

審査の結果の要旨

氏名 石井 聡

血管拡張薬の登場により肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の予後は劇的に改善した。しかし、薬物治療不応例では、脳死ドナー不足のため長期に及ぶ肺移植待機期間中に右心不全で亡くなる症例が後を絶たない現状があり、PAH 患者の更なる予後改善のために病態機序の解明と新たな治療開発が求められている。PAH 患者の肺生検は困難であり、発症機序解明のためにはより生理的な肺高血圧症モデル動物の開発と解析が不可欠である。本研究は、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により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 (*Bmpr2*^{Y247X/+}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試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 通常大気下で飼育した 6 カ月齢の *Bmpr2*^{Y247X/+}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圧上昇を認めず、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*^{Y247X/+}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*^{Y247X/+}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いた。以上の結果から、*Bmpr2*^{Y247X/+}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示唆された。
2. *BMPR2* 変異から進行期 PAH へ至るセカンドヒットの探索として、第一に慢性低酸素負荷を実施した。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*^{Y247X/+}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*^{Y247X/+}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*^{Y247X/+}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。
3. *BMPR2* 変異から進行期 PAH へ至るセカンドヒットの探索として、第二に肺内皮特異

的 *Pgcl α* ノックアウトを実施した。表現型解析において、*Bmpr2* 変異マウスから肺内皮特異的に *Pgcl α* をノックアウトしたマウス (*L1-cre; Bmpr2^{Y247X/+}; Pgcl α ^{fl/fl}* マウス)は通常大気下で右室圧上昇を呈した。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。

4. *L1-cre; Bmpr2^{Y247X/+}; Pgcl α ^{fl/fl}* マウスの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 γ 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。また、内皮細胞の一部に cleaved caspase3、p21 の陽性所見を認め、*L1-cre; Bmpr2^{Y247X/+}; Pgcl α ^{fl/fl}* 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。
5. 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; Pgcl α ^{fl/fl}* マウス、*L1-cre; Bmpr2^{Y247X/+}; Pgcl α ^{fl/fl}* マウス間で有意な差を検出できなかった。一方、*L1-cre; Bmpr2^{Y247X/+}; Pgcl α ^{fl/fl}* マウスでは *L1-cre; Pgcl α ^{fl/fl}* 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。

以上、本論文では PAH の代表的原因遺伝子 *BMPR2* の病的変異をノックインした新規マウスを作成し、初期 PAH に特徴的な表現型を示すことを確認した。更に、*Bmpr2* 変異マウスから肺内皮特異的に *Pgcl α* をノックアウトすることで進行期 PAH に合致する血行動態、病理像を呈することが確認された。*L1-cre; Bmpr2^{Y247X/+}; Pgcl α ^{fl/fl}* 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や薬剤投与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、今後モデル動物として確立されれば、*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。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。