

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590256

研究課題名 (和文)

原発性肺高血圧症の発症機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名 (英文)

Study on roles of a novel NADPH oxidase isoform in the development of idiopathic pulmonary arterial hypertension

研究代表者

岩田 和実 (IWATA KAZUMI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60305571

研究成果の概要 (和文)：原発性肺高血圧症は肺動脈の肥厚から肺動脈圧上昇、右心肥大、心不全へと進行する難治性疾患である。活性酸素種の産生酵素である NADPH oxidase の触媒サブユニット Nox1 の遺伝子欠損マウス (Nox1<sup>-/-</sup>) において右心室および肺動脈が肥厚していることを見出した。Nox1<sup>-/-</sup>由来の肺動脈平滑筋細胞ではアポトーシスの抑制が認められ、これは電位依存性カリウムチャネルの一つである Kv1.5 蛋白の発現低下に伴う細胞内カリウム濃度の上昇に起因することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：Pulmonary arterial hypertension is characterized by hypertrophy of small pulmonary arteries, which leads to right ventricular (RV) hypertrophy and heart failure. Nox1 is a catalytic subunit of NADPH oxidase known as a major source of superoxide production in vascular tissues. In *Nox1*-deficient mice (Nox1<sup>-/-</sup>) hypertrophy of small pulmonary arteries and RV wall were observed. A significant decrease in number of apoptotic cells were demonstrated in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) isolated from Nox1<sup>-/-</sup>. Dysfunction of Kv1.5, a voltage-dependent potassium channel, is one of the features reported in human and experimental PAH. A significant decrease in Kv1.5 protein and an increase in intracellular potassium levels were observed in Nox1<sup>-/-</sup> PASMC. These results suggest that Nox1 plays a critical role in apoptosis of PASMC by regulating Kv1.5 expression and intracellular potassium levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：原発性肺高血圧症、活性酸素、NADPH oxidase

## 1. 研究開始当初の背景

原発性肺高血圧症は原因不明の肺動脈圧上昇により右心肥大、心不全へと進行する難治性疾患で、診断確定後の平均生存期間は2.8年、5年生存率は34%と予後不良である。現在肺高血圧症には肺動脈の肥厚および収縮を抑制する目的で一酸化窒素経路の活性化薬物、プロスタノイド誘導体、エンドセリン受容体拮抗薬などが対症療法として用いられているが、発症機序が不明であるため根治的な療法は未だ確立されていない。

申請者らは活性酸素種 (ROS) の産生酵素として近年注目されている NADPH oxidase の触媒サブユニット Nox1 の遺伝子欠損マウス (Nox1<sup>-/-</sup>) を作出し、開胸実験を行っていたところ、Nox1<sup>-/-</sup> の右心室が著明に拡張していることを見出した。心エコーにて確認したところ、右心室/左心室断面面積比は有意に増加しており、組織重量比も Nox1<sup>-/-</sup> で増大していた。さらに肺組織では血管壁の顕著な肥厚および血管平滑筋細胞の増加を認めた。

NADPH oxidase の触媒サブユニット Nox には数種類のホモログが存在する。これまでに Nox2 および Nox4 が肺高血圧症病態モデルで血管壁の肥厚や血管の収縮に関与するという「増悪因子」としての役割が報告されているが、肺高血圧症発症における NADPH oxidase の関与についての報告は無い。申請者が Nox1<sup>-/-</sup> で認めた所見は Nox1 由来の ROS が肺高血圧症の「増悪因子」としてではなく、「発症抑制因子」として働く可能性を示している。

興味深いことに real-time PCR による定量では Nox1 mRNA の肺における発現は他の臓器に比し著しく高い。肺高血圧症の発症には血管壁構成細胞 (内皮、平滑筋および線維芽細胞) の増殖とアポトーシスのバランス破綻による肺動脈肥厚が関与すると考えられている。そこで Nox1<sup>-/-</sup> の肺組織の細胞ターンオーバーを TUNEL 法により検討したところ、アポトーシス細胞の減少を認めた。このことは Nox1 由来の ROS がアポトーシス促進的に働くことにより肺の恒常性を維持しており、Nox1 の欠損は肺高血圧症発症の原因となる可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

申請者らが作出した Nox1 遺伝子組み換えマウスおよびその培養細胞を用いて、肺高血圧症の病態病理とその発症・進展に関与する諸種の生体内因子と Nox1 のクロストークを解析し、肺高血圧症発症機序における Nox1 の役割を分子レベルで明確にする。

## 3. 研究の方法

肺動脈の肥厚はビクトリアブルーによる弾性線維により筋層を有する肺血管の割合を指標に検討した。

肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) のアポトーシスは TUNEL 染色およびフローサイトメーターを用いた subG1 期の細胞数を指標に検討した。

mRNA の発現はリアルタイム PCR 法により、蛋白質の発現はウェスタンブロット法により検討した。

細胞内カリウム濃度はカリウムインジケーターである PBFI-AM を用い蛍光光度から算出した。

レスキュー実験: Nox1 欠損による PAH の発症が Nox1 の遺伝子導入により抑制できるか検討した。Nox1 を高発現するトランスジェニックマウス (TG) と Nox1<sup>-/-</sup> を交配することにより Nox1 遺伝子を導入した。

## 4. 研究成果

申請者は活性酸素種 (ROS) の産生酵素として近年注目されている NADPH oxidase の触媒サブユニット Nox1 の遺伝子欠損マウス (Nox1<sup>-/-</sup>) の右心室が著明に拡張していることを見出した (図1)。心カテーテルを用い右心室の機能について検討したところ18週齢以降の Nox1<sup>-/-</sup> において右心室収縮期圧の上昇が認められた。

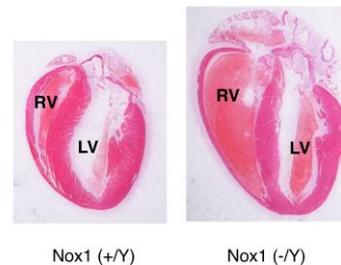


図1 心臓組織所見

また野生型マウス (Nox1<sup>+/-</sup>) では肺において Nox1 の高い発現が認められた (図2)。

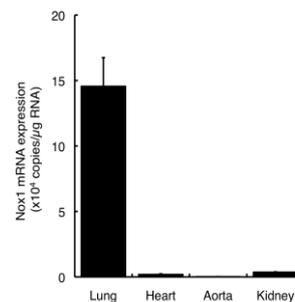


図2 Nox1 発現量

Nox1<sup>-/-</sup>において肺動脈肥厚が9週齢以降において認められた(図3A、B)。

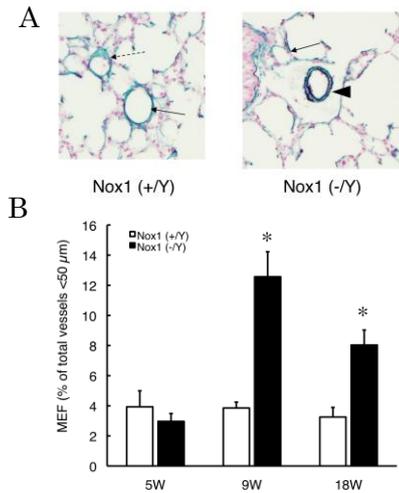


図3 肺血管の肥厚

肺動脈において肺高血圧症の病態に関与するエンドセリンおよび、hypoxia-inducible factors (HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ )の発現はNox1<sup>-/-</sup>とNox1<sup>+/-</sup>に差は認められなかった。また肺高血圧症の増悪に関与すると報告のあるNADPH oxidaseの他の触媒サブユニット(ホモログ)の発現に変化は認められなかった(図4)。

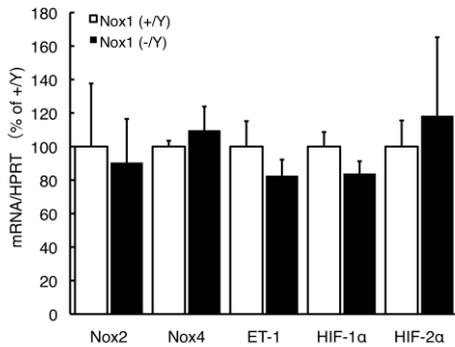


図4 肺動脈における遺伝子発現

肺動脈平滑筋の細胞ターンオーバーの異常が肺高血圧症の発症に関与することが知られている。Nox1<sup>-/-</sup>由来PASM Cの培養細胞ではアポトーシスの指標であるsubG1期の細胞数(図5A)およびTUNEL陽性細胞数(図5B、C)の抑制が認められた。

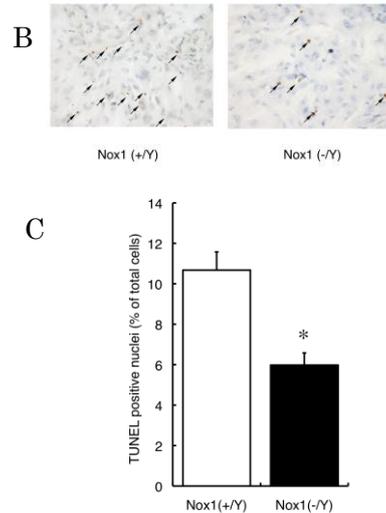
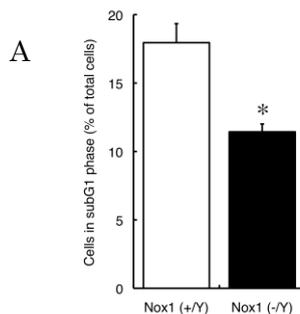


図5 PASM Cのアポトーシス

肺高血圧症患者のPASM Cでは電位依存性カリウムチャネルの一つであるKv1.5の発現低下が、細胞のアポトーシスの抑制を誘導することが知られている。Nox1<sup>-/-</sup>由来PASM CにおいてKv1.5の発現が低下(図6)とともに細胞内のカリウム濃度の上昇(図7A、B)していることを見出した。

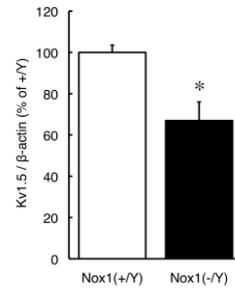


図6 PASM CにおけるKv1.5蛋白の発現

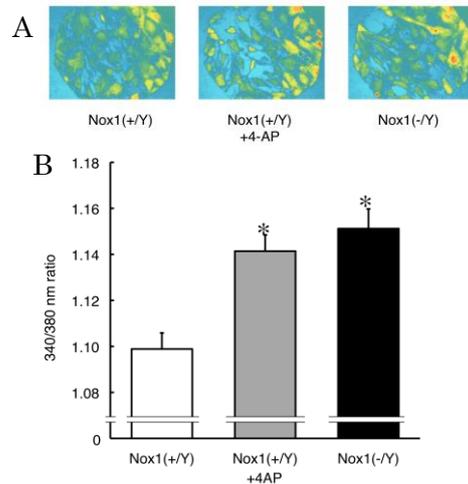


図7 PASM Cにおける細胞内カリウム濃度

また電位依存性カリウムチャンネルの阻害薬 (4AP: 4-アミノピリジン)は PASMC 細胞内のカリウム濃度を上昇させ、アポトーシスを抑制した (図 8)。

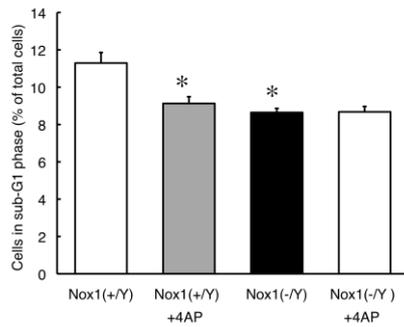


図 8 電位依存性カリウムチャンネル阻害薬によるアポトーシスの抑制

Nox1 を高発現するトランスジェニックマウス (TG) と Nox1<sup>-/-</sup>を交配し、Nox1 遺伝子を Nox1<sup>-/-</sup>に導入したところ、Nox1<sup>-/-</sup>の肺動脈の肥厚、Kv1.5 の発現低下およびアポトーシスは有意に回復した (図 8A、B、C)。以上から Nox1 の活性の低下は Kv1.5 の発現低下を介した細胞内カリウム濃度の上昇を引き起こし、その結果アポトーシスの抑制により肺動脈を肥厚させると考えられる。

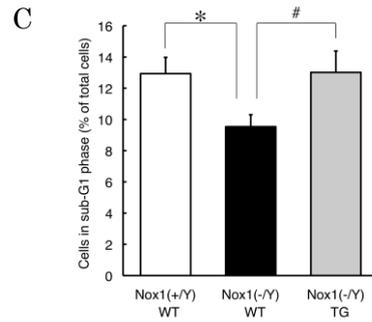
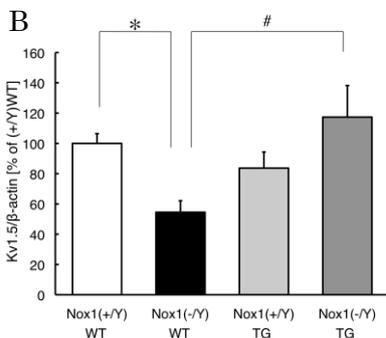
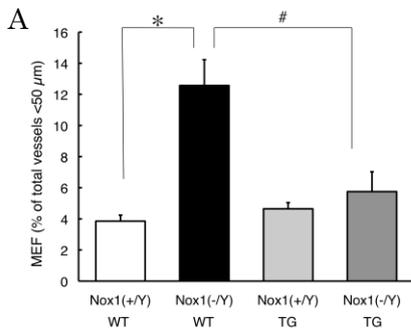


図 8 TG によるレスキュー実験

## 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 3 件)

1) Cevik MO, Katsuyama M, Kanda S, Kaneko T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Kakehi T, Cui W, Sasaki M, Yabe-Nishimura C. The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: Possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 374:351-355, 2008.

2) Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Katsuyama M, Kakehi T, Sasaki M, Ikami K, Zhu K, Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase isoforms and anti-hypertensive effects of atorvastatin demonstrated in two animal models. *J Pharmacol Sci.* 111:260-268, 2009.

3) Kang ES, Iwata K, Ikami K, Ham SA, Kim HJ, Chang KC, Lee JH, Kim JH, Park SB, Kim JH, Yabe-Nishimura C, Seo HG. Aldose reductase in keratinocytes attenuates cellular apoptosis and senescence induced by UV radiation. *Free Radic Biol Med.* 50:680-688, 2010.

[学会発表] (計 4 件)

1) 矢部千尋、松野邦晴、衣斐督和、岩田和実。活性酸素産生酵素 NADPH オキシダーゼの関わる疾患と病態。第 82 回日本薬理学会年会。2009 年 3 月 16 日；横浜。

2) 岩田和実、松野邦晴、矢部千尋。原発性肺高血圧症発症に NOX1/NADPH oxidase が関与する。第 82 回日本薬理学会年会。2009 年 3 月 18 日；横浜。

3) 伊神香菜子、岩田和実、松野邦晴、矢部千尋。NOX1/NADPH oxidase の関わる肺高血圧症の病態分子機構。第 83 回日本薬理学

- 会年会. 2010年3月16日;大阪.  
4) 伊神香菜子、岩田和実、矢部千尋. エンドセリンの細胞増殖作用におけるNOX1/NADPH oxidase の役割. 薬学会第130年会. 2010年3月29日;岡山.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩田 和実 (IWATA KAZUMI)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 60305571

### (2) 研究分担者

松野 邦晴 (MATSUNO HARUKUNI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 50420708

笥 朋子 (KAKEHI TOMOKO)  
京都府立医科大学・医学研究科・プロジェクト研究員  
研究者番号: 20433279

### (3) 連携研究者

なし