

機関番号：34104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590920

研究課題名 (和文) 遺伝子改変マウスを用いた肺高血圧発症機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名 (英文) the research related to the pathogenesis and novel treatment of pulmonary hypertension making use of genetically-modified mouse

研究代表者

丸山 淳子 (MARUYAMA JUNKO)

鈴鹿医療科学大学・医用工学部・教授

研究者番号：50263017

研究成果の概要 (和文)：野生型、CD4 欠損、CD8 欠損マウスのそれぞれに、モノクロタリン (MCT) を投与して、右室肥大測定により肺高血圧重症度を検討し、あわせて肺局所の炎症の程度を検討した。その結果、MCT 投与群ではすべての群で、炎症反応を示唆する所見はあったが、右室肥大をみとめたのは野生型のみであった。以上より、PH 発症には CD4⁺および CD8⁺T 細胞どちらもが重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：To study the role of CD4/CD8 T cell in the pathogenesis of pulmonary hypertension (PH), the severity of lung inflammation and right ventricular hypertrophy (RVH) was evaluated in monocrotaline (MCT)-induced CD4⁻ or CD8⁻ deficient mice as well as wild-type mice. The inflammation responses in lung were observed in all MCT-induced groups, however, RVH were only observed in wild-type mice, not CD4⁻ nor CD8⁻ deficient mice. From all these results, CD4 and CD8 T cell groups might be associated with the development of pulmonary hypertension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：炎症、右室肥大、肺泡洗浄、モノクロタリン、CD4、CD8

1. 研究開始当初の背景

厚生省難病 (特定) 疾患に指定されている原発性肺高血圧症 (idiopathic PH) は、主に肺動脈の血管内皮細胞、血管平滑筋細胞および血管周囲細胞の異常増殖による血管内腔の狭窄・閉塞により肺血管床の低下を

引き起こし、右心不全と重篤な低酸素血症をきたして死亡する非可逆性の疾患である。二次性 PH は、組織の慢性炎症をきたす強皮症、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患患者に高頻度に見られるが、近年、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者におい

でも PH が発症すると報告されている。自己免疫疾患や HIV 感染の病態形成には、いずれも CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞及び CD4⁺T 細胞が関与していることが明らかになっている (J Immunol. 2002 15;168(12):5979-83)。一方、idiopathic PH 患者の肺組織では、血管内皮細胞・平滑筋細胞の増殖、リンパ球、マクロファージ、肥満細胞などの炎症性細胞浸潤、interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor(TNF)- α などの炎症性サイトカインの過剰発現が認められる。また、血中では、IL-1, IL-6 などの炎症性サイトカインの濃度の上昇がみられ、重症度と相関すると報告されている(Am J Respir Crit Care Med 1995;1;1:1628-1631)。さらに、多機能性のサイトカインである IL-6 の投与によりラット肺動脈リモデリングが進行し、PH が発症することもわかっている(Int Arch Allergy Immunol 1995;108:287-291)。最近では、type-2 ヘルパー T(Th2) 細胞や、CD4⁺CD25⁺Fox3⁺制御性 T 細胞などの多様な細胞から分泌される IL-10 が PH の発症を抑制し、生存率を顕著に改善すると報告されている(Circ Res 2007;101:734-741)。以上より、血管障害部位での T 細胞由来サイトカインの過剰発現が PH の病態形成に重要な役割を果たしていることが強く疑われるが、どの T 細胞サブセットがその病態形成に関与しているのか、未だに不明である。そこで、本研究では、マウスモノクローリン(MCT)誘発性 PH モデルを用いて、PH 重症度における CD4⁺および CD8⁺T 細胞サブセットの役割を検討し、その発症機序を明らかにする。

2. 研究の目的

マウスモノクローリン (MCT) 誘発性 PH モデルを用いて、PH 重症度における CR4⁺および CD8⁺T 細胞サブセットの役割を検討し、その発症機序を明らかにする。野生型マウスに MCT を投与することにより PH モデルを作成し、脾臓から分離した T 細胞サブセット PH の重症度との相関を検討する。次に、CD4 欠損マウス、CD8 欠損マウス、CD4CD8 欠損マウスに対して、同様に MCT を投与し、PH の重症度、肺の血管病変、炎症の重症度の変化を野生型マウスと比較する。それぞれのグループで増殖能および活性が動く T 細胞サブセットを同定する。

3. 研究の方法

野生型マウス、CD4⁺欠損マウス、CD8⁺欠損マウスを用いた、モノクローリン誘発性 PH モデルにおける重症度の検討を下記のように行う。

(1) モデル作成と右室圧測定および標本採取

野生型 (WT)、CD4 欠損 (CD4ko)、CD8 欠損 (CD8ko) マウスのそれぞれに 1 週間ごとにモノクローリン (600mg/kg) を計 8 回皮下注射にて投与した。それぞれのコントロール群には生理食塩水を同様の方法で投与した。最終投与 7 日後、ネンブター腹腔内投与により麻酔し、脱血により安楽死させ、肺胞内洗浄 (BAL) を行い、両肺、心臓、脾臓を摘出する。肺は、一部をホルマリンにより固定し、パラフィン標本を作成し、炎症性細胞浸潤の程度を検討した。肺、脾臓は、培養液中で細胞を分離し、細胞数をカウントする。摘出した心臓の心房筋を除去し、右室自由壁 (RV) と左室自由壁および心室中隔 (LV+S) から PH の右心負荷による右室肥大の程度を評価した。

(2) BAL fluid 中細胞数および細胞分画による炎症の検討

既存の nucleocounter (Allerod, Denmark) を用いて細胞数を計測した。計測後、BAL fluid を遠心し、上清を ELISA 用に -80°C にて保存した後、沈澱した細胞を用いてスメアを作成し、細胞分画を測定した。

(3) ELISA 法による BAL fluid と plasma 中の cytokine, chemokine の測定

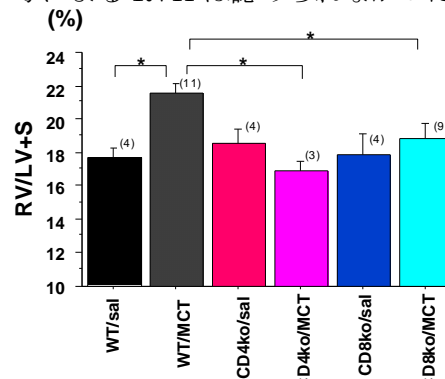
IL1beta, TNF alpha, monocyte chemoattractant protein-1 等を測定する。また、同様に、炎症の指標として、total protein を測定した。

(4) フローサイトメトリー (FACS) による肺、脾臓における細胞数から分離した細胞数の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 右室肥大 (RVH) の評価

RV/(LV+S) [%] の値は、野生型モノクローリン投与群 (WT/MCT) は野生型生食投与群 (WT/sal) と比較して有意に高値を示した。また、CD4ko および CD8ko では MCT 投与による RVH は認められなかった。



(2) BAL fluid 中の細胞数および細胞分画の測定

①全細胞数は、WT、CD4ko、CD8ko それ

ぞれのMCT群がコントロール群と比較して低値を示す傾向があった。特にCD8ko/salとCD8ko/MCTでは有意差が認められた。

②細胞分画については次の通りであった。

・マクロファージ…それぞれのMCT群がコントロール群と比較して低値を示す傾向があり、特にCD8ko/salとCD8ko/MCTでは有意差が認められた。

・リンパ球…それぞれのMCT群がコントロール群と比較して高値を示す傾向があり、特にWTでは有意差が認められた。また、MCT投与群間における比較では、WT/MCTがCD4ko/MCTとCD8ko/MCTそれぞれと比較して有意に高値を示した。

・好中球…WT/MCTはWT/salと比較して高値を示す傾向があった。

(3)・total protein…WT、CD4ko、CD8koいずれにおいても、MCT投与群がコントロール群と比較して有意に高値を示した。

・サイトカイン…MCP-1についてはWT、CD4ko、CD8koいずれにおいてもMCT投与群がコントロール群と比較して高値を示す傾向があった。TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β については、どの群間の比較においても有意差は見られなかった。

(4)肺の炎症性浸潤細胞数については、WT、CD4ko、CD8koのMCT投与群は、それぞれのコントロール群と比較して有意に低値を示した。脾臓の細胞数については、いずれの群間においても有意差は見られなかった。

本実験では、右室肥大(RVH)の評価から、野生型(WT)ではモノクロタリン(MCT)投与によって肺高血圧(PH)が引き起こされることが確認できたが、CD4koおよびCD8koではMCT投与によってPHは発症しないことが示された。

BAL fluid中のtotal proteinおよびMCP-1は、MCT投与群でWT、CD4ko、CD8koいずれも高値となったことから、MCT投与によって炎症は惹起されたことが推測される。しかし、一方ではBAL fluid中の全細胞数および肺の炎症性浸潤細胞数は、WT、CD4ko、CD8koいずれにおいてもMCT投与によって減少した。マウスでは特にMCTのB細胞に対する強い抑制が報告されており、それにより全体として細胞数が減少していることが疑われた。しかし、これらの値はMCT投与完了時での測定値であり、MCT投与期間中に炎症性浸潤細胞数がどのように変化したかは、時間経過を追って測定していないためわからない。これはMCP-1以外のサイトカインについても同様のことが言える。また、脾臓の細胞数はいずれの群間においても有意な差は認められ

なかったことから、MCTの影響は全身的というより肺で局所的に起こっていると推測された。また、BAL fluid中のリンパ球はいずれの群においてもMCT投与によって増加傾向があったことから、適応免疫反応がMCT投与によってより強く起こっていると考えられる。しかし、MCT投与によるリンパ球増加は、PHの発症したWTと比較して、PHが発症していないCD4koおよびCD8koで有意に低値を示したことから、PH発症にはCD4⁺およびCD8⁺T細胞が共に関与することが推測される。

以上のことから、PH発症にはCD4⁺およびCD8⁺T細胞が関与していることが推測されるが、それらがPHの病態変化をもたらす機序についてはさらなる研究が必要である。

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4件)

①Effect of all-trans-retinoic acid on the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. Zhang E, Jiang B, Yokochi A, Maruyama J, Mitani Y, Ma N, Maruyama K. Circ J. 2010;74(8):1696-703.

②Colforsin-induced vasodilation in chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats.

Yokochi A, Itoh H, Maruyama J, Zhang E, Jiang B, Mitani Y, Hamada C, Maruyama K. J Anesth. 2010;24(3):432-40.

③In vivo plaque composition and morphology in coronary artery lesions in adolescents and young adults long after Kawasaki disease: a virtual histology-intravascular ultrasound study. Mitani Y, Ohashi H, Sawada H, Ikeyama Y, Hayakawa H, Takabayashi S, Maruyama K, Shimpo H, Komada Y. Circulation. 2009;119(21):2829-36.

④Efficacy of procalcitonin in the early diagnosis of bacterial infections in a critical care unit.

Nakamura A, Wada H, Ikejiri M, Hatada T, Sakurai H, Matsushima Y, Nishioka J, Maruyama K, Isaji S, Takeda T, Nobori T. Shock. 2009;31(6):586-91.

[学会発表] (計6件)

①丸山淳子 マウス肺高血圧症モデルにおける組織学的重症度の評価方法の検討 第57回日本麻酔科学会学術集会 2010年6月3日 福岡

②丸山淳子 モノクロタリン(MCT)誘発性肺高血圧症(PH)発症におけるT細胞の関与 第56回日本麻酔科学会学術集会 2009

年8月16日 神戸

③ Junko Maruyama Modulation of age in the severity of inflammation and coagulation profile in rat monocrotaline-induced pulmonary hypertension American Thoracic Society International Conference 2008.5.21 Toronto

④ Junko Maruyama The effects of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor on the inflammatory changes in monocrotaline-induced pulmonary hypertension American Thoracic Society International Conference 2008.5.20 Toronto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 淳子 (MARUYAMA JUNKO)
鈴鹿医療科学大学・医用工学部・教授
研究者番号：50263017

(2) 研究分担者

丸山 一男 (MARUYAMA KAZUO)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20181828