

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790981

研究課題名(和文)

肺高血圧症に対する分子状水素による新規抗酸化療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic Effect of Hydrogen on Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension in Rat.

研究代表者

加藤 太一 (KATO TAICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20422777

研究成果の概要(和文)：

難治性疾患である肺高血圧発症に対する分子状水素の抑制効果を評価するために、ラットモノクロタリン肺高血圧モデルを作成した。飽和水素水投与により、右室圧の低下、肺血管の筋性化の軽快を認めた。肺高血圧に対し脱水素水投与した群で増加していた肺血管周囲マクロファージ、線維芽細胞、酸化ストレスマーカー陽性細胞、細胞増殖マーカー陽性細胞は飽和水素水により減少した。これらの結果より分子状水素は肺高血圧症の改善に炎症の抑制、酸化ストレスの抑制、細胞増殖抑制を介して寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

The effect of hydrogen on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat was evaluated. Hydrogen improved systolic right ventricular pressure and muscularization of pulmonary vasculature. Furthermore, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rat, the numbers of perivascular macrophages, fibroblasts, 8ohdG-positive cells and Ki-67-positive cells were increased, which were suppressed by hydrogen. These results suggest hydrogen ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat via anti-inflammatory, anti-oxidative stress and anti-proliferative effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺高血圧、酸化ストレス、炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性疾患である肺高血圧症は従来、細胞成分の増殖に伴う内腔狭窄という病態を治療における主なターゲットとされ、種々の血管拡張薬が治療に用いられてきた。しかし、近年になって、血管のリモデリングが肺高血

圧の長期的な治療を考える上で重要であると認識されるようになってきている。

(2) 肺高血圧症の病変において、活性酸素が酸化ストレスとして関与することが近年報告されている

(3) 最近、活性酸素の中で最も強力な酸化力

を持ち、細胞毒性の強いヒドロキシラジカルの働きを分子状水素が選択的に抑制し、ラット虚血再還流モデルにおいて脳梗塞が軽減することが報告されたが、肺高血圧症での効果は不明である。

2. 研究の目的

ヒドロキシラジカルを選択的に抑制する分子状水素を飽和水素水として、ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデルに経口摂取させた上で、肺高血圧の評価、酸化ストレスの評価を行うとともに、その機序として、中膜平滑筋に対する作用、炎症に対する影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデルをモノクロタリンの皮下注により作成する。水素治療群（以下H群）はヒドロキシラジカルを選択的に抑制する水素を飽和水素水として、非治療群はモノクロタリン投与後脱水素水を21日間経口摂取させた（以下M群）。さらに、コントロール群としてモノクロタリンを投与せず脱水素水で管理したラットも設定して（以下C群）、3群で評価した。

(2) 飼育期間を経た後、麻酔下に右室圧測定を行った上で屠殺した。屠殺においてはラットを気管切開した上で、人工呼吸器を用いて換気下に開胸し、右室切開にて肺動脈内にカテーテルを挿入し、Phosphate buffered salineにて還流を行った。屠殺後に右室/左室+心室中隔重量比の測定も行い、肺高血圧と右室肥大の評価を行った。

(3) ヘマトキシリンエオジン染色、エラスチカワングーソン染色にて肺血管の形態、中膜平滑筋の筋性化の程度を評価した。さらに中膜平滑筋については抗 α -アクチン抗体による共焦点レーザー顕微鏡による免疫染色でも評価を行った。

(4) 肺血管周囲の炎症性細胞の浸潤を抗CD68抗体を用いた免疫染色で評価した。また、線維芽細胞については抗vimentin抗体による免疫染色で評価した。

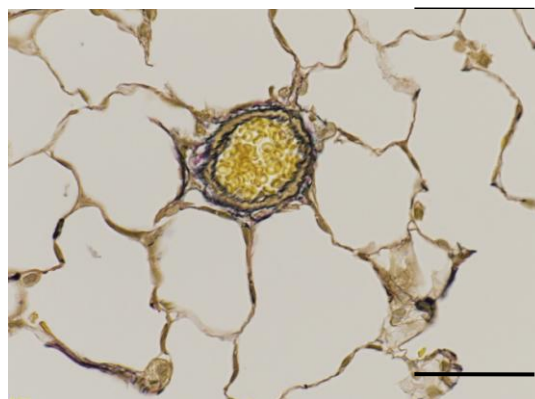
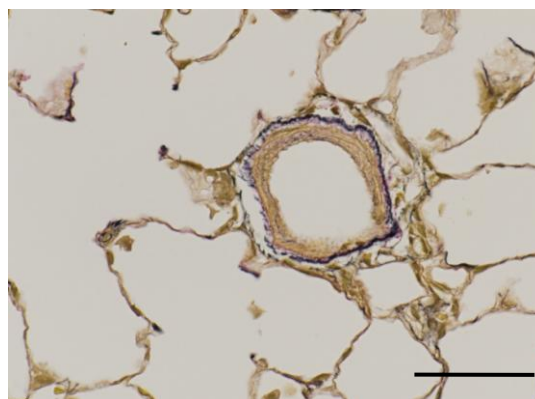
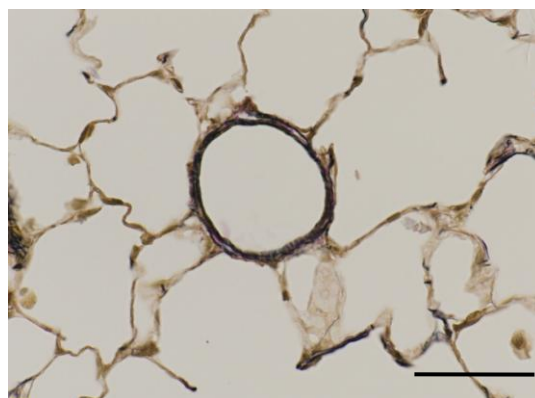
(5) 肺高血圧症病変の形成過程における細胞増殖の程度については、細胞増殖マーカーである抗Ki-67抗体を用いた免疫染色で評価した。

(6) 主としてDNA酸化損傷を反映する酸化ストレスを検討するために、抗8OH-dG抗体による免疫染色で組織の酸化ストレスについても評価を行った。

4. 研究成果

(1) モノクロタリン投与後21日の血行動態評価で、M群では著明な肺高血圧を認めたが、分子状水素の投与を行ったH群では肺動脈圧の上昇は抑制されていた。また、右室肥大の程度もM群に比べH群では軽快していた。

(2) エラスチカワングーソン染色および、抗 α -アクチン抗体による共焦点レーザー顕微鏡による免疫染色での評価において、肺動脈中膜平滑筋はM群に比べH群では筋性化の程度に軽快が認められた。



エラスチカワングーソン染色

上) C群

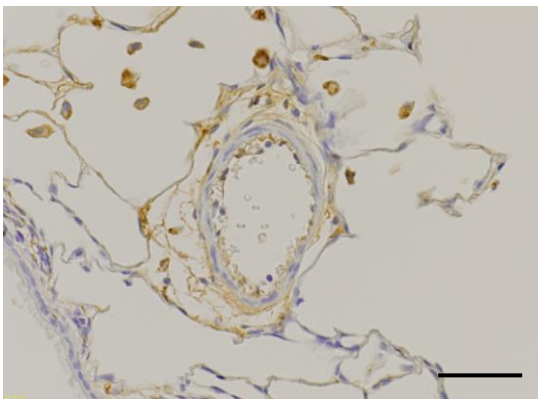
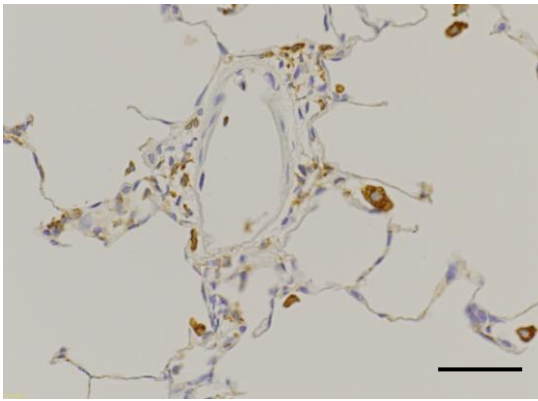
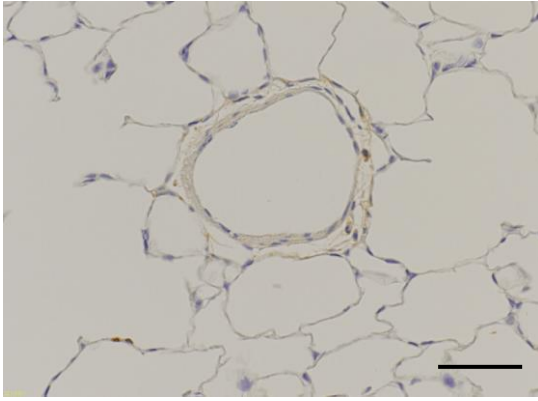
中) M群

下) H群

図中の線は50 μ m

M群で肥厚している中膜は飽和水素水投与を行ったH群で軽快している。

(3) 血管外膜での CD68 陽性のマクロファージおよび vimentin 陽性の線維芽細胞の浸潤がC群に比してM群において増加していたが、H群ではM群に比べ減少していた。



ED1 染色

上) C群

中) M群

下) H群

図中の線は 50 μ m

肺血管周囲の ED1 陽性細胞がM群では著明に増加し、H群で減少している。

(4) 肺血管の構成細胞においてM群では Ki-67 陽性の細胞がC群に比して増加し、H群ではM群より減少していた。

(5) 酸化ストレスマーカーである 8OH-dG 陽性細胞はC群に対し、M群で増加したが、H群ではM群より少なかった。

以上の結果より、分子状水素はラットモノクロータリン誘発肺高血圧モデルにおいて、炎症の抑制、細胞増殖抑制、酸化ストレスの抑制を介して、肺高血圧を改善させる効果があることが示唆された。しかし、その効果は単独でモノクロータリン非投与のコントロールラットと同等の肺動脈圧にさせるほどの効果ではなかった。このことから実際の臨床応用を考える場合、分子状水素単独よりも、従来の肺血管拡張薬と併用することにより、肺高血圧の改善に寄与する可能性はあると考えられた。本研究の結果を受けて、今後、肺における血管リモデリングに関与する mRNA、蛋白の発現量の検討が分子状水素の作用機序の解明に必要となると考えられた。

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 2 件)

1. Kato T, Numaguchi A, Ando H, Yasui M, Kishimoto Y, Yasuda K, Fukumi D, Yasuda T. (査読あり) Coronary arterial ectasia in a 2-year-old boy showing two symptoms of Kawasaki disease without manifesting fever. *Rheumatology International*. (2011, in press)
2. Kotani T, Sumigama S, Hayakawa H, Mano Y, Tsuda H, Sugiyama C, Kawachi F, Hironaka M, Kato T, Kaneko K, Hayakawa M, Kikkawa F. (査読あり) Elevated levels of aldosterone in the amniotic fluid in two cases of congenital mesoblastic nephroma. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36:256-8

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 西川浩、今井祐喜、吉田修一朗、久保田

- 勤也、松島正氣、大橋直樹、斉藤調子、加藤太一 胎児拡張型心筋症から母体抗 SS-A 抗体陽性と判明した症例 第 17 回日本胎児心臓病学会学術集会 2011. 2. 18. 旭川
2. Kato T, Sawada H, Maruyama J, Masuya M, Miyata E, Nakamura S, Ikeyama Y, Shimo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Contribution of bone marrow stem cells to the pathogenesis of pulmonary hypertension and pharmacological modulation of bone marrow-derived cells as a therapeutic target. The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society. 6. July 2010, Chiba, Japan.
3. Kato T, Sawada H, Maruyama J, Deguchi T, Ikeyama Y, Masuya M, Miyata E, Nakamura S, , Shimo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Bosentan promotes incorporation of bone marrow-derived endothelial cells but inhibits infiltration of macrophages into pulmonary vascular lesions in mice exposed to chronic hypoxia: A novel concept of bosentan therapy in pulmonary hypertension American Heart Association Scientific Sessions 2009. Orlando, USA 2009. 11. 17
4. 加藤太一, 三谷義英, 澤田博文, 池山夕起子, 出口隆生, 榊屋正浩, 宮田恵里, 丸山淳子, 丸山一男, 新保秀人, 駒田美弘 マウス肺高血圧発症における骨髄由来幹細胞の役割とボセンタンによる制御—肺高血圧に対する内科的再生医療の可能性— 第 45 回日本小児循環器学会神戸 2009. 7. 17
5. Kato T, Mitani Y, Komada K, Ito M Role of bone marrow stem cells in the pathogenesis of pulmonary hypertension and pharmacological modulation 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation, Matsushima, 2009. 6. 1
6. 研究組織
(1) 研究代表者
加藤 太一 (KATO TAICHI)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20422777
(2) 研究分担者
なし
(3) 連携研究者
なし