

肺泡マクロファージの Regnase-1 による制御機構

研究分担者 大郷 剛

国立研究開発法人国立循環器病研究センター 肺循環科部長・医長

研究要旨

肺動脈性肺高血圧症(Pulmonary Arterial Hypertension: PAH)は肺高血圧症の一つであり、進行性で心不全に至る予後不良の病気である。血管拡張薬の発展に伴い予後の改善がみられるも、未だ治療不応性・予後不良の症例が存在し、病態解明と新規治療法が求められている。本研究では、炎症に関連する分子をコードするメッセンジャーRNA (mRNA) を分解することで炎症反応を抑える Regnase-1 タンパク質に着目し、肺高血圧症患者の血液細胞における Regnase-1 遺伝子の発現量を解析した。その結果、Regnase-1 が肺高血圧症、特に、自分の免疫細胞が自己を攻撃する病気である膠原病に合併する PAH(膠原病性 PAH)の病態に関与している可能性が示唆された。また、マウスを用いた実験により、肺泡マクロファージにおける Regnase-1 がインターロイキン-6 (Interleukin-6: IL-6) 4 や血小板由来成長因子(Platelet Derived Growth Factor: PDGF) 5 といったタンパク質をコードするメッセンジャーRNA (mRNA)の分解を介して PAH 病態を負に制御しているということが明らかになった。これらの結果は、今後、Regnase-1 の発現量や機能を制御することで PAH の新規治療法につながる可能性がある。

A. 研究目的

肺動脈の血管壁が厚くなり内腔が狭くなるのが原因で起こる肺高血圧症のことを、肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension: PAH)といい、代表的なものとして、特発性 PAH と、免疫細胞が自己を攻撃する病気である膠原病に合併する膠原病性 PAH が挙げられる。PAH は進行性の病気で、未治療では大半が死に至る病気である。近年の血管拡張薬の開発により予後は改善しましたが、治療不応性の症例は未だに予後が不良であり、病態解明が求められています。特に膠原病性 PAH は、肺動脈病変のみならず、肺静脈が閉塞する病気である肺静脈閉塞症等で他の原因による PAH と比較して予後不良であることが知られています。しかしながら、重症の膠原病性 PAH の病態を模するモデルマウスは存在せず、その病態は未解明のままである。

PAH の本態は、肺動脈を構成する細胞が異常に増殖することで、肺動脈の血管壁が厚くなり、血管の内腔が狭くなることあり、現在使用されている血管拡張薬では、これらの異常な細胞増殖を抑えることができない。このような肺動脈構成細胞の異常増殖の発症・進展過程には慢性的な炎症が関与していることが指摘されている。例えば、インターロイキン 1 (Interleukin-1, IL-1)や IL-6 などの炎症性サイトカインが PAH 患者の血中において高値であることが報告されている。しかしながら、どのような細胞が炎症性サイトカインを産生し、PAH 病態に寄与しているのかは分かっていない。そこで我々は、免疫細胞の活性化や炎症を抑えるブレーキとしての働きをもつ Regnase-1 という分子に着目した。

Regnase-1 は、IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインをはじめとした、免疫細胞活性化に関連するタンパク質をコードする mRNA を分解する酵素として機能し、免疫応答を抑制するタンパク質である。近年の研究で、ヒト潰瘍性大腸炎の上皮細胞で Regnase-1 の機能獲得変異が見つかった。また、特発性肺線維症 10 患者さんの気管支肺泡洗浄液中で、線維化に関連する細胞である 2 型自然リンパ球(ILC2) の数と、Regnase-1 の発現量との間に負の相関を認め、ILC2 に発現する Regnase-1 が肺線維症の増悪を防ぐ機能を持つことも明らかになっている。したがって、ヒトの炎症病態や病気に Regnase-1 が関与していることが考えられた。

以上より、我々は Regnase-1 が炎症を抑制することで PAH 病態を制御しているのではないかと考え、次のような手法を用いて研究を行った。

B. 研究方法

まず、肺高血圧症病態に Regnase-1 が関与しているかどうか検討するために、肺高血圧症患者と健常者の血液細胞における Regnase-1 遺伝子発現量を比較した。PAH 病態に寄与すると考えられている IL-6 や IL-1 などの炎症性サイトカインは免疫細胞の一種である骨髄系細胞で分泌されることが知られており、骨髄系細胞における Regnase-1 の機能を検討した。

C. 研究結果

肺高血圧症患者では Regnase-1 発現量が健常者と比べて低下していた。また、Regnase-1 の発現量によって肺高血圧症患者を 2 群に分けると、Regnase-1 発現量が高い群と比較すると低い群の方が疾患の予後が悪いことが明らかになった。これらの結果よりヒト肺高血圧症の病態に Regnase-1 が関与している可能性が考えられた。そこで、肺高血圧症のサブグループである PAH 患者に関して詳細に検討したところ、特に膠原病性 PAH 患者において Regnase-1 発現量と PAH の重症度が負に相関しており、Regnase-1 が肺高血圧症、特に膠原病性 PAH の病態に関与している可能性が考えられた。

骨髄系細胞において Regnase-1 を欠損する 2 系統のマウスを作製したところ、両系統のマウスが PAH を自然発症した。さらに、病理像では、既存の PAH モデルマウスで再現することが困難であった重症 PAH 患者でみられる肺動脈の叢状病変 (Plexiform lesion) を呈した。また、膠原病患者に合併することの多い、肺静脈閉塞症や心臓の線維化も合併しており、重症の膠原病性 PAH を再現するモデルマウスと考えられた。2 系統のマウスで共通する点は、肺泡マクロファージにおける Regnase-1 欠損であるため、肺泡マクロファージにおける Regnase-1 欠損が膠原病性 PAH 病態を引き起こしている可能性が考えられた。Regnase-1 欠損マウスにおいて、リンパ球依存性とリンパ球非依存性の経路が PAH 病態形成に寄与していることが明らかになった。Regnase-1 欠損マウスに肺泡マクロファージを除去する薬剤を経気道的に投与すると PAH 病態が改善したことから、肺泡マクロファージにおける Regnase-1 が PAH 病態を制御していることが明らかになった。

次に、Regnase-1 欠損マウスから肺泡マクロファージと肺動脈を取り出し、両者の遺伝子発現を網羅的に解析し組み合わせることで、Regnase-1 を欠損した肺泡マクロファージがどのような因子を介して肺動脈構成細胞の異常な増殖を引き起こしているのかを検討した。その結果、IL-1、IL-6、PDGF などの遺伝子が Regnase-1 によって分解制御されることが分かりました。PDGF は血管平滑筋細胞を増殖させることが知られています。そこで、Regnase-1 欠損マウスを用いて、これらの因子を阻害する実験をしたところ、IL-6 や PDGF を阻害することで PAH 病態の改善がみられた。以上の結果より肺泡マクロファージにおける Regnase-1 は IL-6、PDGF の mRNA 分解を介して PAH 病態を負に制御しているということが明らかになった。

D. 考察

本研究で作製した Regnase-1 欠損マウスは、既存の PAH モデルマウスで再現することのできなかつた重症 PAH 患者の肺動脈病理像を再現し、膠原病性 PAH 患者に合併することの多い肺静脈閉塞症や心臓の線維化を合併しており、重症 PAH、特に膠原病性 PAH の病態解明に有用な新規モデルマウスと考えられる。今後、このマウスを用いて膠原病性 PAH の病態がさらに解明されると考えている。また既存の血管拡張薬では、肺動脈構成細胞の異常な細胞増殖を制御することはできず、新しい治療薬の開発が望まれている。今回、炎症と PAH の関係に着目し、Regnase-1 が炎症を抑制する中核となり PAH 病態を制御するということを示してお

り、今後は Regnase-1 の発現量や機能を薬剂的に制御する手法を開発するとともに、PAH の新規治療につなげていきたいと考えている。

E. 結論

肺高血圧症患者の血液細胞における Regnase-1 遺伝子の発現量を解析した。その結果、Regnase-1 が肺高血圧症、特に、自分の免疫細胞が自己を攻撃する病気である膠原病に合併する PAH(膠原病性 PAH)の病態に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文

Yaku A, Inagaki T, Asano R, Okazawa M, Mori H, Sato A, Hia F, Masaki T, Manabe Y, Ishibashi T, Vandebon A, Nakatsuka Y, Akaki K, Yoshinaga M, Uehata T, Mino T, Morita S, Ishibashi-Ueda H, Morinobu A, Tsujimura T, Ogo T, Nakaoka Y, Takeuchi O. Regnase-1 Prevents Pulmonary Arterial Hypertension Through mRNA Degradation of Interleukin-6 and Platelet-Derived Growth Factor in Alveolar Macrophages. *Circulation*. 2022;146(13):1006-1022.

doi:10.1161/circulationaha.122.059435

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Regnase-1 Prevents Pulmonary Arterial Hypertension Through mRNA Degradation of Interleukin-6 and Platelet-Derived Growth Factor in Alveolar Macrophages

Ai Yaku, MD; Tadakatsu Inagaki, PhD; Ryotaro Asano, MD, PhD; Makoto Okazawa, PhD; Hiroyoshi Mori, MD, PhD; Ayuko Sato¹, PhD; Fabian Hla², PhD; Takeshi Masaki, MD, PhD; Yusuke Manabe, MD; Tomohiko Ishibashi³, MD, PhD; Alexis Vandenbon, PhD; Yoshinari Nakatsuka, MD, PhD; Kotaro Akaki⁴, PhD; Masanori Yoshinaga⁵, MD, PhD; Takuya Uehata, MD, PhD; Takashi Mino⁶, PhD; Satoshi Morita, PhD; Hatsue Ishibashi-Ueda, MD, PhD; Akio Morinobu⁷, MD, PhD; Tohru Tsujimura⁸, MD, PhD; Takeshi Ogo, MD, PhD; Yoshikazu Nakaoka⁹, MD, PhD*; Osamu Takeuchi¹⁰, MD, PhD*

BACKGROUND: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a type of pulmonary hypertension (PH) characterized by obliterative pulmonary vascular remodeling, resulting in right-sided heart failure. Although the pathogenesis of PAH is not fully understood, inflammatory responses and cytokines have been shown to be associated with PAH, in particular, with connective tissue disease-PAH. In this sense, Regnase-1, an RNase that regulates mRNAs encoding genes related to immune reactions, was investigated in relation to the pathogenesis of PH.

METHODS: We first examined the expression levels of *ZC3H12A* (encoding Regnase-1) in peripheral blood mononuclear cells from patients with PH classified under various types of PH, searching for an association between the *ZC3H12A* expression and clinical features. We then generated mice lacking Regnase-1 in myeloid cells, including alveolar macrophages, and examined right ventricular systolic pressures and histological changes in the lung. We further performed a comprehensive analysis of the transcriptome of alveolar macrophages and pulmonary arteries to identify genes regulated by Regnase-1 in alveolar macrophages.

RESULTS: *ZC3H12A* expression in peripheral blood mononuclear cells was inversely correlated with the prognosis and severity of disease in patients with PH, in particular, in connective tissue disease-PAH. The critical role of Regnase-1 in controlling PAH was also reinforced by the analysis of mice lacking Regnase-1 in alveolar macrophages. These mice spontaneously developed severe PAH, characterized by the elevated right ventricular systolic pressures and irreversible pulmonary vascular remodeling, which recapitulated the pathology of patients with PAH. Transcriptomic analysis of alveolar macrophages and pulmonary arteries of these PAH mice revealed that *Il6*, *Il1b*, and *Pdgfra/b* are potential targets of Regnase-1 in alveolar macrophages in the regulation of PAH. The inhibition of IL-6 (interleukin-6) by an anti-IL-6 receptor antibody or platelet-derived growth factor by imatinib but not IL-1 β (interleukin-1 β) by anakinra, ameliorated the pathogenesis of PAH.

CONCLUSIONS: Regnase-1 maintains lung innate immune homeostasis through the control of IL-6 and platelet-derived growth factor in alveolar macrophages, thereby suppressing the development of PAH in mice. Furthermore, the decreased expression of Regnase-1 in various types of PH implies its involvement in PH pathogenesis and may serve as a disease biomarker, and a therapeutic target for PH as well.

Key Words: hypertension, pulmonary ■ interleukin-6 ■ macrophages ■ platelet-derived growth factor ■ regnase-1

Editorial, see p 1023

Correspondence to: Yoshikazu Nakaoka, MD, PhD, Department of Vascular Physiology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Kishibe-shimmachi, Suita, 564-8565, Japan, Email ynakaoka@nccvc.go.jp; or Osamu Takeuchi, MD, PhD, Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, Email otake@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

*Y. Nakaoka and O. Takeuchi contributed equally.

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.059435>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 1021.

© 2022 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at www.ahajournals.org/journal/circ