

三次元培養技術による肺動脈性肺高血圧症の新規治療薬探索

研究分担者 小川愛子

国立病院機構岡山医療センター・臨床研究部・分子病態研究室長

研究要旨

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は、肺動脈の狭窄が原因となり、右心不全に至る指定難病である。複数の治療薬が開発された近年でも3年生存率は約60%とされ、新規治療薬の開発が期待されている。PAHでは肺動脈平滑筋細胞（PASMC）の過剰増殖による中膜肥厚が病態進行の主因と考えられている。肺動脈の中膜肥厚を抑制することにより病状の悪化を抑制できると考えられるが、肺動脈の中膜肥厚を *in vitro* で再現できる簡便なモデルの確立が困難であったために、これを標的として開発された治療薬はない。

本研究では、まず PAH 症例から単離した PASMC を三次元(3D)培養することにより、この肺動脈中膜肥厚状態を試験管内で再現することに成功した。さらに、PAH において肺動脈中膜肥厚を惹起すると考えられている血小板由来増殖因子（PDGF-BB）を、構築した肺動脈中膜モデルに加えることにより厚みが増加し、肺動脈中膜肥厚を再現することに成功した。加えて、この 3D PAH 肺動脈中膜肥厚モデルを利用して、PDGF 阻害剤イマチニブや、実際に臨床応用されている各種薬剤による減厚効果が確認されたことから、本モデルが各種薬剤の効果判定に用いることができることを示した。本モデルは、PAH に対する新規治療薬探索への貢献や、その効果発現機序の詳細の解明、薬剤毒性の評価などにも応用できることから、新規治療薬開発への貢献が期待される。

共同研究者：

森井千春，田中啓祥，出石恭久，中尾なつみ，山本雅哉，松原広己，狩野光伸

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は、肺動脈の狭窄が原因となり、右心不全に至る指定難病であり、複数の治療薬が開発された現在でも、3年生存率は約60%とされ、新規治療薬の開発が期待されている。

肺動脈リモデリングは、肺動脈壁の3層いずれにおいても起こることが報告されている。中でも PASMC の増殖による中膜肥厚は、病態進行に中心的な役割を果たすと考えられており、治療標的として重要視されているが、一方で、*in vitro* の適切なモデルが存在しないために、治療薬のスクリーニングが不可能であった。今回、過剰増殖、アポトーシス耐性といった病的特徴を有することが報告されている PAH 患者由来 PASMC を使用して、PAH の中膜肥厚モデルを作製することを目的とした。

B. 研究方法

PAH 症例から、剖検あるいは肺移植時に肺組織を得た。本研究は臨床研究倫理審査委員会の承認を得た後、各症例あるいは代諾者から同意を得て研究を行った。肺動脈から PASMC を単離・培養した。この PASMC に、フィブロネクチンやゼラチンをコーティングし、24 ウェルプレートに入れたセルカルチャーインサート上に1ウェルあたり 5.0×10^5 細胞を播種し、3次元培養を行った。3D PAH 肺動脈中膜モデルに PDGF-BB と各種阻害剤を加え、SYTOX Green (Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific) を用いて核染色を行い、共焦点顕微鏡 (Nikon C2+ confocal laser microscope) を用いて Z-stack 画像を取得し、NIS-Elements AR version 4.30 software (Nikon) を用いて組織厚を計測した。

また、固定した組織を抗 Ki67 抗体 (Abcam) と SYTOX Green で共染色し、細胞増殖能を評価した。In situ Cell Death Detection Kit (Roche) を用いてアポトーシスの評価も行った。さらに、3D PAH 肺動脈中膜モデルから RNA を抽出し、CCND1 と ACTB のプライマーを用いて RT-qPCR を行い、細胞増殖能の評価を行った。統計学的検討は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) を用いて行った。

C. 研究結果

1) 3D PAH 肺動脈中膜モデルの構築

24 ウェルプレート内のセルカルチャーインサート上に 1 ウェルあたり 5.0×10^5 個の PAH 症例由来 PSMC を播種したところ、4-6 層の層構造を有する 20-30 μ m 厚の 3D PAH 肺動脈中膜モデルが構築できた。

2) PDGF-BB による 3D PAH 肺動脈中膜モデルの増高

PDGF-BB は、PAH 症例の血中濃度が高いことが報告されており、また、さまざまな PAH 動物モデルを用いた検討で、PAH の病態と関連していることが報告されている増殖因子である。この PDGF-BB を今回作製した 3D PAH 肺動脈中膜モデルに加えたところ、Ki67 陽性細胞が増加し組織厚が増加した。

3) イマチニブによる増殖抑制とアポトーシス誘導による 3D PAH 肺動脈中膜肥厚モデルの減高

2) で構築した 3D PAH 肺動脈中膜肥厚モデルが治療薬のスクリーニングに使用可能か検討するために、まず、PDGF の阻害剤であるイマチニブを加えて培養を行った。イマチニブを添加した 3D PAH 肺動脈中膜モデルは厚みが減少し、細胞増殖マーカーである CCND1 の mRNA 発現が低下した。また、Ki67 陽性細胞が減少し、アポトーシスマーカーである TUNEL 陽性細胞が増加していた。

4) PAH 治療薬による 3D PAH 肺動脈中膜肥厚モデルの減高効果

続いて、実際に PAH 症例に使用されている治療薬が、今回構築した 3D PAH 肺動脈中膜肥厚モデルに対して減高効果があるのかについて検証した。PAH 治療薬には 3 系統あるが、各系統に介入する薬剤を 1 剤ずつ選択した。エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタン、プロスタサイクリン受容体作動薬であるセレキシパグの活性代謝物 MRE-269、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬であるタダラフィルの 3 剤を用いた。いずれの薬剤も 3D PAH 肺動脈中膜肥厚モデルの厚みを減高した。ボセンタン、タダラフィルの減高効果がより強く、これに相関して CCND1 の mRNA 発現も有意に低下させた。3 剤ともに薬剤処置により、Ki67 陽性細胞減少し、TUNEL 陽性細胞が増加した。

D. 考察

肺動脈リモデリングは、肺動脈壁の 3 層いずれにおいても起こることが報告されている。PSMC の増殖による中膜肥厚は、病態進行に中心的な役割を果たすと考えられており、治療標的として重要視されている。今回われわれの作製した PAH の中膜肥厚モデルは、過剰増殖、アポトーシス耐性といった病的特徴を有することが報告されている PAH 患者由来 PSMC を使用していることから、PAH の病態解明や新規薬剤の探索に最適なモデルであると考えられる。病態進行に重要な役割を果たすことが示されている PDGF-BB の添加により実際にモデルの厚みが増高し、さらにイマチニブだけでなく、実際に臨床応用されている各種薬剤による減高効果が確認されたことから、今後新規治療薬の探索やその効果発現機序の詳細の解明、薬剤毒性の評価などにも応用できることが期待される。

E. 結論

3 次元培養技術を用いて、これまで存在しなかった、in vitro での PAH 中膜肥厚モデルを初めて作製することに成功した。このモデルは、中膜肥厚を抑制できる新規 PAH 薬の候補薬剤の評価に利用できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文

Morii C, Tanaka HY, Izushi Y, Nakao N, Yamamoto M, Matsubara H, Kano MR, Ogawa A. 3D in vitro Model of Vascular Medial Thickening in Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:482.



3D *in vitro* Model of Vascular Medial Thickening in Pulmonary Arterial Hypertension

Chiharu Morii^{1,2†}, Hiroyoshi Y. Tanaka^{1†}, Yasuhisa Izushi², Natsumi Nakao¹, Masaya Yamamoto^{3,4}, Hiromi Matsubara², Mitsunobu R. Kano^{1,5} and Aiko Ogawa^{2*}

¹ Department of Pharmaceutical Biomedicine, Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, Japan, ² Division of Molecular and Cellular Medicine, Department of Clinical Science, National Hospital Organization Okayama Medical Center, Okayama, Japan, ³ Department of Materials Processing, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai, Japan, ⁴ Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University, Sendai, Japan, ⁵ Department of Pharmaceutical Biomedicine, Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University, Okayama, Japan

OPEN ACCESS

Edited by:

Paul Andrew Wieringa,
Maastricht University, Netherlands

Reviewed by:

Patricia Diaz-Rodriguez,
University of La Laguna, Spain
Fatemeh Kabirian,
Materials and Energy Research
Center, Iran
Emilie Velot,
Université de Lorraine, France

*Correspondence:

Aiko Ogawa
aiko-oky@umin.ac.jp

[†]These authors have equally
contributed to the work

Specialty section:

This article was submitted to
Biomaterials,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 31 January 2020

Accepted: 27 April 2020

Published: 20 May 2020

Citation:

Morii C, Tanaka HY, Izushi Y,
Nakao N, Yamamoto M,
Matsubara H, Kano MR and Ogawa A
(2020) 3D *in vitro* Model of Vascular
Medial Thickening in Pulmonary
Arterial Hypertension.
Front. Bioeng. Biotechnol. 8:482.
doi: 10.3389/fbioe.2020.00482

In pulmonary arterial hypertension (PAH), excessive proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) causes vascular medial thickening. Medial thickening is a histopathological hallmark of pulmonary vascular remodeling, the central disease process driving PAH progression. Pulmonary vascular remodeling causes stenosis and/or obstruction of small pulmonary arteries. This leads to increased pulmonary vascular resistance, elevated pulmonary arterial pressure, and ultimately right heart failure. To improve the survival of PAH patients, which remains at approximately 60% at 3 years after diagnosis, the development of novel PAH-targeted drugs is desired. To this end, a detailed understanding of the mechanisms underlying excessive PASMC proliferation and the medial thickening that ensues is necessary. However, a lack of *in vitro* models that recapitulate medial thickening impedes our deeper understanding of the pathogenetic mechanisms involved. In the present study, we applied 3-dimensional (3D) cell culture technology to develop a novel *in vitro* model of the pulmonary artery medial layer using human PAH patient-derived PASMCs. The addition of platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, a mitogen known to promote excessive PASMC proliferation in PAH, resulted in increased thickness of the 3D-PAH media tissues. Conversely, administration of the PDGF receptor inhibitor imatinib or other clinical PAH drugs inhibited this medial thickening-inducing effect of PDGF-BB. Altogether, by using 3D cell culture technology, we report the generation of an *in vitro* model of medial thickening in PAH, which had hitherto not been successfully modeled *in vitro*. This model is potentially useful for assessing the ability of candidate PAH drugs to suppress medial thickening.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, medial thickening, pulmonary artery smooth muscle cell, 3D culture, PDGF signaling, imatinib

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a devastating disease. In PAH, pulmonary vascular remodeling causes stenosis and/or obstruction of small pulmonary arteries. This leads to increased pulmonary vascular resistance, elevated pulmonary arterial pressure, and ultimately right heart failure. The survival rate is approximately 60% at 3 years after diagnosis despite decades of