

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592003

研究課題名（和文）肺高血圧症における凝固・炎症カスケード解析による治療標的の解明

研究課題名（英文） Therapeutic target for pulmonary hypertension based on coagulative and inflammatory cascade analysis

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

モノクロタリン(MCT)肺高血圧において、過凝固状態と炎症反応の存在が明らかとなった。抗凝固作用と抗炎症作用を持つトロンボモジュリン(TM)による肺高血圧発症抑制効果をラットで調べた。TMは、MCT投与19日後では、肺高血圧の発症を部分的に抑制したが、29日後には、抑制効果は消失し、死亡率も改善しなかった。ラットにおいては、外因性のTMは、MCTによる肺高血圧発症を抑制しないようであるが、今後は内因性のTM産生を高める操作の有効性を検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the present study was to investigate whether procoagulant state and inflammatory response occur and administration of trombosmodulin(TM) prevents the development of pulmonary hypertension (PH) in monocrotaline-injected rats. Monocrotaline increased mPAP, RVH, %muscularization, and %MWT. TM treatment significantly reduced mPAP, %muscularization, and %MWT in peripheral arteries with an external diameter of 50-100 μm in 19 days after monocrotaline injection, but the effect was lost after 29 days. Monocrotaline increased the levels of tumor necrosis factor alpha, monocyte chemoattractant protein-1, and thrombin-antithrombin complex (TAT) in BALF, and expression of eNOS while peNOS was decreased. In TM-treated rats eNOS expression was decreased and peNOS was similar compared to TM-non-treated rats. A Kaplan-Meier survival curve showed no difference between rats with and without TM. Although the administration of TM might slightly delay the progression of monocrotaline-induced PH, the physiological significance for treatment is limited, since TM did not improve survival. Although exogenous TM failed to prevent the occurrence of PH in the present study, treatment to increase the endogenous production of TM in endothelial cells might reduce the severity of PH. Further investigation will be necessary.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000

2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総 計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード： 肺高血圧、一酸化窒素、トロンボモジュリン、モノクロタリン

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧血管では、肺血管内皮細胞障害が発生し、血管内皮障害は血栓形成傾向をもたらす。肺微小血管床には微小血栓が存在している。血栓傾向は、凝固系の活性化を示し、トロンビンの上昇が示唆される。さらに、膠原病・SLE・強皮症などの結合織疾患、ARDS, 原発性肺高血圧に伴う肺高血圧血管の血管壁内には、リンパ球、単球などの炎症細胞浸潤が見られ、こうした疾患における肺高血圧血管を、「肺動脈炎」として捉えることもできる。我々は最近、炎症反応に介在する転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) の拮抗薬である pyrrolidine dithiocarbamate がラットにおいて、モノクロタリンによる肺高血圧血管病変の発生を抑制することを見出し、同肺高血圧血管病変が NF- κ B を介する炎症反応の一種であることを示した (Chest 132; 1265-74, 2007)。内因性のNO (nitric oxide) -cGMP 系の賦活は肺血管平滑筋の異常な肥大・増生を主体とする肺高血圧血管病変の発生を抑制することを報告してきたが (Circulation 96:689-97, 1997; J Thorac Cardiovasc Surg 136: 142-9, 2008)、その作用機序は単なる血管拡張作用のみではないと考えられる。NO は、NADPH オキシダーゼを抑制しスーパーオキシドの産生を低下させることから抗炎症作用を持つので、血管拡張作用に加えて、抗炎症作用が肺高血圧血管病変の発症を抑制する可能性もある。一方、我々は、外因性 NO 吸入の肺高血圧治療における限界も明らかにし、(Chest 126: 1919-25, 2004; Chest 125:2247-52, 2004)、

新規な研究アプローチが必要であることを指摘してきた。

2. 研究の目的

肺高血圧血管病変を過凝固状態と炎症反応と考へ、介在する炎症性因子の連鎖的変動を解明する。実験的高血圧モデルにおける、トロンビン活性化の存在と炎症反応の経路を明らかにする。凝固反応系と炎症反応系の両者に抑制的に働く内因性抗凝固物質であるトロンボモジュリンを、肺高血圧を発症するラットモデルに、体外から投与し、その抗炎症効果と肺高血圧血管病変の発生抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

モノクロタリン肺高血圧ラットおよび慢性低酸素暴露ラット(前者の方が後者よりも炎症反応が強いと予想される)を用いる。これらの実験的肺高血圧動物で、トロンビン活性化と連鎖的炎症反応の存在・肺血管内皮細胞上のトロンボモジュリンの低下が存在することを明らかにする。

同時に、両肺高血圧モデルについて、肺高血圧発症前から、トロンボモジュリンを投与し、トロンボモジュリンによる、①NO 合成酵素レベルの上昇と NO 産生の亢進、②NF- κ B の発現抑制、③ERK の発現抑制 ④炎症性サイトカインの産生抑制 ⑤接着分子の発現抑制、を明らかにする。さらに、①覚醒下肺動脈圧、②右心室肥大、③100 μ m 程度の筋性血管の中膜肥厚、④本来血管平滑筋を持たない肺胞レベルでの末梢肺動脈での血管平滑筋の出現率を測定し、

肺高血圧と肺高血圧血管病変の発生抑制効果明らかにする。

4. 研究成果

肺胞洗浄液中のTAT, トロンビン活性、サイトカイン測定

正常ラット＋生理食塩水、肺高血圧ラット＋生理食塩水、肺高血圧ラット＋トロンボモジュリンの3群に対して、モノクロタリン投与後19日目に肺胞洗浄を行なった。肺高血圧ラットにおいて、肺胞洗浄液の総蛋白、リンパ球数、好中球数、TAT、Trombin、Macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1)、TNF α は上昇した。これらの結果は、BAL中において、血管透過性の亢進と凝固活性の亢進、炎症に関与するサイトカインの上昇を示しているが、一方変化を感知できなかった炎症性サイトカインもある。

NO合成酵素 (eNOS) の発現

肺組織を凍結保存後、トータル mRNA を抽出し、eNOSの RTPCR を行い、ウエスタンブロットによりタンパクレベルの解析を行った。モノクロタリン投与後19日では、全 eNOS の発現が上昇していた。一方、リン酸化 eNOS は低下していた。結果として、peNOS/eNOS の比は低下していた。トロンボモジュリンの投与は、モノクロタリン投与ラット肺の eNOS、pNOS レベルに変化を与えなかった。

モノクロタリン肺高血圧モデルにおけるトロンボモジュリンによる肺高血圧発症抑制効果

モノクロタリン肺高血圧モデルを用いた。モノクロタリンはクロタリクスペクタルビスという豆科植物から抽出されたアルカロイドで、同植物を常食としていた現住民に突然死が多いことから、肺高血圧を引き起こす作用が発見された物質である。モノクロタリン60mg/kg皮下注により誘

発される肺高血圧発症に対するトロンボモジュリン (TM) による発生抑制効果を調べた。TM血中濃度は、投与後2日間は維持された。正常ラット＋生理食塩水、肺高血圧ラット＋生理食塩水、肺高血圧ラット＋TMの3群に分けた。モノクロタリン投与2日前から、組換え可溶性ヒトトロンボモジュリン0.3mg/kgをラットに1回/2日皮下注射した。

モノクロタリン投与後19日の結果

1. モノクロタリン投与19日目の肺動脈圧は上昇したが、TMはこの上昇を有意に抑制した。2. 右心室肥大も発生したが、TMは右心室肥大の発生を抑制しなかった。3. 外径15-50 μ mの肺動脈において、全周性に筋層を持つ血管(完全筋性血管)の出現率は、モノクロタリン投与で上昇したが、TMはこの上昇を抑制しなかった。4. 一方、外径50-100 μ mの肺動脈において、完全筋性血管の出現率も、モノクロタリン投与で上昇したが、TMはこの上昇を有意に抑制した。④完全筋性血管(外径50-100 μ m)の外径に対する中膜の割合(中膜肥厚)は、モノクロタリン投与で上昇し、TMはこの上昇を有意に抑制した。以上の結果から、TMはモノクロタリンによる肺高血圧血管病変の発生を部分的に抑制するが、この効果は血管サイズにより異なる。肺動脈圧の上昇を軽度には抑えるが、右心室肥大の発生は抑制しないと考えられる。

モノクロタリン投与後29日の結果と死亡率への影響

モノクロタリン投与19日で認められた、トロンボモジュリンによる肺高血圧発症抑制効果は、29日では消失し、予後改善効果も認められなかった。

まとめと考察

ラットにおいて、モノクロタリン投与により、肺動脈圧上昇、右心室肥大、末梢肺動脈での血管平滑筋をもつ血管の割合、小筋性動脈での中膜肥厚が発生した。肺胞洗浄液中の好中球数および好中球の割合、タンパク濃度が上昇していた。肺胞洗浄液中および血清のTNF α 、MCP-1、TAT、トロンビン活性が上昇していた。INF γ 、IL-1 β の上昇は認められなかった。これら結果は、モノクロタリン投与により、肺高血圧と肺高血圧血管病変が発生し、全身および肺での炎症反応と凝固系の活性を伴うことを示している。肺組織のeNOSタンパクレベルは、モノクロタリン投与後19日で有意に上昇していた。一方、リン酸化eNOS(peNOS)タンパクレベルは有意に低下していた。トロンボモジュリン(TM)は、抗凝固作用、抗炎症作用、peNOSを高める作用を持つため、モノクロタリン肺高血圧におけるTM投与による発症抑制作用を検討した。TMは、モノクロタリン投与19日で、肺動脈圧上昇と肺高血圧血管病変の発生を部分的に抑制したが、この抑制効果は29日では消失し、予後改善効果も認められなかった。TMは、モノクロタリン投与ラットのeNOSレベルを下げたが、peNOSレベルには影響を与えなかったことから、eNOS全体に占めるpeNOSの割合を増加させると考えられる。文献的に、人でプロスタサイクリンを投与すると内因性のTMが増加し、肺高血圧の症状改善につながるという報告がある。本研究の結果からは、モノクロタリン投与ラットにおいて、外因性のTMに明らかな肺高血圧抑制効果は認められないと考えられるので、今後は内因性TMを高める操作を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

1. 丸山一男、張 尔泉、横地 歩. 周術期輸液とは? 内科 109: 240-244, 2012 査読無
2. 丸山一男. 抑肝散と集中治療: 東洋医学的考察. 日集中医誌 19: 5-7, 2012 査読有
3. 丸山一男、丸山淳子. NO吸入をどう使うか Heart View 15: 74-79, 2011 査読無
4. 丸山一男. 術前の動脈血酸素分圧はどのように評価するか Lisa 18: 210-212, 2011 査読無
5. Takemitsu T, Maruyama K(9/14). Prospective evaluation of three different diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation. **Thromb Haemost 105(1):40-4, (2011)** 査読有
6. 丸山一男、張 尔泉、山田康晴、横地 歩、今井 寛. 筋弛緩薬と呼吸管理. 人工呼吸 28: 161-167, 2011 査読無
7. 張 尔泉、横地 歩、丸山一男. 分離肺換気時の先読ポイント. Ope nursing 26: 857-862, 2011 査読無
8. 山田康晴、張 尔泉、横地 歩、丸山一男. 人工呼吸器関連の先読みポイント. Ope nursing 26: 850-856, 2011 査読無
9. 丸山一男、山田康晴、丸山淳子. 呼吸不全—なぜPaCO₂は低下するのか— クリニカルエンジニアリング 22: 326-332, 2011 査読無
10. 丸山一男、張 尔泉、山田康晴、丸山淳子. NO吸入療法. 救急医学 34: 1328-1333, 2010 査読無

- 1 1. 丸山一男、張 尔泉. ALI/ARDS に対する一酸化窒素 (NO) 吸入療法とは? 救急・集中治療 22: 1259-1265, 2010 査読無
- 1 2. Zhang E, Maruyama J(4/7), Mitani Y(5/7), Yokochi A (6/7), Maruyama K (7/7). Effect of all-trans-retinoic acid on the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circ J* 74(8):1696-703. (2010) 査読有
- 1 3. Yokochi A, Maruyama J(3/8), Zhang E(4/8), Mitani Y(5/8), Maruyama K(8/8). Colforsin-induced vasodilation in chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Anesth* 24(3):432-440. (2010) 査読有
- 1 4. 丸山一男、張 尔泉、山田康晴、丸山淳子. 一酸化窒素 (NO) の臨床応用・治療効果. *ICUとCCU* 33:969-979, 2009 査読無
- 1 5. 張 尔泉、横地 歩、岡田アムポン、他. Ventilator-induced Lung Injury(VILI)に関する基礎研究. *臨床麻酔* 33: 863-868, 2009 査読無
- 1 6. 丸山一男、張 尔泉、山田康晴、丸山淳子. 成人でのNO吸入. *臨床麻酔* 33: 984-994, 2009 査読無
- 1 7. Mitani Y, Sawada H(3/9), Maruyama K(7/9). In vivo plaque composition and morphology in coronary artery lesions in adolescents and young adults long after Kawasaki disease: a virtual histology-intravascular ultrasound study. *Circulation* 119(21):2829-36. (2009) 査読有
- 1 8. Nakamura A, Maruyama K(8/11). Efficacy of procalcitonin in the early diagnosis of bacterial infections in a critical care unit. *Shock* 31(6):586-91. (2009) 査読有
- [学会発表] (計 3 件)
1. 中西雄紀、丸山淳子、張尔泉、横地歩、丸山一男、低酸素性肺高血圧発症における Interleukin-17(IL-17) の関与. *麻酔* Vol.60 P56 (2011) 日本麻酔科学会第 58 回学術集会 口演発表(神戸)(最優秀演題賞受賞) 2011. 5. 19
2. 橋本祐樹、張 尔泉、井波亜紗、大橋ひとみ、丸山淳子、山田康晴、大森彩加、丸山一男. ラットにおける VILI(Ventilator induced lung Injury)の発生条件. 第 3 3 回 日本呼吸療法医学会総会 2011.6.10 ポスター発表(横浜)
3. 張尔泉、丸山淳子、横地歩、丸山一男(5/5). シロスタゾールによるモノクロタリン誘起肺高血圧発症抑制作用. *麻酔* Vol. 59 P. 122 (2010) 第 57 回日本麻酔科学会 ポスター発表(福岡) 2010. 6. 4
- [図書] (計 1 3 件)
1. 丸山一男. 全身麻酔後の術後管理、天羽敬祐 (監修) 麻酔科学レビュー2012. 総合医学社 東京 2012、p p 229-234
2. 丸山一男、丸山淳子. 一酸化窒素医療ガス安全教育委員会(編) 医療ガス 真興交易医書出版部 東京 2011、p p 8 1-9 1

3. Maruyama K, Zhang K, Maruyama J. Clinical application of inhaled nitric oxide. In Yoshikawa/Naito (eds) Gas Biology Research in Clinical Practice. KARGER, Basel, 2011, pp43-55
4. 丸山一男. 全身麻酔後の術後管理、天羽敬祐 (監修) 麻酔科学レビュー 2011. 総合医学社 東京 2011、pp 227-232
5. 丸山一男. ダブルルーメンチューブ挿入後に、片肺換気にしたが純酸素でも酸素化が悪い. (高崎真弓, 他編) 麻酔科トラブルシューティング A to Z. 文光堂、東京 2010, pp539-361
6. 丸山一男. 呼気終末CO₂濃度が急に低下した. (高崎真弓, 他編) 麻酔科トラブルシューティング A to Z. 文光堂、東京 2010, pp594-596
7. 丸山一男. 呼気終末CO₂濃度が上昇する. (高崎真弓, 他編) 麻酔科トラブルシューティング A to Z. 文光堂、東京 2010, pp596-597
8. 丸山一男 (訳) 薬物情報、MGHでの成人血液検査正常値 (稲田英一 監訳) MGH 麻酔の手引き 第6版 メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京 2010, pp775-834
9. 丸山一男、丸山淳子. 肺血管系と体血管系の違い 稲田英一(編) 呼吸・循環イラストレイティド 学研、東京、2010, pp66-68
10. 丸山一男、横地 歩. 導入・挿管の重要ポイント 丸山一男、他 (編)、手術・麻酔の看護 Q&A 103、メディカ出版 大阪、2010, pp129-142
11. 丸山一男、帝王切開の麻酔、 豊田

長康 (監修) HANDBOOK 臨床産婦人科
金芳堂 京都 2010, pp341-345

12. 丸山一男. 全身麻酔後の術後管理、天羽敬祐 (監修) 麻酔科学レビュー 2009. 総合医学社 東京 2009、pp 218-222
13. 丸山一男、人工呼吸の考えかた 南江堂 東京 2009、pp 1-271

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

三谷 義英 (Mitani Yoshihide)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60273380

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

張 尔泉 (Erquan Zhang)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30456727

横地 歩 (Yokochi Ayumu)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：603597