

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08276

研究課題名(和文)原子間力顕微鏡を用いた肺高血圧症のin vitro薬剤反応評価システムの構築

研究課題名(英文)In vitro pharmacological assessment of pulmonary arterial hypertension by atomic force microscopy

研究代表者

小垣 滋豊(Kogaki, Shigetoyo)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00311754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺動脈性肺高血圧症患者の肺移植時に採取した肺動脈平滑筋細胞とドナー肺のトリミングで出た余剰組織から樹立した肺動脈平滑筋細胞とを用いて、原子間力顕微鏡により、細胞の機械的特性について検討した。これまで臨床応用されている薬物を用いて、薬剤を平滑筋細胞に添加した場合に、細胞のレオロジーがどのように変化するか検討した。代表的なPDE5阻害薬であるシルデナフィルでは、肺高血圧症患者の肺動脈平滑筋細胞のみ細胞弾性率が低下した。マシテンタンおよびリオシグアトを添加すると、用量依存的に細胞弾性率の低下と細胞流動性の上昇がみられた。両者を同時に添加すると、より低い薬物濃度で弾性率の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺動脈性肺高血圧症患者から採取した肺動脈平滑筋細胞に対して、原子間力顕微鏡を用いたて、細胞の硬さや流動性を評価することにより、肺血管拡張薬の効果を評価することが可能であった。健常の人から採取した肺動脈平滑筋細胞では、薬物投与により肺動脈平滑筋細胞の硬さが変化することはなかったが、患者由来の肺動脈平滑筋細胞では、薬剤の投与により、細胞の硬さや流動性が変化した。複数の薬剤を同時に加えると、薬剤の相加効果が確認された。これは臨床現場で行われるコンビネーション治療の有用性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We established primary culture lines of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) from a patient of idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) and a healthy control PASMC from donor lung. We analyzed their cellular mechanical properties by using atomic force microscopy. We administered the clinical available pulmonary vasodilators, then analyzed the cellular rheology of PASMCs. Sildenafil, a phosphodiesterase 5 inhibitor, could reduce cellular elasticity of PAH-PASMCs. Macitentan and riociguat could also reduce the cellular elasticity and could increase cellular fluidity of PAH-PASMCs. The combination therapy of macitentan and riociguat could effectively reduce cellular elasticity in lower concentration of the drugs, suggesting that the usefulness of combination therapy in PAH treatment.

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 肺血管拡張薬

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension: PAH) は、種々の要因によって引き起こされる肺動脈の狭小化と、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。PAH 患者では、肺動脈内皮細胞の機能障害とそれに伴う平滑筋細胞の過剰収縮、そして異常増殖による血管狭窄・閉塞がみられる。この20年ほどの間に肺血管をターゲットとした多くの血管拡張薬が開発され、PAH 患者の予後は目覚ましく改善してきた。しかし、複数の肺血管拡張薬による combination therapy が行われるようになった現在においても、その5年生存率は70%程度と到底満足できるものではない。現在行われている薬物治療の主眼は、血管拡張因子 (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、一定の効果を上げているが、さらなる新たな治療ターゲットに対して、新規薬剤の開発が現在も世界中で進行中である。

近年の新規薬剤開発の潮流として、*in silico* で絞り込んだ候補化合物から、より有効性の高い化合物を効率的にスクリーニングするため、より安価かつ簡便で、スピーディな実験方法が求められる。従来、血管拡張作用を実験的に検証する場合は、動物より取り出した血管リングに対して溶媒中に候補薬剤を添加した上で、その弛緩の程度を力学的に計測する方法が一般的であった。しかし、この方法は非常に手間と時間がかかる上、多くの動物 (ラットの肺動脈が一般的に用いられる) の犠牲が必要になるため、金銭面だけでなく、近年の動物愛護の方針からも好ましくないとと言える。また、ラットやマウスなどのげっ歯類に対する薬剤反応性がヒトの肺動脈の薬剤反応性と同等であるという保証はない。そこで、*in vitro* で候補化合物のヒト肺血管拡張能を効率的に測定できるシステムの確立が求められている。そこで私達は、細胞レオロジー (粘弾性) を測定するシステムである原子間力顕微鏡によって、*in vitro* で肺血管平滑筋細胞の薬剤反応性を検証するシステムを構築できないかと考えた。

原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) は、カンチレバーの先端に装着したプローブと細胞サンプルとを接触させ、カンチレバーのたわみ量をレーザーの反射波で測定し、サンプルの局所領域の力学特性を測定することができるシステムである (図1)。AFM プローブと細胞とは間欠的な物理接触であるため、接着細胞への侵襲度は小さいという利点をもつ。しかし、これまで AFM による細胞測定は個々の細胞間での測定誤差が大きいという問題があった。そこで私達は、定量的な細胞力学計測を実現するために、マイクロ加工基板を用いた AFM 計測法を考案した (図2: Cai et al. *Biophys J.* 2013; Hiratsuka, et al. *Ultramicroscopy.* 2009)。マイクロ加工基板の上に播種した細胞は、個々の細胞の形状が整っているため細胞粘弾性を容易かつ正確に計測することができる。

図1. 原子間力顕微鏡(AFM)による細胞の粘弾性測定

AFM プローブは間欠的に細胞表面に接触し、カンチレバーのたわみを側方から照射するレーザーの反射波を計測することで定量化する。

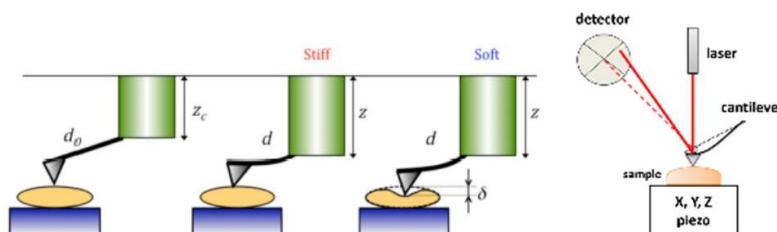
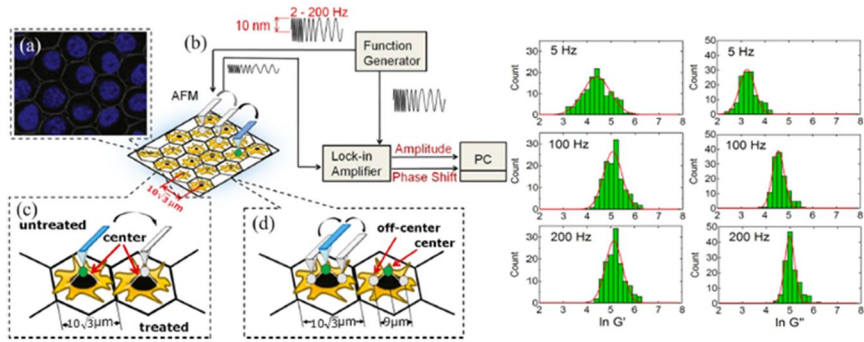


図2. 細胞マイクロアレイを用いた AFM による細胞粘弾性測定の実験

(a) 細胞マイクロアレイ上の配列化した細胞の顕微鏡写真。(b) 細胞マイクロアレイを用いた AFM 測定の実験概念図。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。線維芽細胞の貯蔵弾性率 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 で対数正規分布に近い分布を示す。



実際に計測された値から以下の計算式を用いて Young's modulus を算出する。これらの対数値を横軸として、100 200 個の細胞について粘弾性の分布を描出する。

$$F = \frac{1}{\sqrt{2}} \frac{E \tan \alpha}{(1 - \nu^2)} \delta^2$$

F : loading force
E : Young's modulus
 α : half angle of the cantilever tip
 ν : Poisson's ratio of the cell
 δ : indentation depth

2 . 研究の目的

本研究では、PAH 患者由来平滑筋細胞に対して AFM を用いることで、既存の各種肺血管拡張薬が肺血管平滑筋細胞にどのように作用するか検証することで、薬剤に対してその効果を確認する *in vitro* の系として利用可能であるかどうかを検証する。また、2 種類以上の薬剤を同時に添加することで、臨床では普通用いられる combination therapy の最適な組み合わせの確認に用いることができるのかを検討する

3 . 研究の方法

細胞は、当院で脳死肺移植術の際に摘出された PAH 患者肺の肺動脈と、健常ドナー肺の肺動脈でトリミングのために廃棄される部分、から単離培養した肺血管平滑筋細胞を用いた。この患者検体の研究利用に関しては、本学倫理審査委員会の承認を得ている (承認番号 15118)。まず、肺動脈から外膜をピンセットで注意深く剥ぎ取り、内膜側は軽くこするようにして一層を拭い去る。残った中膜組織を細かく分断し、細胞培養皿に密着させた後、ゆっくりと肺血管平滑筋細胞用培地 (CC-2581; Lonza) を注ぐ。約 10 日から 2 週間で肺動脈平滑筋細胞が増殖し、1 回目の継代が可能になる。その後、P5 まで継代して各継代でクライオストックを採取した。(図 3)

実験に使用する細胞は継代数 6 10 までとした。これは、我々の経験では 12 継代を超えると細胞の増殖スピードが次第に低下するからである。細胞は 10cm dish で、80% コンフルエントまで育てた後、AFM 計測用のマイクロアレイ基盤の上に播種した。翌日、培地に各種薬剤を添加し、4 ~ 8 時間培養した後、AFM での計測を行った。本研究では、薬剤としては、現在臨床現場で PAH 患者に使用されている薬剤を使用した。代表的な PDE 5 阻害薬であるシルデナフィル、さらにエンドセリン受容体拮抗薬であるマシテンタン、また

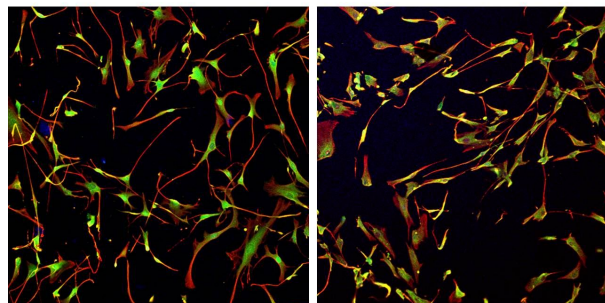
近年新たな cGMP 賦活薬として用いられているリオシグアト、を用いて検証した。さらにこれらの薬剤の combination therapy も臨床ガイドラインでは推奨されており、広く用いられている。そこで、マシテンタンとリオシグアトを組み合わせ投与し、AFM の計測を行うことで、相加的あるいは相乗的な効果があるのか検証を行った。

図3. 我々が単離培養したヒト肺動脈平滑筋細胞

肺動脈平滑筋細胞は脳死肺移植術の際に摘出された患者の肺動脈から、トリミングされて廃棄される健康ドナーの肺動脈から採取する。形態的には両者に差異を認めない。内皮細胞マーカーや線維芽細胞マーカー陰性で、Vimentin 陽性(赤)平滑筋細胞マーカー-smooth muscle myosin heavy chain 陽性(緑)を確認している。

Cells from Donor PA
(健康人由来細胞)

Cells from Recipient PA
(PAH患者由来細胞)



4. 研究成果

(1) .健康人由来肺動脈平滑筋細胞(N-PASMC)と特発性肺動脈性肺高血圧症患者由来肺動脈平滑筋細胞(PAH-PASMC)における弾性率の比較とシルデナフィル添加による弾性率の変化

まず初めに、N-PASMC と PAH-PASMC を用いて、AFM による弾性率測定を行った。それぞれの PASMC において、明瞭な topographic image を描出することが可能であった。また細胞形態に合わせて Young 's modulus を測定した。(図4)N-PASMC と比較して PAH-PASMC では、細胞弾性率が高く、より「硬い」細胞であることが推察された。次に、シルデナフィルを培地に添加し、同様に AFM による弾性率測定を行った。興味深いことに、N-PASMC では、シルデナフィル添加においても細胞弾性率に変化はなかったが、PAH-PASMC では有意に細胞弾性が低下し、シルデナフィルが PAH-PASMC を「柔らかくする」ことが明らかとなった。(図5)

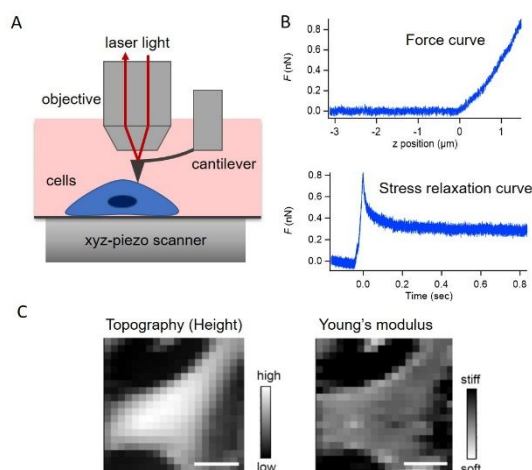


図4. AFM による PASMC の Young's modulus 測定の実験

(A) 測定の様式図 (B) AFM で測定される Force curve の例と Stress relaxation curve の例 (C) AFM の force curve 測定で得られる topographic image と Young's module image の一例. scal bar: 30 μm.

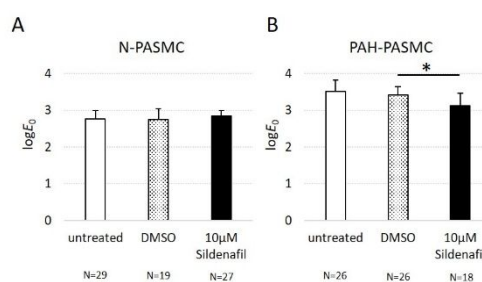


図5. 健康肺動脈平滑筋細胞(N-PASMC)と肺高血圧症患者肺動脈平滑筋細胞(PAH-PASMC)の測定結果

(A) N-PASMC では肺血管拡張薬のシルデナフィルを培地に添加しても弾性率(log E0)は変化しないが、(B) PAH-PASMC では、シルデナフィル添加により、有意に logE0 の低下が認められる。

(2) マシテンタンとリオシグアト添加における細胞弾性率および細胞流動性の変化

次に、PAH-PASMC において、シルデナフィルとは別系統の肺血管拡張薬である、エンドセリン受容体拮抗薬のマシテンタンと、可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬であるリオシグアトを添加した際に、細胞弾性率および細胞流動性がどのように変化するかを、AFM を用いて測定した。

興味深いことに、マシテンタンおよびリオシグアトの両者において、用量依存的に PAH-PASMC の細胞弾性率が低下し、また、細胞流動性が上昇することが明らかとなった。(図 6) 臨床現場においては、エンドセリン系薬剤と NO-cGMP 薬剤の combination therapy が頻用されており、診療ガイドラインにおいてもその有効性から推奨されている。そこで、マシテンタンおよびリオシグアトの両者を同時に添加することで、異なる系統の薬剤の相加効果もしくは相乗効果があるかどうかを検証した。リオシグアト 25 μ M に加えてマシテンタン 10 μ M を添加すると、細胞弾性率は有意に低下したが細胞流動性は変化しなかった。単剤投与より低い薬物濃度で細胞弾性率は変化する可能性が明らかとなり、combination therapy における相加的な効果が示唆された。(図 7)

これらの成果は、Cardiology Research. 2021;12(4):231-237.において発表された。

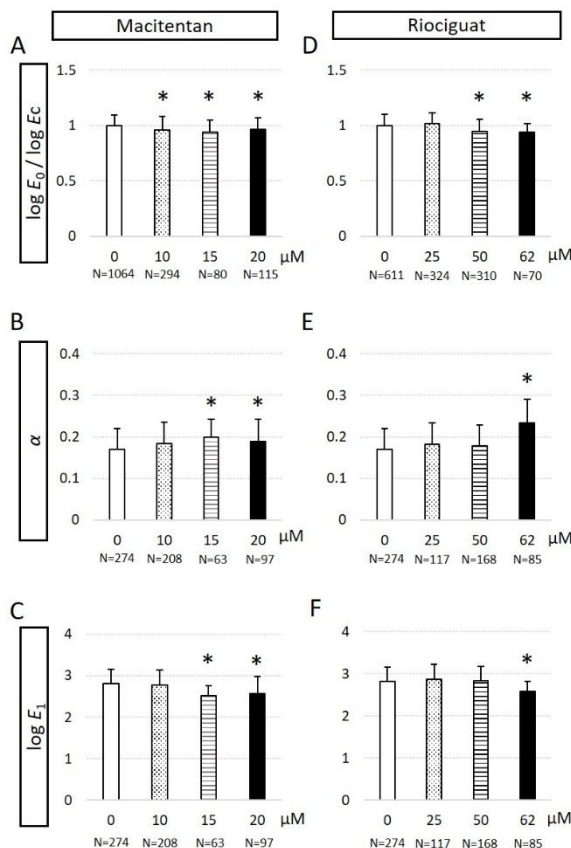


図6. マシテンタンとリオシグアト投与による PAH-PASMC のレオロジー変化

(左列) マシテンタンを 10, 15, 20 μ M 添加した際の、AFM による測定結果、 $\log E_1$ は 15 μ M 以上で有意に減少し、細胞弾性率が低下している。それに対して α は有意に上昇し、細胞流動性が上昇している。(右列) リオシグアトを 25, 50, 62 μ M で添加した際の、AFM による測定結果、 $\log E_1$ は 62 μ M で有意に低下し、細胞弾性率が低下している。 α は 62 μ M で有意に上昇し、細胞流動性が上昇している。* $P < 0.05$.

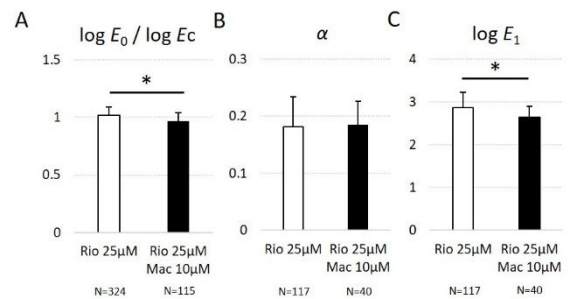


図7. マシテンタンとリオシグアトの combination 投与による PAH-PASMC のレオロジー変化

リオシグアトを 25 μ M 投与した状態からマシテンタンを 10 μ M 添加したところ、 $\log E_1$ は有意に低下し、combination therapy により細胞弾性率を低下させる閾値が下がっていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinichi Katsuragi, Nao Tatsumi, Mizuki Matsumoto, Jun Narita, Ryo Ishii, Hidehiro Suginobe, Hirofumi Tsuru, Renjie Wang, Shigetoyo Kogaki, Ryosuke Tanaka, Keiichi Ozono, Takaharu Okajima, Hidekazu Ishida	4. 巻 12
2. 論文標題 Pharmacological Alteration of Cellular Mechanical Properties in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cardiology Research.	6. 最初と最後の頁 231~237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14740/cr1282.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田 秀和
2. 発表標題 肺血管の分化・発生と肺高血圧症
3. 学会等名 第6回日本肺高血圧・肺循環学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡嶋 孝治 (Okajima Takaharu) (70280998)	北海道大学・情報科学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	石田 秀和 (Ishida Hidekazu) (50467552)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------