

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08424

研究課題名(和文) 特発性肺動脈性肺高血圧症由来肺動脈平滑筋細胞のエネルギー代謝の解明と治療薬の開発

研究課題名(英文) Energy metabolism of idiopathic pulmonary arterial hypertension

研究代表者

赤木 達 (Akagi, Satoshi)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：60601127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)の肺動脈平滑筋細胞は、腫瘍細胞に似た特性を持っている。腫瘍細胞では常酸素下でも糖代謝が亢進しているが、このような特性があるかは明らかでない。PAH由来肺動脈平滑筋細胞は正常肺動脈と比較して常酸素下で糖代謝が亢進していた。一方で低酸素下では、ミトコンドリア呼吸によるATP産生が保たれていた。またミトコンドリア呼吸を促進する薬剤を投与しても、ATP産生は増加しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAHの肺動脈平滑筋細胞において、今回明らかになったエネルギー代謝の特性はこれまで知られていない。そのためこの特性に介入できる薬剤を開発できれば、新たなPAHの治療薬として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) of pulmonary arterial hypertension (PAH) have similar metabolic characteristics of cancer cells. We investigated metabolic state of PAH-PASMCs under normoxia and hypoxia. Glycolytic switch was occurred under normoxia and mitochondrial respiration was preserved under hypoxia in PAH-PASMCs, which resulted in increase of ATP production in PAH-PASMCs under hypoxia. These characteristics of energy metabolism in PAH-PASMCs under normoxia and hypoxia might be involved in the pathogenesis of PAH.

研究分野：医学 循環器内科 肺高血圧症

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 肺動脈平滑筋細胞 エネルギー代謝 糖代謝 ミトコンドリア呼吸

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺動脈性肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension: PAH)は、肺血管攣縮、肺血管内皮細胞及び平滑筋細胞の過増殖やアポトーシス抵抗性による血管リモデリングにより、肺血管狭窄や閉塞を生じ著明な肺動脈圧の上昇をきたす疾患である¹。この病態には血管拡張因子であるプロスタサイクリンや一酸化窒素の低下及び血管収縮物質であるエンドセリンの上昇が関与している。そのためこれら3因子に対する薬剤が開発され、プロスタサイクリン製剤、エンドセリン受容体拮抗剤、一酸化窒素濃度を上昇させるホスホジエステラーゼ5阻害剤や可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激剤が肺血管拡張薬として登場した。これら治療薬により長期予後は大きく改善した。しかしながら早期診断と適切な治療介入が行わなければ、このような改善が得られず治療に難渋する症例も多い。

(2) これまで PAH の病態解明においては、先に述べたような肺血管拡張と収縮に関わる因子を中心に進んできた。そして現在の血行動態、運動耐用能、予後の改善には肺血管拡張作用が寄与している。しかしながら肺血管拡張薬を用いても治療に難渋する症例では、肺血管拡張作用が関与しない病態、すなわち肺血管リモデリングの関与が示唆される。そのため肺血管リモデリングの病態の解明及び治療介入が、長期予後の改善につながると予想される。

(3) 肺血管リモデリングは肺動脈平滑筋細胞の過増殖とアポトーシス抵抗性が主体であるが、この特性は腫瘍細胞に類似している。腫瘍細胞は正常細胞とは異なるエネルギー代謝の特徴を持っている。正常細胞のエネルギー代謝では常酸素下でミトコンドリア呼吸が主体であるが、低酸素下ではこれが低下する。一方腫瘍細胞では常酸素下でも低酸素下でもミトコンドリア呼吸によるエネルギー代謝が低下し、糖代謝に依存している。PAH の肺動脈平滑筋細胞が腫瘍細胞と同じようなエネルギー代謝の特性を持っているかは明らかでない。

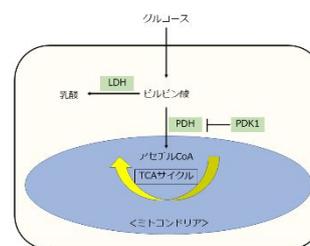
2. 研究の目的

本研究の目的は、肺移植を受けた PAH 症例の肺組織から培養した肺動脈平滑筋細胞を用いて、常酸素及び低酸素下での糖代謝やミトコンドリア呼吸などのエネルギー代謝を調べるとともに、エネルギー代謝に作用する新たな肺高血圧治療薬の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) PAH 由来肺動脈平滑筋細胞におけるエネルギー代謝経路の解明

PAH 由来肺動脈平滑筋細胞と正常肺動脈平滑筋細胞を常酸素チャンバー(酸素濃度 20%)及び低酸素チャンバー(酸素濃度 2%)に 72 時間培養後、RNA、蛋白サンプルを得る。得られたサンプルを用いて、糖代謝やミトコンドリア呼吸に参与する酵素、すなわちピルビン酸から乳酸へ変換する乳酸脱水素酵素(lactate dehydrogenase: LDH)、ピルビン酸からアセチル CoA へ変換するピルビン酸脱水素酵素(Pyruvate dehydrogenase: PDH)、PDH 活性を制御しているピルビン酸脱水素酵素キナーゼ(PDH kinase 1: PDK1)の発現を qRT-PCR 法や western blot 法を用いて調べる(右図)。また細胞内乳酸濃度を ELISA 法にて測定する。これらを調べ正常肺動脈平滑筋細胞と比較することにより、糖代謝やミトコンドリア呼吸に違いがあるか解明できる。

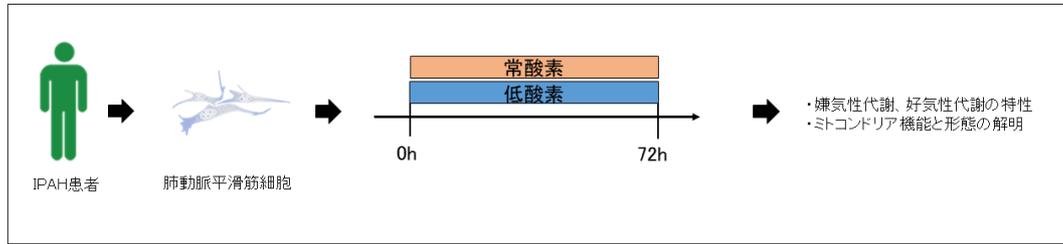


(2) IPAH 由来肺動脈平滑筋細胞におけるミトコンドリア機能の解明

細胞外フラックスアナライザーを用いて、ミトコンドリア機能、エネルギー代謝、ATP 産生などを解明する。先に述べた同条件で PAH 由来肺動脈平滑筋細胞と正常肺動脈平滑筋細胞を培養後、フラックスアナライザーを用いて、ミトコンドリア呼吸を反映する酸素消費速度、糖代謝を反映する細胞外酸化速度、ATP 産生量を測定する。これらを調べ正常肺動脈平滑筋細胞と比較することにより、ミトコンドリア機能、エネルギー代謝、ATP 産生の違いを解明できる。

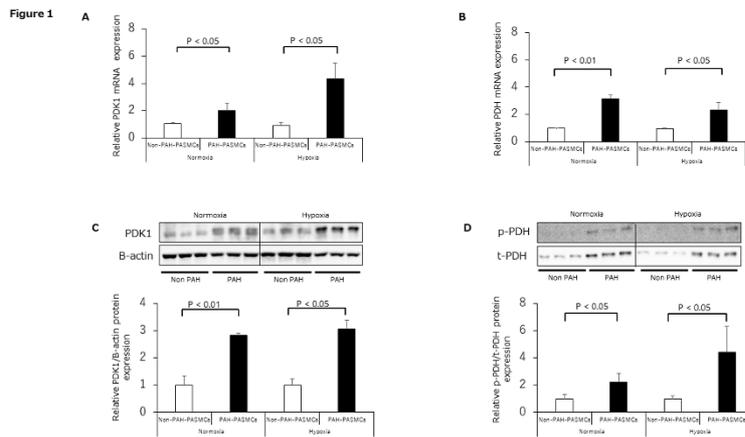
(3) エネルギー代謝に関連する因子の促進もしくは抑制によるエネルギー産生の評価

PAH 由来肺動脈平滑筋細胞におけるエネルギー代謝の特性が判明すれば、その特性を促進もしくは抑制することでエネルギー産生に違いがあるかを評価する。



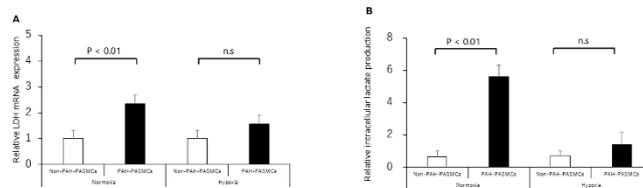
4. 研究成果

(1) PAH 由来肺動脈平滑筋細胞は常酸素下で糖代謝によるエネルギー代謝が亢進している。



PAH 由来肺動脈平滑筋細胞では正常細胞と比べて、低酸素と常酸素いずれにおいても PDK1 の mRNA の発現及び蛋白が有意に高かった (Figure 1A、1B)。同様に PDH の mRNA の発現及び PDH のリン酸化が、低酸素及び常酸素いずれにおいても有意に高かった (Figure 1C、1D)。

Figure 2



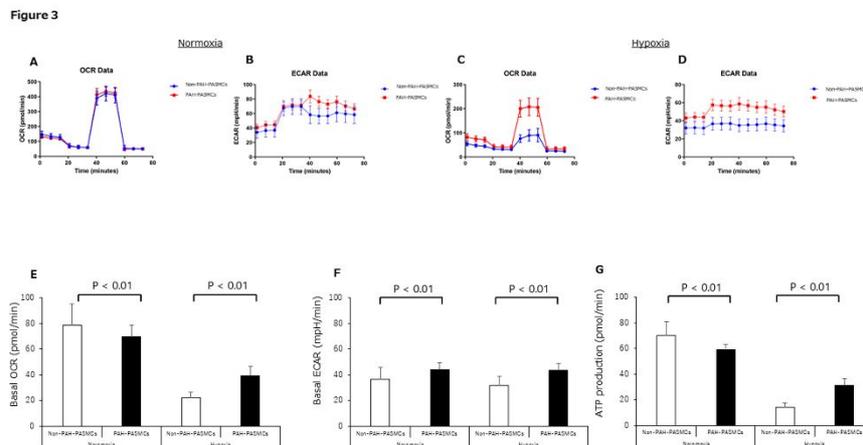
LDH の mRNA の発現も同様に、PAH 由来肺動脈平滑筋細胞では正常細胞と比べて、低酸素と常酸素いずれにおいても有意に高かった (Figure 2A)。しかしながら乳酸の産生は、常酸素下では PAH 由来肺動脈平滑筋細胞で有意に高かったが、低酸素下では有意な差はなかった (Figure 2B)。

以上から PAH 由来肺動脈平滑筋細胞では、常酸素下で糖代謝によるエネルギー代謝が亢進していることが明らかとなった。

(2) PAH 由来肺動脈平滑筋細胞では、低酸素下でミトコンドリア呼吸によるエネルギー産生が維持されていた

細胞外フラックスアナライザーを用いて、ミトコンドリア呼吸を反映する酸素消費速度 (OCR)、糖代謝を反映する細胞外酸性化速度 (ECAR)、ATP 産生量を測定した。常酸素下では、PAH 由来肺動脈平滑筋細胞は正常細胞と比べ、OCR は低下し、ECAR が増加していた (Figure 3E, Figure 3F)。一方で低酸素下では OCR が増加し、かつ ECAR も増加していた (Figure 3E, Figure 3F)。OCR と ECAR から計算される ATP 産生量は、PAH 由来肺動脈平滑筋細胞は正常細胞と比べ、常酸素下で有

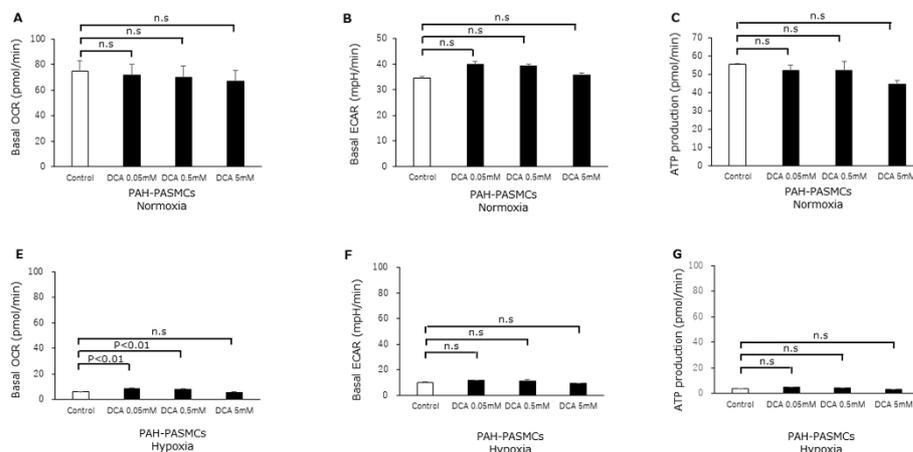
意に低下していたが、低酸素下では高かった(Figure 3G)。



以上の結果から、PAH 由来肺動脈平滑筋細胞は正常細胞と比べ、常酸素下では ATP 産生が低下しているが、低酸素下では逆に高くなっていることが明らかとなった。

(3) PDK1 抑制作用を持つジクロロ酢酸 (DCA) は、ミトコンドリア呼吸による ATP 産生を増加させない。

Figure 4



PDK1 を抑制し、ミトコンドリア呼吸を促進させるジクロロ酢酸(DCA)を投与し、ATP 産生がどのように変化するかを調べた。PAH 由来肺動脈平滑筋細胞では、常酸素下及び低酸素下いずれにおいても、DCA 投与で ATP 産生に変化がなかった (Figure 4)。

(4) まとめ

以上の結果から、PAH 由来肺動脈平滑筋細胞は常酸素下において、解糖系を介したエネルギー代謝により ATP が産生されていた。一方で低酸素下では、ミトコンドリア呼吸による ATP 産生が保たれており、正常細胞と比べ ATP 産生が高かった。低酸素下で DCA を投与してもミトコンドリア呼吸による ATP 産生は増えなかった。このような特性が PAH 由来肺動脈平滑筋細胞の過増殖やアポトーシス抵抗性にどのように関与しているのか、今後の調べていく予定である。

< 引用文献 >

1. Akagi S et al. Modern treatment to reduce pulmonary arterial pressure in pulmonary arterial hypertension. J Cardiol. 2018 Dec;72(6):466-472.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakamura Kazufumi, Akagi Satoshi, Ejiri Kentaro, Yoshida Masashi, Miyoshi Toru, Sakaguchi Masakiyo, Amioka Naofumi, Suastika Luh Oliva Saraswati, Kondo Megumi, Nakayama Rie, Takaya Yoichi, Higashimoto Yuichiro, Fukami Kei, Matsubara Hiromi, Ito Hiroshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Inhibitory effects of RAGE-aptamer on development of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 12 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2020.12.009	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 -
1. 著者名 Savale Laurent, Akagi Satoshi, et al	4. 巻 58
2. 論文標題 Serum and pulmonary uric acid in pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 2000332 ~ 2000332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.00332-2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakayama Rie, Takaya Yoichi, Nakamura Kazufumi, Kondo Megumi, Kobayashi Kaoru, Ohno Yuko, Amioka Naofumi, Akagi Satoshi, Yoshida Masashi, Miyoshi Toru, Ito Hiroshi	4. 巻 78
2. 論文標題 Efficacy of shear wave elastography for evaluating right ventricular myocardial fibrosis in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 17 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2021.01.015	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 -
1. 著者名 Akagi Satoshi, Dohi Yoshihiro, Ishikawa Kaori, Kubota Kayoko, Horimoto Koshin, Yagi Shusuke, Hirata Tetsuo, Yamamoto Eiichiro, Ito Hiroshi, Nakamura Kazufumi	4. 巻 3
2. 論文標題 Effects of Dual Initial Combination Therapy With Macitentan Plus Riociguat or Macitentan Plus Selexipag on Hemodynamics in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension (SETOUCHI-PH Study) Protocol of a Multicenter Randomized Control Trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 105 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-20-0133	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 -

1. 著者名 Kanai Anna, Koitabashi Norimichi, Akagi Satoshi, Sorimachi Hidemi, Ishibashi Yohei, Nagasaka Takashi, Takama Noriaki, Soma Katsura, Yao Atsushi, Kasahara Shingo, Kurabayashi Masahiko	4. 巻 24
2. 論文標題 A case of a middle-aged patient with a ventricular septal defect complicated by severe pulmonary hypertension-stepwise surgical repair with pulmonary vasodilators-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 131 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2021.02.013	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 -

1. 著者名 Akagi S, Miki T, Sando Y, Fujii N, Sarashina T, Nakamura K, Ito H	4. 巻 61(1)
2. 論文標題 Chemotherapy Improved Pulmonary Arterial Hypertension in a Patient with Chronic-Active Epstein-Barr Virus Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 191-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.19-419	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 -

1. 著者名 Akagi S, Matsubara H, Nakamura K, Oto T, Ejiri K, Ito H	4. 巻 84(2)
2. 論文標題 Marked Reduction of Pulmonary Artery Pressure After Registration for Lung Transplantation Is Associated With Long-Term Survival in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension- Cohort Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 245-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-19-0784	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5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Satoshi Akagi
2. 発表標題 Drug Interaction between prostaglandin I2 and endothelin receptor antagonist via IP receptor in pulmonary hypertension
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木達
2. 発表標題 シャント性心疾患関連PAH治療におけるTreat and Repairの実践
3. 学会等名 第5回肺高血圧・肺循環学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木達
2. 発表標題 現在の治療トレンドと今後期待される治療法
3. 学会等名 第25回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木 達
2. 発表標題 ACHD-PHの院内連携と治療
3. 学会等名 第22回日本成人先天性心疾患学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Akagi, Kazufumi Nakamura, Kentaro Ejiri, Satoshi Hirohata, Hiroshi Itoh
2. 発表標題 Characteristics of Energy Metabolism in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020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	中村 一文 (Nakamura Kazufumi) (10335630)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究分担者	吉田 賢司 (Yoshida Masashi) (70532761)	岡山大学・医歯薬学域・講師 (15301)	
研究分担者	伊藤 浩 (Ito Hiroshi) (90446047)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

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
---------	---------