から重症 PAH へ至る病態メカニズムの解析のみならず、肺移植以外に治療法がない重症患者への介入手段の検討、前臨床試験に大きく寄与することが期待される。今後、単離内皮細胞培養や肺 1 細胞解析も追加して PAH 進行機序を更に検証すると共に、本実験の限界点を踏まえて新規モデル動物としての確立を目指す。