

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09210

研究課題名(和文)肺高血圧症ラット肺移植モデルによる治療抵抗性血管病変の病態解明及び創薬シーズ探索

研究課題名(英文)Elucidation of various pathophysiology of refractory pulmonary arterial lesions in PAH rat model with lung transplantation

研究代表者

坂尾 誠一郎(Sakao, Seiichiro)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80431740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧症モデル(Su/Hx model)に肺血管拡張薬を投与し、治療抵抗性病変を確認した。正常ラットで片肺移植の技術を習得後、Su/Hx modelを用いた片肺移植を開始した。しかし、PAHモデルでは肺動脈圧の上昇および右心負荷により肺移植が困難であった。ごく少数の成功例では肺動脈病変の改善を確認したが、その後は肺移植の再現が困難であり、現在も技術の安定化に向け努力している。現在は治療抵抗性病変の成立機序を解明するため、習得した肺移植技術により異性間での移植実験を行っている。XおよびY染色体を同定するためFISH法を用い、中膜および内膜病変における骨髄細胞の関与についてデータを蓄積している。

研究成果の概要(英文)：Refractory pulmonary arterial lesions against vasodilator drugs were confirmed in PAH rat model (i.e., Su/Hx model). After a successful single lung transplant in normal rats, we tried a single lung transplant in Su/Hx model. However, almost transplants failed due to high pulmonary arterial pressure and right heart overload. In a very few successful cases, pulmonary lesions ameliorated. Subsequently, there was no successful lung transplant in Su/Hx model. Now, together with it, a single lung transplant between male and female rats was tried to elucidate pathophysiology of vascular lesions. Data about bone marrow derived cells in medial and intimal lesions are accumulated by using FISH analysis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 肺移植

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) における肺動脈リモデリングには、現行の選択的肺血管拡張薬でも残存する治療抵抗性病変が存在する。しかし進行期 PAH 症例へ片肺移植がなされていた時代、移植による肺循環動態改善後に残存病巣肺のほぼすべての肺動脈リモデリングが改善したとの報告があった。つまり圧負荷・容量負荷の解除こそが治療抵抗性病変を改善させる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、同様の病態を進行期 PAH ラットモデルで再現し移植により生じた肺微小環境の変化を分子病理学的に明らかにすることである。さらに、現行薬剤に治療抵抗性を示す血管リモデリングが改善した分子機序を解明すると共に、新規治療薬のターゲットとして創薬に応用することである。またヒト PAH 肺移植症例の摘出病巣肺を検討し、動物モデルでの結果を確認する。

3. 研究の方法

①薬剤抵抗性病変の確認: VEGF 受容体拮抗薬 (SU5416) 投与+低酸素暴露モデル (Su/Hx model) に現行の選択的肺血管拡張薬を投与し、Heath-Edwards 分類 I~IV (I 中膜肥厚、II 細胞性内膜肥厚、III 線維性変化を伴う細胞増殖性内膜肥厚、IV 以降 Plexiform lesion など複合病変) のうち薬剤抵抗性病変を確認する。

②片肺移植による効果確認: 治療群及び非治療群 Su/Hx model に片肺移植を施行し、一定期間後移植時残存させた病巣肺を移植時摘出した病巣肺と照合し移植により改善した病変を確認する。

③肺微小環境変化の確認: 片肺移植後の肺循環動態改善による肺組織微小環境変化を、プロテオーム解析、Bio-Plex 解析、ウエスタンブロット解析などによる蛋白質発現変化で確認する。

4. 研究成果

①薬剤抵抗性病変の確認: 我々は、Su/Hx model に選択的肺血管拡張薬であるエンドセリン受容体拮抗薬、アンブリセンタンを投与し、その効果を確認した。病態の進展を抑制する目的で低酸素暴露下から薬剤を投与した群 (予防投与群: Prevention study group) と、実際の臨床に準じて病態がある程度進展してから薬剤を投与した群 (初期治療群: Early studygroup) の 2 群を比較した。右心カテーテル検査による右室収縮期圧は、前者でより強い改善効果を示した (図 1)。また血管内腔の閉塞に対する改善効果も、前者で優位であった (図 2)。Heath-Edwards 分類 I~IV の病

変のうち内膜病変の II~IV は両群で改善傾向が見られた (図 3)。

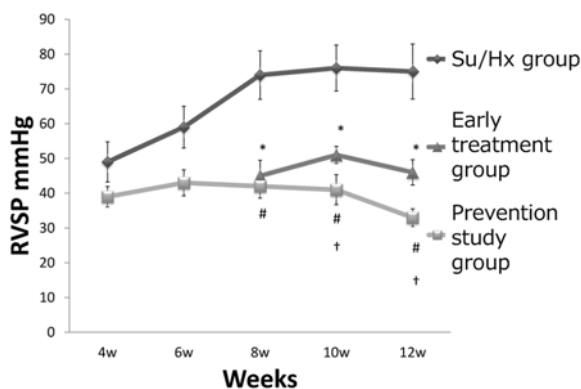


図1 予防投与群 (Prevention study group) と初期治療群 (Early studygroup) における右心カテーテル検査による右室収縮期圧 (RVSP) の変化

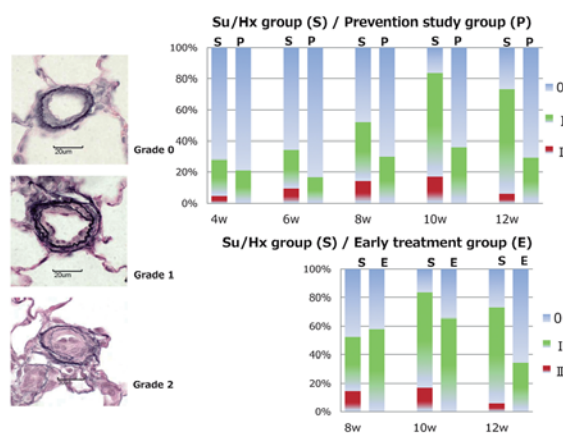


図2 予防投与群 (Prevention study group) と初期治療群 (Early studygroup) における血管内腔の閉塞に対する改善効果

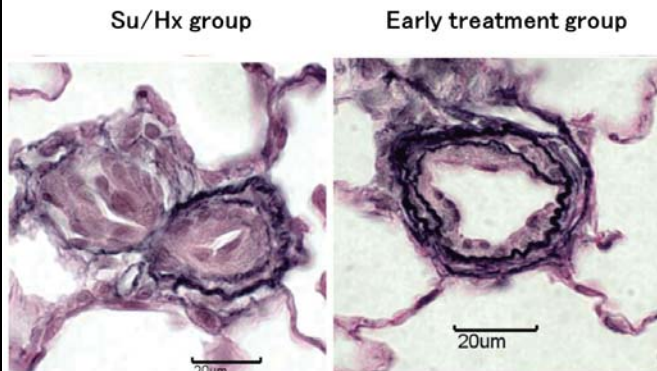


図3 初期治療群 (Early study group) における治療抵抗性病変 Heath-Edwards分類II~IVのうち、IV病変は改善し、残存病変はII~IIIの病変であった。elastic van Gieson (EVG)により染色。

Heath と Edward の報告では、I~IV の病変は経時的に進行し、III の病変までが可逆性があり IV 以降は不可逆性であると報告した。それにより本研究の背景では、現行の選択的肺血管拡張薬でも残存する治療抵抗性病変は IV 以降の複合病変と予想していた。しかし、両治療群ともに Plexiform lesion など IV 以降の病変は改善し、残存するのは II~III の内膜病変であった (Histol Histopathol. 2016 Dec;31(12):1357-65)。

②片肺移植による効果確認：

ラットにおける片肺移植では非常に高い技術が必要となる。共同研究者の当院呼吸器外科鈴木秀海の指導下にて、まず移植技術の習得を旨とした。まずその行程を示す。レシピエントラットを1-2%イソフルレンによる麻酔管理下とし、左第3肋間で開胸した後左肺肺門部の肺動脈、肺静脈、気管支の周囲組織を切除し大動脈弓下付近で気管支を結紮切離する。ドナーラットも補助呼吸下に、前胸壁を切除し左肺門の周囲組織を切除後、速やかに肺を摘出する。実際の移植は肺静脈および肺動脈を連続縫合し、循環停止のための血管鉗子を解除し気管支吻合を行う。

上記行程の打ち、平成27年度内に左肺肺門部の肺動脈吻合までは可能となったが、肺静脈や気管支吻合が不可能であった。平成28年度にその技術が安定し、年度後半より安定的に正常ラットを用いた片肺移植が成功するようになった。

平成29年度より Su/Hx model を用いた片肺移植を開始した。しかし重症化した PAH モデルでは、肺動脈圧の上昇および右心負荷により、正常ラットに比べ肺静脈や気管支吻合が困難であった。ごく少数の PAH ラットで肺移植が成功したが、その後は安定した肺移植の再現が困難であり現在も技術の安定化に向け肺移植を継続している。少数ではあるが、肺移植成功ラットでは片肺移植による shear stress の改善により、Heath-Edwards 分類 I~IV の病変が改善する可能性が示された (図 4 preliminary data)。しかし、その後の再現が不可能なため詳細な検討は未だなされていない。

③肺微小環境変化の確認：

Su/Hx model を用いた片肺移植が安定的に再現できないため、現在その検討に向け準備中である。

当初計画どおりに進まない時の対応として

本研究発案時の予想では、選択的肺血管拡張薬治療に抵抗性を示す病変は、IV 以降の複合病変と考えていた。しかし、両治療群ともに Plexiform lesion など IV 以降の病変は改善傾向を示し、残存するのは II~III の内膜病変であった。つまり治療後の残存肺高血圧を規定しているのは、不可逆性と思われた IV 以降の病変ではなく、可逆性と思われる II~III の病変の可能性が示された。それでは、II~III の病変で選択的肺血管拡張薬に可逆性を示す病変と、不可逆性の病変では何が異なるのか？それを解明するため、まず内膜病変の成立機序について検討した。特に同病変に存在する細胞の起源を確かめる必要があると考えた。そこで我々が習得した片肺移植の技術を用いて、異性間での肺移植実験を試みた。オスのラットにメスの肺を移植し、メスの移

植肺におけるオス細胞の動員を FISH 法で確認する実験を開始している。移植肺における中膜および内膜病変における骨髄細胞の関与について、現在データを蓄積している。今後その結果も、本申請課題の成果として発表する予定である。さらに本研究も継続している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Kato F, Sakao S, Takeuchi T, Suzuki T, Nishimura R, Yasuda T, Tanabe N, Tatsumi K. (2017) Endothelial cell-related autophagic pathways in Sugen/hypoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 313(5):L899-L915. (IF: 4.281)
2. Sekine A, Nishiwaki T, Nishimura R, Kawasaki T, Urushibara T, Suda R, Suzuki T, Takayanagi S, Terada J, Sakao S, Tada Y, Iwama A, Tatsumi K. (2016) Prominin-1/CD133 expression as potential tissue-resident vascular endothelial progenitor cells in the pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 310(11):L1130-42. (IF: 4.72)
3. Takeuchi T, Sakao S, Kato F, Naito A, Jujo T, Yasuda T, Tanabe N, Tatsumi K. (2016) Pulmonary haemodynamics are correlated with intimal lesions in a rat model of severe PAH: attenuation of pulmonary vascular remodelling with ambrisentan. *Histol Histopathol.* 31(12):1357-65. (IF: 1.88)
4. Kato F, Tanabe N, Ishida K, Suda R, Sekine A, Nishimura R, Jujo T, Sugiura T, Sakao S, Tatsumi K. (2016) Coagulation-Fibrinolysis System and Postoperative Outcomes of Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ J.* 25,80:970-979. (IF: 4.12: 1 cited)
5. Sakao S, Miyauchi H, Voelkel NF, Sugiura T, Tanabe N, Kobayashi Y, Tatsumi K. (2015) Increased Right Ventricular Fatty Acid Accumulation in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Annals of the American Thoracic Society* 12:1465-1472. (IF:---)
6. Kawasaki T, Nishiwaki T, Sekine A, Nishimura R, Suda R, Urushibara T, Suzuki T, Takayanagi S, Terada J, Sakao S, Tatsumi K. (2015) Vascular Repair by Tissue-resident Endothelial Progenitor Cells in Endotoxin-induced Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 53, 500-512. (IF: 4.08: 4cited)

7. Nishimura R, Kawasaki T, Sekine A, Suda R, Urushibara T, Suzuki T, Takayanagi S, Terada J, Sakao S, Tatsumi K. (2015) Hypoxia-induced proliferation of tissue-resident endothelial progenitor cells in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 308(8), L746-758. (IF: 4.72: 6 cited)

〔学会発表〕 (計 16 件)

(海 外)

特別講演・シンポジウム・教育講演等

1. Sakao S. (2018) Current Management and Molecular Basis of Pulmonary Hypertension Due to Lung Disease. 2018 Taiwan pulmonary hypertension association (TPHA) Annual Scientific Meeting Invited lecture 2018.4.21-22 Taichung, Taiwan
2. Sakao S. (2016) Molecular basis for remodeled pulmonary vasculature and hypertrophied right ventricle in pulmonary hypertension. The 122th Conference of Korean academic tuberculosis and respiratory disease (KATRD) Invited lecture 2016.11.17-18 Seoul, Korea
3. Sakao S, Miyauchi H, Jujo T, Sugiura T, Shigeta A, Tanabe N, Kobayashi Y, Tatsumi K. (2015) 123I-BMIPP fatty acid analogue imaging as a novel procedure to detect a metabolic disorder of right ventricle cardiocytes in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *ATS 2015 International Conference Mini-Symposium* 2015.5.15-20 Denver, USA

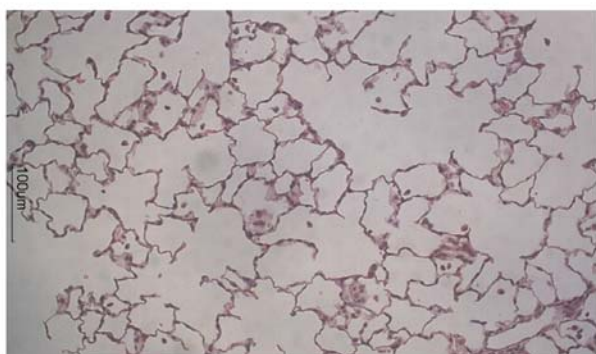


図4 Su/Hxラットへの肺移植 (preliminary data)
SU5416投与後に3週間低酸素暴露した。その後5週間室内気で飼育し、その時点で左肺移植を施行した。1週間後にレシビエントの右肺を摘出し病理学的に検討した。Hematoxylin-Eosin (HE)により染色。

一般発表

1. Kato F, Sakao S, Takeuchi T, Suzuki T, Nishimura R, Yasuda T, Naito A, Jujo T, Tanabe N, Tatsumi K. (2017) Endothelial cell-related autophagic pathways in a severe pulmonary hypertension model. *TS 2017 International Conference* 2017.5.19-24 Washington DC, USA
2. Sakao S, Daimon M, Voelkel N, Miyauchi H, Jujo T, Sugiura T, Tanabe N, Kobayashi

Y, Tatsumi K. (2016) Right ventricular sugar and fat in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *ATS 2016 International Conference* 2016.5.14-18 San Francisco, USA

(国 内)

学会賞受賞講演

1. 坂尾誠一郎. (2017) 2017 年度日本呼吸器学会学術講演会 熊谷賞受賞講演：細胞機能障害と肺高血圧症：病態機序の解明と新規治療法の開発を目指して. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 (2017.4.21-4.23 東京)
2. 坂尾誠一郎. (2016) 2016 年度日本呼吸器学会学術講演会 学術講演会演題賞 (学術部会賞) 優秀賞 CTEPH 患者における右室脂肪酸取り込みと肺循環動態の評価. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 (2016.4.8-10 京都)
3. 坂尾誠一郎. (2016) 2016 年度日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 八巻賞受賞講演：細胞機能障害からみた肺高血圧症の病態機序解明および新規治療法の開発. 第 1 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 (2016.10.1-10.2 東京)

特別講演・シンポジウム・教育講演等

1. 坂尾誠一郎. (2017) ランチョンセミナー (LS24) : APTE or CTEPH? -呼吸器科医が診る肺血栓塞栓症の診断プロセスについて. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 (2017.4.21-23 東京)
2. 坂尾誠一郎. (2017) シンポジウム (S2-4) : 肺高血圧症における右室心筋細胞のミトコンドリア機能異常. 第 2 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 (2017.6.3-4 札幌)
3. 坂尾誠一郎. (2017) パネルディスカッション (PD1-5) : 肺高血圧症のゲノム解析：その先へ. PD1-5. 第 2 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 (2017.6.3-4 札幌)
4. 坂尾誠一郎. (2016) 教育講演：肺静脈閉塞症／肺毛細血管腫症 (PVOD/PCH). 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 (2016.4.8-10 京都)
5. 坂尾誠一郎. (2016) ワークショップ 2 : 肺高血圧症患者における右室心筋細胞の代謝機能変化. 第 1 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 (2016.10.1-2 東京)
6. 坂尾誠一郎. (2016) シンポジウム S1-2: 肺高血圧症患者における右室心筋細胞の代謝機能変化. 第 53 回日本臨床生理学会総会 (2016.10.28-29 東京)
7. 坂尾誠一郎. (2015) イブニングセミナー 7 : 選択的肺血管拡張薬の効果から I 群 PAH と III 群 PH の病態を考える. 第 35 回日本呼吸器学会学術講演会 (2015.4.17-19 東京)
8. 坂尾誠一郎, 大門道子, 重城喬行, 杉浦寿彦, 重田文子, 田邊信宏, 宮内秀行,

小林欣夫, 巽浩一郎. (2015) ミニシン
ポジウム: 糖代謝から見た CTEPH 血栓
内膜摘除術前後の右心負荷評価. 第 35
回日本呼吸器学会学術講演会
(2015.4.17-19 東京)

[図書] (計 1 件)

1. Felty Q, Sakao S, Voelkel NF. (2015)
Pulmonary Arterial Hypertension: A Stem
Cell Hypothesis. In: Stem Cell Biology and
Regenerative Medicine, Lung Stem Cells in
the Epithelium and Vasculature, ed. Firth A,
Yuan J, Humana Press, Springer
International Publishing Switzerland, Part II,
289-306.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂尾 誠一郎 (SAKAO, Seiichiro)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80431740

(2) 研究分担者

巽 浩一郎 (TATSUMI, Koichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 10207061

(3) 研究分担者

江本 憲昭 (EMOTO, Noriaki)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 30294218

(4) 研究分担者

岩田 剛和 (IWATA, Takekazu)
千葉県がんセンター (研究所)・呼吸器
外科・部長
研究者番号: 30586681

(5) 研究分担者

田邊 信宏 (TANABE, Nobuhiro)
千葉大学・大学院医学研究院・特任教授
研究者番号: 40292700

(6) 研究分担者

鈴木 秀海 (SUZUKI, Hidemi)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 60422226