

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2009
課題番号：18590827
研究課題名 (和文) 実験的肺動脈性高血圧症の細胞外スーパーオキシド・ディスムターゼによる抑制
研究課題名 (英文) Gene Transfer of Human Extracellular Superoxide Dismutase Prevents Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats
研究代表者
太崎 博美 (TASAKI HIROMI)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：60216950

研究成果の概要 (和文)：肺高血圧症に対する新しい治療を検討するために、「細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (ECSOD) の遺伝子導入が、モノクロタリン誘発性肺高血圧症の進展を予防する」という仮説を証明した。方法は、SD ラットにモノクロタリン皮下注射を行い、同時に Adeno ウイルスに組み込んだ ECSOD を経気管的に投与し、圧や組織を比較した。その結果 ECSOD 遺伝子治療群では、28 日目の肺微小動脈のリモデリングを伴った右室収縮期圧上昇及び右室肥大や肺動脈血管平滑筋細胞増殖を有意に抑制した。

研究成果の概要 (英文)： In the present study, we examined whether intratracheal gene transfer of human extracellular superoxide dismutase (ECSOD) could ameliorate monocrotaline (MCT)-induced PAH in rats. MCT-injected rats were concomitantly intratracheally administered vehicle (MCT group), an adenovirus expressing β -galactosidase (Ad β gal group), or human ECSOD (AdECSOD group). Twenty-eight days after the MCT injection, right ventricular systolic pressure and the weight ratio of the right ventricle to the left ventricle plus septum were significantly lower in the AdECSOD group. As the mechanism of these effects, 8-isoprostane in lung tissue was significantly reduced in the AdECSOD group. ECSOD overexpression to the lung ameliorated MCT-induced PAH in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	300,000	90,000	390,000
2009 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：肺高血圧症、スーパーオキシドジスムターゼ、モノクロタリン、遺伝子治療、ECSOD

1. 研究開始当初の背景：動脈性高血圧症 (PAH) は最終的に前毛細管肺動脈

(precapillary pulmonary arteries) の病理学的変化を伴い、右心不全や死亡の原因となる肺動脈圧の進行性上昇である。その

病因は完全には解明されておらず、可能な治療は限られ、しばしば著明な副作用を認める。最近の研究ではスーパーオキシドやその他の reactive oxygen species (ROS) といった増加した酸化ストレスが PAH の病因または進展に関与している可能性が示唆されている。酸化的組織損傷の調節における重要な抗酸化酵素の一つのファミリーがスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) である。その中で CuZnSOD の細胞外形式 (形態) である細胞外スーパーオキシドジスムターゼ (ECSOD) が存在する。NO bioavailability の主要な決定因子である ECSOD は細胞外抗酸化システムにおいて中心的な役割を担っていると考えられる。

ECSOD 過剰発現マウスは高酸素、ブレオマイシン、放射線による肺損傷を軽減し、そして、ECSOD 欠損マウスは出血性肺損傷を増悪させると報告された。これらの結果は ECSOD の調節が様々な肺疾患の病因を調節または予防することにおいて重要である可能性を示している。しかしながら、PAH における ECSOD の役割は明らかにされていない。

2. 研究の目的

ECSOD の遺伝子導入が、肺高血圧症の動物モデルであるモノクロタリン誘発性肺高血圧症の進展を予防する」という仮説を証明し、肺高血圧症に対する新しい治療手段を提示することを目的とした。

3. 研究の方法

SD ラットにモノクロタリン皮下注射を行い、同時に vehicle (対照群) 及び Adeno ウイルスに組み込んだ β -galactosidase (ウイルス対照群)、ECSOD (ECSOD 群) を経気管的に投与した。

(1) MCT Treatment

アルカロイド MCT (Sigma Chemical Co) は 0.5N HCl で溶解され、1N NaOH で中和された。MCT 溶液は雄 Sprague-Dawley (SD) ラット (Kyudo, Saga, Japan; 275 to 300g body weight) に単一皮下投与された (40 mg/kg body weight)。対照ラットは等量生理食塩水が投与された。全てのラットは一定温度 (~22 °C) および 12-h dark/12-h light cycle の状態で飼育され、標準食および水が与えられた。

(2) Recombinant Adenoviral Vectors

人 ECSOD およびコントロールとして β -galactosidase を発現する複製—欠損アデノウイルス (両方ともにサイトメガロウイルスプロモーター) が用意された。全ての

組み換えアデノウイルスはプラーク精製され、そしてウイルス力価は HEK293 細胞におけるプラーク分析により決定された。ウイルスは使用まで -80 °C で保存された

(3) Gene Transfer to SD Rats

ラットはナトリウムペントバルビタール (30 mg/kg, IP) の腹腔内投与により麻酔された。挿管後、経気管的に MCT 治療ラットには人 ECSOD 発現アデノウイルスまたは β -galactosidase 発現アデノウイルス (いずれも 3×10^9 plaque-forming units) を投与し、対照ラットには 0.5 ml の生理食塩水を投与した。ラットは低換気を減弱させるためにおよそ 3 分間、tidal volume 3 ml および 1 分間 50 respiration の速度で room air にて人工換気された。ラットは投与後 30 分以内に目覚め始め、遺伝子導入中および抜管後に副作用は観察されなかった。

最初に予防プロトコールでは、動物は MCT 治療に引き続き AdECSOD または Ad β gal 遺伝子導入が行われた。この予防プロトコールでは、MCT 投与 (治療) ラットの生存における AdECSOD の効果を確かめた。MCT 投与 (治療) の日が day 0 として定義された。次に治療プロトコールでは、重症肺高血圧症がすでに確立されている MCT 治療 28 日後に動物は AdECSOD または Ad β gal 遺伝子導入が行われた。

(4) Measurements of ECSOD Concentration

肺組織、気管支洗浄液および血漿の ECSOD 濃度を我々が以前報告した通り a two-step ELISA により測定した (19)。この ELISA system は他の SOD isoform に cross-reactivity がないことを証明した。肺組織、気管支洗浄液および血漿の ECSOD 濃度の経時変化を day 0、1、3、5、7、14、21 そして 28 で決定した。

(5) Hemodynamic Measurements and Assessment of RV hypertrophy

(テイルカフ法により覚醒時の収縮期血圧および心拍数が測定された。) ラットはナトリウムペントバルビタール (40 mg/kg, IP) で麻酔され、人工呼吸された。小正中胸骨切開術 (small median sternotomy) が行われ、右室収縮期圧 (RVSP) が 23-gauge 針および圧トランスデューサーを用い、28 日目 (day 28) に測定された。心臓は切除および重量が測定され、右室肥大の指標として、the ratio of the RV weight to left ventricle plus septum weight (RV/[LV+S] weight ratio) が計算された。

(6) Morphometric Analysis of Pulmonary Arteries

血行動態測定後、肺組織は形態分析のために用意された。直径 15-50 μm の小動脈においてヘマトキシリンエオジン染色および *elastica van Gieson* 染色により肺微小血管の筋層化 (muscularization) が評価された (21, 22)。各ラットに対し、30-40 の肺微小血管が数えられ (評価され)、平均が計算された。直径 50 μm 以上の動脈においては 400 倍の拡大率で中膜壁肥厚 (medial wall thickness) の測定により評価された。各動脈に対し、medial wall thickness は次の通り表現された: medial wall thickness = [(medial thickness \times 2) / external diameter] \times 100 (%) (20, 21)。各ラットに対し、10-12 の血管が数えられ (評価され)、平均が計算された。

(7) Immunohistochemistry

Ad β gal 投与 3 日後、 β -galactosidase 発現は X-Gal staining (X-Gal staining kit; OZ Biosciences) により評価された。肺切片は光学顕微鏡により β -galactosidase の陽性染色 (blue nuclei) として確かめられた。また、AdECSOD 投与 3 日後、肺における人 ECSOD 発現の分布が antibody-linked dextran polymer method (Envision, DAKO) を用いた免疫染色にて評価された。簡単に言えば、AdECSOD 形質移入肺は 10%ホルマリン中性バッファー溶液で固定、パラフィン包埋され、7 μm -thick sections にカットされた。内因性ペルオキシダーゼは過酸化水素で阻害され、それから切片は蛋白遮断血清 (protein-blocking serum) により阻止 (遮断) された。ECSOD 免疫染色に対し、切片はラビット抗 ECSOD 抗体 (rabbit anti-ECSOD antibody) の 1:50 希釈を用い、一晚 4 度でインキュベートされた。HRP 結合二次抗体システムが信号検出のために使用された。

Day 28 においてコントロール群および予防プロトコールにおける Ad β gal 群、AdECSOD 群で免疫組織化学的分析が行われた。増殖性細胞は proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色 (DAKO)、アポトーシス細胞は terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method (apoptosis detection kit, Chemicon) により評価された。各切片 10 fields における PCNA 陽性細胞および TUNEL 陽性細胞の数が盲目的に 400 \times の倍率で全細胞数の比率として定量的に評価された。

4. 研究成果

結果は、免疫染色で気道表皮細胞、肺胞表皮細胞での遺伝子発現を確認証明した。 両対

照群では、28 日目に肺微小動脈のリモデリングを伴った右室収縮期圧上昇及び右室肥大を認めた。一方、ECSOD 遺伝子治療群では、血管リモデリング、右室収縮期圧上昇、右室肥大進展を統計学上有意に抑制した。また、本研究は、肺高血圧症の進展予防機序として、(1) 肺動脈血管平滑筋細胞の増殖は ECSOD 治療群で有意に抑制されること、(2) モノクロタリン誘発性肺高血圧症の進展初期に増加した肺組織中の活性酸素種 (8-isoprostane) は ECSOD 治療群で有意に減少されること、(3) eNOS 発現が対照群では減少するが、ECSOD 遺伝子治療群では減少しないことを示唆した。

(1) Expression of β -Galactosidase and ECSOD Introduced by Gene Transfer

遺伝子導入 3 日後、X-Gal 染色および抗 ECSOD ポリクローナル抗体を用いた免疫染色を行った。 β -Galactosidase (blue nuclei) および ECSOD (brown nuclei) は大部分が気道表皮細胞と肺胞表皮細胞に発現しており、その他、小肺動脈にも発現していた (Figure 1a, c?)。 β -Galactosidase 染色 (β -galactosidase 陽性染色) は溶媒または ECSOD 発現アデノウイルスが投与されたラットより取り出した肺では観察されなかった。

AdECSOD を用いた形質移入後 1, 3, 5, 7, 14, 21 そして 28 日での肺組織、気管支洗浄液および血漿 ECSOD 濃度の経時変化が決定された。AdECSOD 治療ラットにおいて、肺組織 ECSOD 濃度は 1 日目より上昇し、5 日目で最も高値を示し、21 日間を通じて次第に減少したのに対し、気管支洗浄液および血漿 ECSOD 濃度は 5 日目に一過性の発現高値を示した (data not shown)。5 日目のこれらの値 (肺組織、気管支洗浄液および血漿 ECSOD 濃度) は Control 群および Ad β gal 群の値より著明に高値であった。

(2) Effects of AdECSOD on the MCT-Induced PAH

Ad β gal 群は Control 群と比較して 28 日目 (day 28) に上昇した RVSP (a marker of systolic pulmonary pressure) と著明な右室肥大 (RVH) をもつ重症 PAH になった。AdECSOD 群は 28 日目 (day 28)、MCT 誘発性 PAH の進展および RVSP と RVH における MCT 誘発性の増加を著明に抑制した。

28 日目 (day 28)、Ad β gal 群、AdECSOD 群における体重は Control 群と比較して有意に低値であった ($P < 0.01$, $P < 0.01$, respectively)。しかしながら、AdECSOD 群における体重は AdECSOD 群と比較して有意に高値であった ($n=8$, 410.2 ± 6.0 mg in

the AdECSOD group; $n=8$, 371.0 ± 12.2 mg in the Ad β gal group, $P<0.05$). また、テイルカフ法で測定した覚醒時の収縮期血圧は3群間で差は認めなかった ($n=5$, 112.8 ± 12.0 mm Hg in the Control group; $n=5$, 112.1 ± 1.0 mm Hg in the Ad β gal group; $n=5$, 110.1 ± 2.7 mm Hg in the AdECSOD group)。予防プロトコールにおいて、8ヶ月のfollow-up期間の生存率はAdECSOD群とAd β gal群に有意差は認めなかった ($n=12$, 83% in the AdECSOD group; $n=12$, 83% in the Ad β gal group)。

(3) Inhibitory Effects of AdECSOD on the MCT-induced Medial Wall Thickening

Control群と比較して、肺動脈の中膜壁肥厚はAd β gal群で著明であったが、AdECSOD群はMCT誘発性中膜壁肥厚を予防した。我々は付随して肺微小血管 (15 to 50 μ m vessels) のmuscularizationの程度を評価した。なぜなら、肺微小血管はふつう定常状態 (normal condition) ではnonmuscularだからである。AdECSOD群はday 28でMCT誘発性muscular pulmonary microvesselsの増加を著明に抑制した。我々はまた直径50~100 μ m, 101~200 μ mの範囲で別々に (分けて) 肺動脈の中膜壁厚を定量化した。AdECSOD群はday 28で両方の大きさの肺動脈のMCT誘発性中膜壁肥厚を予防した。

我々は次に肺動脈の血管平滑筋細胞におけるAdECSODの効果を評価した。増殖性細胞は抗PCNA抗体を用い、アポトーシス細胞はTUNEL methodにて免疫染色的に検出された。Day 28、血管平滑筋細胞におけるPCNA陽性細胞の比率はAd β gal群で増加したが、MCT誘発性PCNA陽性細胞増加はAdECSOD群では著明に減少した。一方、アポトーシス陽性細胞は3群間で明らかな差は認めなかった。

(4) Effects of AdECSOD on the Established PAH

動物はMCT治療28日後にAdECSODまたはAd β gal遺伝子導入が行われ、その14日後 (day 42) に治療効果の検討が行われた。AdECSOD群はAd β gal群と比較してRVSPに明らかな差はなかったけれど ($n=5$, 64.6 ± 6.0 mmHg in the AdECSOD group; $n=4$, 64.8 ± 2.9 mmHg in the Ad β gal group)、RVHの程度 ($RV/[LV+S]$ weight ratio) は低い傾向であった ($n=5$, 0.40 ± 0.04 in the AdECSOD group; $n=4$, 0.56 ± 0.07 in the Ad β gal group)。加えて、AdECSOD群はAd β gal群と比較して肺微小血管における

MCT誘発性muscularizationの増加および径50~100 μ mの肺動脈におけるMCT誘発性中膜壁肥厚を有意に抑制した。

この研究はECSODを用いた遺伝子治療がMCT誘発性PAHを予防するということを証明した。

血管平滑筋細胞増殖抑制といった様々な機序を介して

PAHの進展におけるoxidative stressの関係(関与)は依然として不明のままである。しかしながら、最近、増加したoxidative stressがPAHの病因または進展に関与している可能性が示唆されている。Bowers Rらは重症PAH患者から取り出した肺にnitrotyrosineが広範に発現していることを報告し、Cracowski JLらはPAH患者でarachidonic acidのlipid peroxidation productsであるisoprostanesが増加していると報告した。また、PAHの動物モデルであるMCTモデルにおけるPAHはnitric oxideのlow bioavailabilityに関連しており、進展機序にoxidative stressが関与している可能性が示唆されている。

肺における主要な細胞外抗酸化酵素であるECSODの有用な効果を我々は基礎および臨床研究において報告してきた。更に、ECSODは高酸素、ブレオマイシン、放射線、出血による肺損傷において重要な役割を担っている可能性が示唆されている。このようにECSODの調節が様々な肺疾患の病因を調節または予防することにおいて重要である可能性があるけれど、PAHにおけるECSODの役割が依然として不明である。この研究では肺に対するECSOD過剰発現がラットにおけるMCT誘発性PAHの進展を改善するかどうかを確かめた。ラットの肺組織や肺動脈は他種(他の動物)と比較して内因性ECSODが非常に少ないため、PAHにおけるECSODの効果を効率よく確かめるためにラットモデルを選択した。

肺に対する遺伝子導入方法としてintraluminal and intratracheal methodsが使用されてきた。Intraluminal methodと比較してintratracheal methodは血行動態に及ぼす影響が少ないことから、いくつかの研究はintratracheal methodを用いた肺に対するアデノウイルス仲介遺伝子導入がPAHにおいて価値ある治療方法 (approach) かもしれないと示唆している。このような背景から、我々はこの研究において経気管投与を選択し、結果としてAdECSODまたはAd β galの気道表皮細胞、肺胞表皮細胞における広範な遺伝子発現および微小肺動脈における発現を認めた。この結果は、以前の論文結果と一致(首尾一貫)していた。経気管投与された遺伝子が肺微

小動脈に発現する機序は不明であるが、肺切片の免疫生化学的所見は微小肺動脈における遺伝子発現を証明している。更に、ECSOD 形質移入ラットにおける血漿 ECSOD 濃度は 5 日目に最も高値を示し、この値は対照ラットまたは β -galactosidase 形質入ラットでの ECSOD 濃度と比較して著明に高値であった。この結果は経気管投与が確かに血管床における脈管周囲および abluminal sites への導入遺伝子伝達を可能にすることを示唆している。

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 1 件)

① Kamezaki F, Tasaki H, Yamashita K et al Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. Am J Respir Crit Care Med.177; 219-226,2008 (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

① Kamezaki F, Tasaki H et al. Gene Transfer of Human Extracellular Superoxide Dismutase Ameliorate -Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. AHA meeting, Orlando, 2007, 11.6

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太崎 博美 (TASAKI HIROMI)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：60216950

(2) 研究分担者

山下 和仁 (YAMASHITA KAZUHITO)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：00341496

(3) 連携研究者

筒井 正人 (TSUTSUI MASATO)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号：70309962