

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10065

研究課題名(和文) 原子間力顕微鏡を用いた中枢肺動脈のレオロジー解析による肺高血圧症の病態解明

研究課題名(英文) Rheological analysis of pulmonary smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension by using atomic force microscope

研究代表者

成田 淳(Narita, Jun)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70467562

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)：肺動脈性肺高血圧症においては、末梢肺動脈における抵抗(レジスタンス)だけではなく、中枢肺動脈におけるコンプライアンスも重要であることが近年理解されてきた。しかしこれまで肺動脈平滑筋細胞における粘弾性が、肺高血圧症においてどのような役割を果たしているのかは確立されていない。本研究では、肺高血圧症患者から得た肺動脈平滑筋細胞において原子間力顕微鏡を用いることでその粘弾性を精度高く計測することが可能となった。肺高血圧症患者においては、粘弾性の高い細胞の一群が存在し、肺血管拡張薬投与によって、その粘弾性は低下することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、肺動脈性肺高血圧症患者における肺動脈平滑筋細胞の中には、粘弾性の高い細胞群と正常の粘弾性の細胞群とが存在することが明らかとなった。さらに、この粘弾性の高い細胞群は、現在臨床応用されている肺血管拡張薬を投与することによって、粘弾性が正常化することが明らかとなった。このような、キャラクターの異なる細胞群がどのように疾患発症に関わっているのか、その分子メカニズムを明らかにすることによって、新たな治療薬開発につながる可能性がある。また、原子間力顕微鏡を用いた系によって、薬剤が肺動脈平滑筋細胞に有効に作用することをin vitroで検証できることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Recently, it was reported that the compliance of proximal pulmonary artery wall played important roles in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH) as well as distal pulmonary vascular resistance did. However it was still unknown how the elasticity of pulmonary arterial smooth muscle cell (PASMC) itself can be affected in the patients of PAH. In this study, we revealed that there was a high elasticity population in PASMC of PAH patient. Additionally, Sildenafil, a drug for PAH could reduce the population of high elasticity in PASMC derived from PAH patients.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 肺動脈平滑筋細胞 原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症は、種々の要因によって引き起こされる末梢肺小動脈の狭小化と、それに伴う肺血管抵抗の上昇が疾患の本態とされている。肺高血圧症患者では、肺動脈内皮細胞の機能障害や平滑筋細胞の異常増殖による血管狭窄・閉塞がみられる。現在行われている薬物治療の主眼は、末梢肺動脈拡張因子（一酸化窒素-cGMP系、プロスタノイド系）の誘導と収縮因子（エンドセリン系）の抑制に置かれており、臨床的には右心カテーテル検査の結果から得られる肺動脈圧や肺血管抵抗値（Pulmonary Vascular Resistance; PVR）が肺高血圧症の重症度評価や治療効果の判定に頻用されている。

一方、最近の研究によって、中枢側肺動脈の硬化（血管キャパシタンスの低下）が肺高血圧症の重症度を左右する独立した要因であることが明らかになってきた。しかし、中枢側肺動脈の硬化を直接的に定量化した報告はなく、硬化を引き起こす機序も明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は以前より肺高血圧症の研究を行っており、重度の小児肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞株を樹立して、正常ヒト肺動脈平滑筋細胞株と比較することで、細胞レベルでの生物学的な検討を行ってきた。

一方、細胞の局所的な「硬さ（弾性）や粘弾性（レオロジー）」を測定する方法の一つに原子間力顕微鏡法（Atomic Force Microscopy, AFM）がある。しかし従来、同一細胞株の個々の細胞でさえも粘弾性に大きなばらつきがあり、それを定量化する方法がなかった。我々は、マイクロアレイ上に細胞を播種し個々の細胞の形状を整える手法を用いることで、正確な粘弾性測定を行うことを可能としている。

そこで、本研究では、肺高血圧症患者由来の中枢側肺動脈平滑筋細胞と肺高血圧症モデルラットの中枢側肺動脈組織を用いて、AFMで細胞と組織の粘弾性の定量化し、肺動脈キャパシタンスが肺高血圧症に及ぼす影響と、既存の肺高血圧症治療薬が中枢側肺動脈キャパシタンスに与える効果について検討する。

3. 研究の方法

我々のグループではすでに、重度の肺動脈性肺高血圧症のため脳死肺移植になった患者の摘出肺より、中枢側肺動脈由来の平滑筋細胞（PAH-PASMC）を単離・培養する系を確立しており、健康人由来の中枢側肺動脈平滑筋細胞も確立している（N-PASMC）（本学倫理審査委員会承認済み）。これをマイクロ加工基盤上に播種し、個々の細胞の形状を整えた上で、AFMを用いた定量的な細胞力学計測を行う。

次に、既存の肺高血圧症治療薬を投与したうえでの細胞の粘弾性測定を行う。これを、正常の肺動脈平滑筋細胞と比較する。これにより、中枢側肺動脈平滑筋細胞におけるレオロジーの変化が臨床における患者検体で確認できるかどうかを検討する。

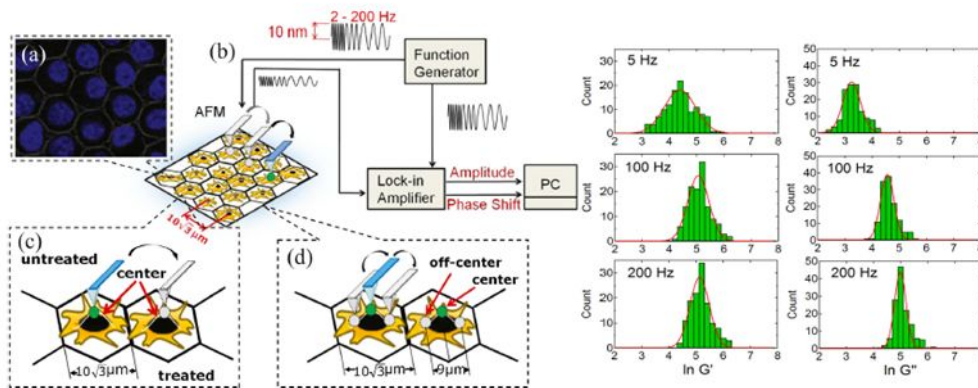
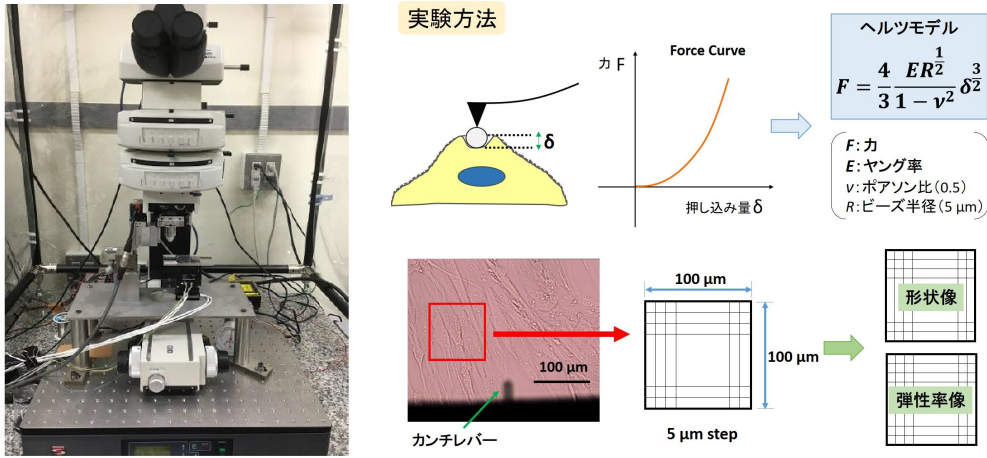


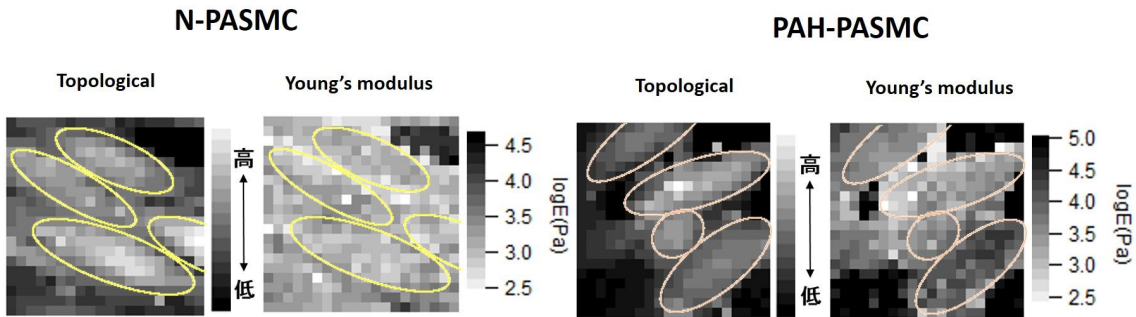
図 細胞マイクロアレイを用いた AFM による細胞レオロジー測定の実験

(a) 細胞マイクロアレイ上の配列化された細胞の顕微鏡写真。(b) 細胞マイクロアレイを用いた AFM 測定の実験図。AFM のフォースモジュレーションモードを用いて、個々の細胞レオロジーを測定する。(右) 線維芽細胞 (NH3T3 細胞) の貯蔵弾性率 G' (左) と損失弾性率 G'' (右) の細胞数分布。周波数は、上から、5、100、200 Hz である対数正規分布に近い分布を示す。

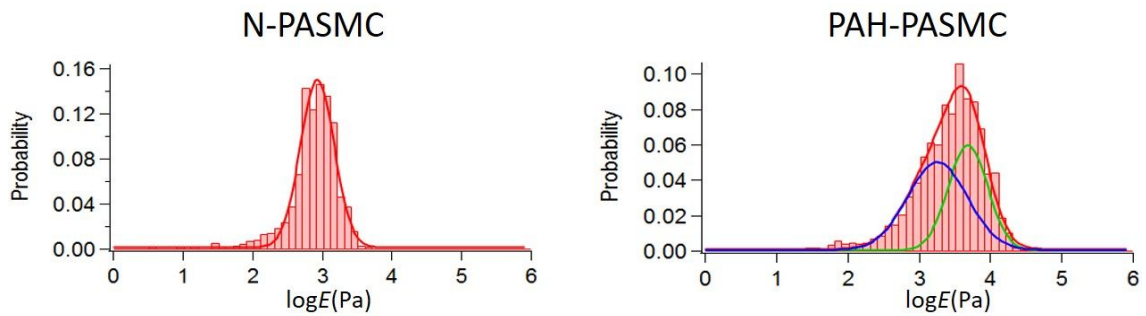


4. 研究成果

AFM を用いて N-PASMC と PAH-PASMC の弾性率のマッピング測定を行った。形状像と弾性率像を以下に示す。

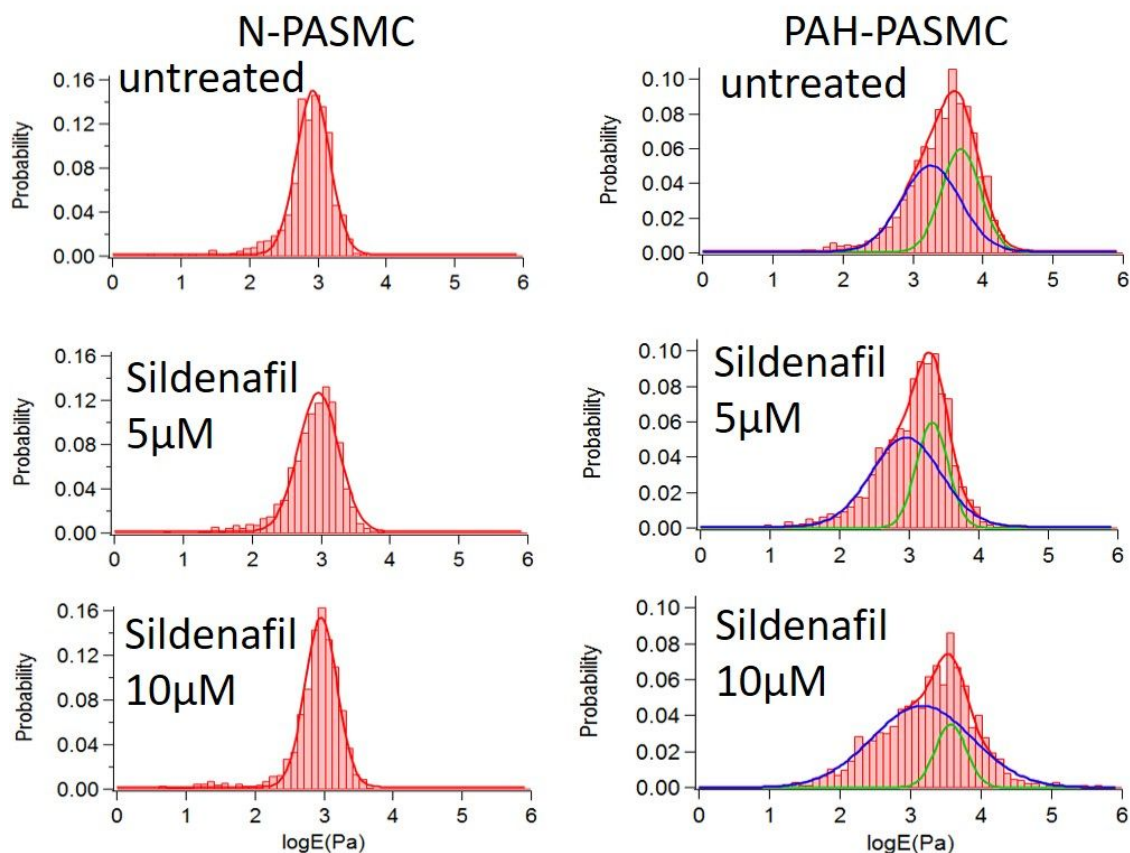


PASMC および PHSM の弾性率ヒストグラムを以下に示す。



N-PASMC の弾性率是对数正規分布となり、PAH-PASMC の弾性率は 2 つの対数正規分布の重ね合わせになることが分かった。

次に N-PASMC および PAH-PASMC の、薬剤添加における弾性率ヒストグラムを以下に示す。PAH-PASMC は 2 つの分布が見られたため、すべて 2 つのガウス分布でフィッティングを行った。



N-PASMC は、薬剤添加による分布の変化は見られなかった。PAH-PASMC は、4 条件すべてにおいて 2 つの分布が見られた。また、10µM Sildenafil 添加では他の 3 条件と比較して、弾性率がより低い分布の比率が高かった。

以上の結果により、PAH 患者由来肺動脈平滑筋細胞においては、粘弾性の高い細胞と正常の細胞の 2 群が存在し、また、肺血管拡張薬投与によって、濃度依存的に粘弾性の高い細胞の割合が減少することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

第 1 回 日本循環器学会基礎研究フォーラム 18.1.6, 奈良
Microarray-based atomic force microscopy revealed rheological features of pulmonary hypertension

桂木慎一, 石田秀和, 辰巳奈央, 成田淳, 岡嶋孝治, 小垣滋豊, 大園恵一

第 24 回日本小児肺循環研究会: 18.02.03, 東京
原子間力顕微鏡を用いた肺動脈性肺高血圧症における肺動脈平滑筋細胞のレオロジー解析
桂木慎一, 石田秀和, 辰巳奈央, 成田淳, 岡嶋孝治, 小垣滋豊, 大園恵一

第 54 回 日本小児循環器学会総会・学術集会: 18.07.05-07, 横浜
原子間力顕微鏡を用いた肺動脈性肺高血圧症における肺動脈平滑筋細胞のレオロジー解析
桂木慎一, 石田秀和, 辰巳奈央, 成田淳, 小垣滋豊, 岡嶋孝治, 大園恵一

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡嶋 孝治

ローマ字氏名：OKAJIMA TAKAHARU

所属研究機関名：北海道大学

部局名：大学院情報科学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70280998

(2)研究協力者

研究協力者氏名：桂木 慎一

ローマ字氏名：KATSURAGI SHINICHI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。