

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06799

研究課題名(和文)肺高血圧症病態生理における血管内皮機能分子の意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the significance of endothelial function molecule in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

垣野 明美 (Kakino, Akemi)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：00534637

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(PAH)の病態では、血管内皮機能不全に伴う血管壁の生理活性物質の病的不均衡と、それに引き続く肺動脈のリモデリングが重要である。本研究では、内皮機能不全誘導分子Xに着目し、その病態への関与を明らかにすることを目的とした。モノクロタリン誘発ラットPAHモデルおよびゲノム編集ラットを用い検討した結果、野生型PAHモデルの肺組織でXの発現が顕著に増加していること、X欠損ラットでは野生型に比べPAHの症状が改善されることを示した。すなわち内皮機能不全誘導分子XはPAHの病態進展を促進させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAHに対する3系統の薬剤(エンドセリン受容体拮抗薬、プロスタサイクリン製剤、フォスフォジエステラーゼtype 5阻害薬)により患者の予後は改善したが、重症例ではいまだ予後不良であり、既存の治療薬とは別の分子機序を標的とした新たな治療薬が必要とされている。本研究では、モノクロタリン誘発ラットPAHモデルで、内皮機能不全誘導分子Xが肺高血圧症の病態進展を促進させることを示した。今後ヒトにおいても同分子が病態進展に関与していることを臨床検体等を用い検討を進めていくことにより、新規治療法につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In the pathology of pulmonary arterial hypertension (PAH), pathological imbalance of physiologically active substances in the vascular wall due to vascular endothelial dysfunction and subsequent pulmonary arterial remodeling are important. In this study, we focused on endothelial dysfunction-inducing molecule X and investigated its involvement in PAH pathology. Using monocrotaline-induced rat PAH model and genome-edited rats, we demonstrated that X expression was significantly increased in lung tissue of wild-type PAH model, and that PAH symptoms were improved in X-deficient rats compared to wild-type rats. Our data indicate that endothelial dysfunction-inducing molecule X promotes the progression of PAH pathology.

研究分野：血管生物学

キーワード：肺高血圧 ゲノム編集ラット

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病態では、血管収縮因子と拡張因子の正常なバランスが崩れることにより、肺動脈圧が上昇するが、そのような機能的な変化だけではなく、引き続いて起こる肺動脈のリモデリングにより、平滑筋の遊走・増殖、線維性肥厚が起こり、これらの器質的变化による病態の悪化が、PAH の治療を困難なものとしている。これらに対し、エンドセリン受容体拮抗薬、プロスタサイクリン製剤、フォスフォジエステラーゼ type 5 阻害薬が使用され、一定の効果が認められる。このことは、血管内皮機能異常を薬理的に補うことの意義を示しており、やはり血管内皮機能不全の PAH における重要性を示すものである。これらの病理学的変化や薬効から示唆される血管内皮細胞の重要性は、PAH の病態生理の少なくとも一部分は動脈硬化と共通の基盤を持つことを示唆している。

本研究では、これまで解明が進んでいない PAH の根本原因、すなわちエンドセリン-1 の産生や、内皮細胞機能不全、およびそれに伴う平滑筋の遊走・増殖などの変化の最上流で引き金となる病態生理について、動脈硬化の引き金を引く分子である内皮機能不全誘導分子 X の PAH への関与について検討する。

2. 研究の目的

肺動脈性肺高血圧 (PAH) の病態では、血管内皮機能不全に伴う血管壁の生理活性物質の病的不均衡と、それに引き続く肺動脈のリモデリングが重要である。一方、我々は、内皮機能不全誘導分子 X の活性化により、ET-1 が産生されること、内皮機能不全が誘導され、血管内皮依存性弛緩反応が障害されることを明らかにしてきた。これらを合わせて考えると、内皮機能不全誘導分子 X が PAH の発症・進展の原因として機能する可能性がある。

そこで本研究では、モノクロタリン誘発ラット PAH モデルと内皮機能不全誘導分子 X 遺伝子ノックアウトラットを利用し、内皮機能不全誘導分子 X が病態悪化に働くことを証明する。これにより、PAH 発症・進展の病態生理における X の役割を明らかにし、PAH の病態を制御する新たな治療法開発の可能性を開く。

3. 研究の方法

モノクロタリン誘発ラット PAH モデル:

CRISPR/Cas9 法を用いて作成した内皮機能不全誘導分子 X ノックアウトラット (KO ラット) および野生型 Lewis ラット (5-7 週齢、雄性) にモノクロタリン (MCT) を腹腔内投与し (60 mg/kg body weight、単回投与)、投与後経時的に体重測定、臨床所見の観察を行った。対照ラットには生理食塩水を投与した。病態進展のどの段階で内皮機能不全誘導分子 X が関与するのかを調べるため、MCT 投与期間 1, 2, 3, 4 週で比較解析した。投与期間終了後、麻酔による安楽死ののち、血液、肺、心臓などを回収し以下の検討を行った。観察期間の餌・水は自由摂取とした。

- ・右心機能評価: MCT 投与 4 週後、心エコー検査および圧カテーテルセンサーによる右室収縮期圧測定により評価した。
- ・右心肥大評価: 採取した心臓の右心室を切り出し、左心室は中隔部分を除いて左室壁のみとし、それぞれの重量を測定して右室左室重量比 (RV/LV) を算出した。
- ・血液検査: 血算を測定する他、ELISA や Multi-Plex イムノアッセイを用いて血清中の関連分子を測定した。
- ・遺伝子発現解析: 肺組織を回収し、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現量を測定した。
- ・組織学的検討: 肺組織切片を作成して組織染色を行い、肺内肺動脈血管の形態学的変化を観察・評価した。

4. 研究成果

はじめに正常時の KO ラットの体重、血圧、血算などの基本的性質は野生型と差がないことを確かめたうえで、MCT 誘発性肺高血圧モデルの実験を行った。

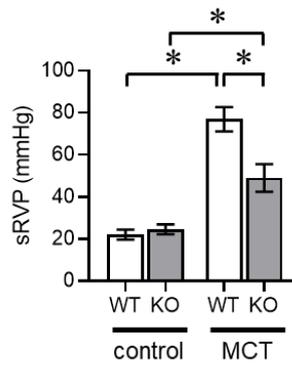
野生型ラットでは、MCT 投与 2 週群は対照群に比べ、肺内の小動脈に内膜肥厚が認められ血管内腔が顕著に狭小化していることが観察されたが、同条件下での KO ラットではそのような血管が極めて少なく、すなわち MCT 投与による肺血管リモデリングが抑制されていた。このような病変は MCT 投与 4 週でも同様に観察され、やはり KO ラットでは抑制されていた。さらに MCT 投与 4 週での右室収縮期圧亢進や右室肥大も野生型に比べ KO ラットで抑制されていた (図 1)。また

心エコーの結果からは、野生型の MCT 投与群に認められる右室流出路収縮期血流波の加速時間 (RVOT Act) や三尖弁輪収縮期移動距離 (TAPSE) 低値が KO ラットでは改善しており、すなわち KO ラットでは右室不全が軽減していることが示された。

肺組織の遺伝子発現変化を MCT 投与後 1-4 週後まで経時的に調べると、内皮機能不全誘導分子 X は MCT 投与 2 週後から顕著に発現が増加していた (図 2)。このとき、同モデルの肺組織で上昇するとされている TGF- β や MCP-1 の発現も MCT 投与 2 週後から有意な増加が認められ、エンドセリン-1 (ET-1) は MCT 投与 1 週間後から有意な発現上昇が認められた。一方これらの発現増加は KO ラットで抑制されていた。ELISA や Multi-Plex を用いて血清中の関連分子を測定すると、MCT モデルでは血清中の ET-1、MCP-1 などが増加しており、KO ラットでは野生型に比べてそれらの血中レベルが抑制されていた。

以上の結果から、モノクローリン誘発ラット PAH モデルで、内皮機能不全誘導分子 X は肺高血圧症の病態進展を促進させることが明らかとなった。今後はヒトにおいても同分子が病態進展に関与していることを臨床検体等を用い証明し、既存の治療薬とは異なる新たな治療法に向けて検討を進めたい。

(a) sRVP



(b) RV/LV

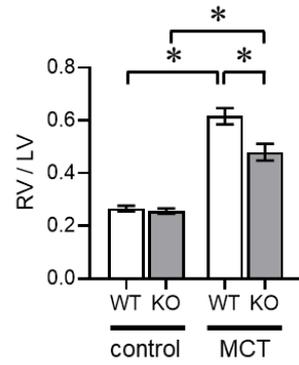


図 1. MCT 投与 4 週後の a) 右室収縮期圧 (sRVP) と b) 右室/左室重量比 (RV/LV). n=6, mean±SD, * p <0.01

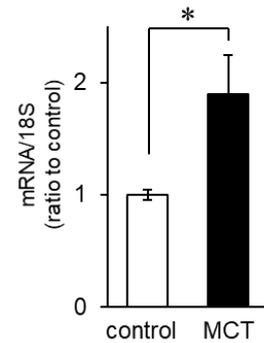


図 2. MCT 投与 2 週後の肺組織における内皮機能不全誘導分子 X 遺伝子発現 n=6, mean±SD, * p <0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 垣野明美、沢村達也
2. 発表標題 変性リポ蛋白質結合分子の機能とその意義
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣野明美、笹岡真衣、宇佐美陽子、佐田みずき、平田あや、岡村智教、沢村達也
2. 発表標題 内因性変性LDL阻害分子の発見と変性リポ蛋白質のヒトにおける意義
3. 学会等名 CVMW2021心血管代謝週間 / 第57回高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2021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	沢村 達也 (Tatsuya Sawamura) (30243033)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

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