

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591987

研究課題名(和文)ラットを用いた肺高血圧に対する新しい薬物治療アプローチ

研究課題名(英文)Mineralocorticoid receptor blockade attenuates proliferative changes in the rat pulmonary artery in monocrotaline-induced pulmonary hypertension

研究代表者

根本 慎太郎(NEMOTO, SHINTAROU)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20237811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧症における肺動脈リモデリング過程でのアルドステロン系の関与と、その拮抗による病態修飾の可能性を検討した。ラットモノクロタリン誘発肺高血圧に対し、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の投与の有無による比較試験を行った。無投与で認められた右心室圧の著しい上昇と右心室機能障害、肺小動脈での著しい中膜肥厚と筋性化、そして肺組織でのミネラルコルチコイド受容体、アンジオテンシン1a受容体、型変位増殖因子の各mRNAの過剰発現のすべてが拮抗薬の投与では有意に抑制されていた。肺高血圧の肺動脈リモデリング過程において、アルドステロン系の関与とその拮抗による改善効果が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate a role of mineralocorticoid receptor (MR) signaling in the arteriolar remodeling of pulmonary artery hypertension (PAH) by antagonizing MR. PAH was induced by a single subcutaneous injection of monocrotaline in male rats. Animals were divided in two groups: one group treated with oral MR antagonist and the other received no medication. MR antagonist treatment ameliorated increased reduced RV function and hypertrophy caused by elevated peak RV pressure seen in the group with no medication. The treatment group showed significantly less medial wall thickness and muscularization of PA compared to the group with no medication. MR antagonist treatment resulted in significant reduction in the mRNA levels of the MR, angiotensin 2 type 1a receptor and transforming growth factor beta1 in the lungs, when compared to the group with no medication. These results suggest that MR signaling plays a role in the proliferative vascular remodeling of PAH.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：肺高血圧 ミネラルコルチコイド受容体 ミネラルコルチコイド受容体拮抗剤 エプレレノン 治療

1. 研究開始当初の背景

近年先天性心疾患に対する外科治療は、外科技術と術前後管理の長足な進歩によりその成績は向上した。それに伴い先天性心疾患に惹起される重症な肺高血圧症を合併する症例を手術対象とする機会が増えた。様々な程度の血管内皮及び中膜平滑筋層の過剰増殖を主病態とする肺高血圧は術後も残存する 경우가多く、患者の生活クオリティと予後に大きな影響を及ぼす。よって手術による血行動態修復治療に加えてこの肺高血圧に対する治療を加える必要がある。

現時点では局所のサイクリック GMP とサイクリック AMP を増強する肺血管拡張療法が広く応用され効果が認められて来ているが、病態の本質である増殖性血管病変の形成 (肺高血圧リモデリング) 過程を修飾する薬物治療介入は十分とは言えない。

2. 研究の目的

我々は体動脈の硬化リモデリング過程の主要因の一つとして注目されているレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の関わりとアルドステロン拮抗薬によるリモデリング改善効果に注目し、肺高血圧リモデリング過程にも応用可能であるか否かを動物実験モデルで明らかとする。得られた結果はヒトでの臨床治療に応用可能なエビデンスの一つと成り得ると期待する。

3. 研究の方法

(1) 実験プロトコール

生後 7 週齢雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 220~250g) に monocrotaline (MCT) 60mg/kg を皮下注射した。以後投薬の違いにより以下の 3 群を設定した。MCT 投与の翌日から 3 週間にわたり eplerenone (EPL) 100mg/kg/日 をゾンデ法で連日経口投与する群 (EPL 群 N=6) と、同量の水道水を同法で連日投与する群 (Vehicle 群 N=8) とした。また naïve control (正常コントロール) として MCT と同量の生理食塩水を皮下注射

し、無投薬のまま観察した群を設定した (Sham 群 N=8)。この 3 群において MCT 投与前および投与後 1、2、3 週後に心臓超音波検査を行い左右心室形態と機能を測定した。MCT 投与 3 週後の心臓超音波検査後に心臓カテーテルを施行し両心室内圧を測定した。その後に動物を安楽死させ、心肺組織を摘出・保存し、後日組織学的および分子生物学的検討を行った。

予備実験では MCT 処置後 3 週には全ての動物で肺高血圧の完成と右室肥大を認めた。3 週以降は動物の体重増加がなくなり、Kaplan-Meier 法による検討では 4 週より死亡例が発生し 5 週では約半数が死亡する結果を得た。肺高血圧の慢性経過による非代償性右心不全および肝線維化等の MCT の全身臓器への障害による死亡と判断している。よって MCT 処置後 3 週間は肺高血圧の発症と進展、そして続発する右心室の代償性変化及び EPL の肺高血圧病態形成における作用を検討する適切な期間であると判断した。

(2) 心臓超音波検査

体重測定後、pentobarbiturate (25mg/kg) と xylazine (10mg/kg) を腹腔内投与し動物を鎮静した。自発呼吸下で横臥位とし、直腸温を測定し体温を保持した。観察・記録は EUB7000-HV (日立メディコ、大阪) を使用し、10MHz プローブを用いて行った。

左室乳頭筋レベルでの短軸断面像を描出し、両心室の各壁厚、拡張および収縮末期径を測定した。これより収縮末期における左室変形比 = 短径 (中隔 後壁方向) / 長径 (前壁側壁方向) を算出し、高い右心室圧による心室中隔の圧排程度を定量化した。組織ドップラー法 (サンプル幅を 2.5mm) により、三尖弁および僧帽弁の弁輪部側壁での等容性収縮時間 (IVCT)、等容性拡張時間 (IVRT)、駆出時間 (ET) を計測し心機能の指標として Tei index を (IVCT+IVRT)/ET より算出した。

(3)心臓カテーテル検査

心臓超音波検査後に pentobarbiturate (12.5mg/kg 腹腔内投与)を追加し、人工呼吸器(SN-480-7, シマノ製作所, 東京)管理下に行った。3FrのMILLARカテーテル(Model SPR524)を2本使用し、それぞれ右総頸静脈経路で右心室へ、右総頸動脈経路で逆行性に左心室へ挿入留置した。Log Worx(オメガウェア, 東京)を用いて計測を行った。両心室の収縮期圧(peak systolic pressure)、拡張末期圧(end-diastolic pressure)を測定し、右室/左室収縮期圧比(RV/LV peak systolic pressure ratio)を算出した。

(4)組織学的検査

心臓カテーテル検査の後に、動物を安楽死させ、心および肺を摘出した。直ちに各臓器の半分を10%formalin溶液固定 paraffin 包埋し、もう半分を液体窒素で新鮮凍結固定し-20 で保管した。後日、光学顕微鏡の検査ではECLIPSE 80i(Nikon)を使用し、画像ソフトはNIS-Elements Documentation(Nikon)を、計測ソフトはWin Roof(MITANI)を使用した。心臓はMasson's trichrome染色、肺はElastic-van Gieson染色を行った(KAC, 大阪)。肺組織では血管径50~150 μ mの傍気管支肺動脈に対して中膜肥厚(medial wall thickness, MWT%)と50 μ m以下の肺胞内細動脈に対して筋性化(muscularization%)をそれぞれ計測し定量化した。MWT%は、 $MWT\% = 2 \times \text{中膜層径/血管外径} \times 100$ とした。筋性化の評価は、肺胞内細動脈をnon, partially, fully muscularizationに分類し、partially + fully muscularizationの総数における%とした。右心室の線維化の評価を心筋細胞横断面積における間質線維化%を1標本あたり5箇所ずつ計測し定量化した。

(5)分子生物学的検査

肺組織における mineralocorticoid 受容体(MR), Angiotensin 1a型受容体(AT1aR)、

transforming growth factor (TGF- β 1)、の各 mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法で測定した。凍結保存組織を MagNA Lyser(Roche)で破砕分離後、RNA Isolation Kit III を用いて MagNA Pure LC(Roche)で総 RNA を抽出した。次に Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を作成した後に TaqMan Master を用いた probe assay 法により、LightCycler(Roche)でリアルタイム PCR を行った。解析は、Second Derivative Maximum 法で Ct 値を算出し、Ct 法を用いて比較した。GAPDH で各 mRNA 量を補正した。Primer と probe は Universal ProbeLibrary Assay Design Center (www.universalprobelibrary.com)より検索し、GeneDesign, Inc.と日本遺伝子研究所に作製を依頼した。

(6)血清 aldosterone 値測定

血清 aldosterone 値測定目的に、別の同様のラットを用いて3群(それぞれN=3)を設定した。犠牲死の際に心尖穿刺により得た血液サンプルから血清を分離・凍結保管した。後日液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計で血清 aldosterone 値を測定した(三菱化学メディエンス社へ外注)。

本実験プロトコールは我が国および米国 NIH (National Institutes of Health)の実験動物の愛護と使用管理についてのガイドラインに基づき、大阪医科大学動物実験委員会のガイドラインにより承認された。

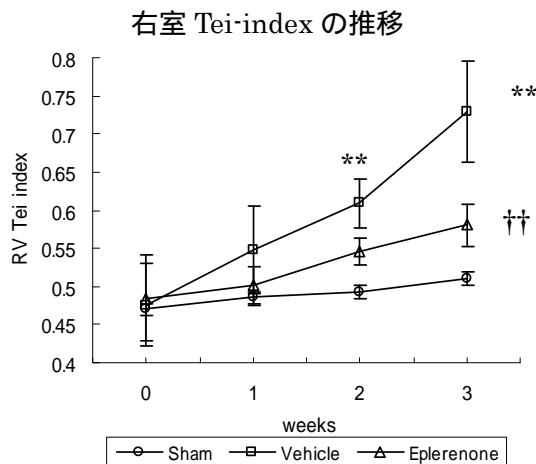
(7)統計解析

EPLの肺高血圧病変に対する効果の判定のため、得られたデータを設定した3群で比較検討した。データは平均値 \pm 標準偏差で示し、一元配置分散分析(one-way ANOVA)と二元配置分散分析(two-way ANOVA)を用いて、tukey検定による多重比較検討を行った。統計学的に $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) 心臓超音波検査結果

MCT 投与後 2 週から 3 週にかけて、Vehicle 群で Sham 群と比較し右室圧負荷を示す心室中隔の扁平化と有意な左心室の変形が生じた。左室変形比を計測すると Vehicle 群では MCT 投与後 2 週より左室変形が著しくなるが EPL 群では Sham 群と同様に正常に近く保たれていた。右室 Tei index は共に Vehicle 群では MCT 投与後 3 週で有意に高値であり、心機能の低下を生じていた。一方 EPL 群では Vehicle 群に比し右心室 Tei index は有意に低値であり、心機能は保持されていた。



mean \pm SD, ** $p < 0.01$ vs. Sham, † $p < 0.05$ vs. Vehicle, †† $p < 0.01$ vs. Vehicle

(2) 心臓カテーテル検査結果

Vehicle 群では 60.2 ± 4.7 mmHg と Sham 群 25.2 ± 4.3 mmHg に比し、有意かつ著明な右室収縮期圧の上昇から著しい肺高血圧の存在が示唆された。一方で EPL 群では 37.3 ± 3.9 mmHg と Vehicle 群と比べて有意に右心室圧は低値であったため血行動態的に肺高血圧の発生は軽度と考えられた ($p < 0.01$)。左室収縮期圧は各群間で有意差を認めなかった。右室/左室収縮期圧比は EPL 群 0.34 ± 0.05 、Vehicle 群 0.53 ± 0.04 で Vehicle 群と比べて有意に低値であった ($p < 0.01$)。

(3) 組織学的検査結果

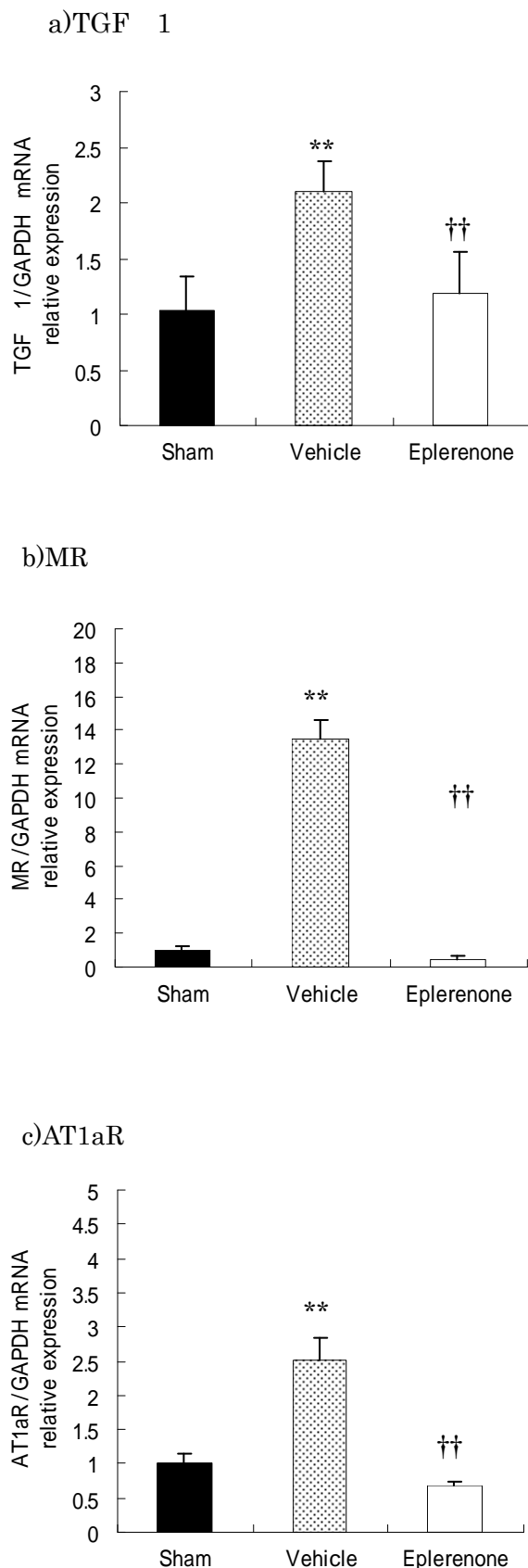
肺最小動脈：Sham 群に比較し、Vehicle 群で傍気管支肺動脈では著名な中膜肥厚と血管周囲の炎症細胞浸潤を認め、肺胞内細動脈は筋性化と血管周囲の膠原線維の増殖を認めた。一方 EPL 群ではその変化はいずれも軽度であった 1 標本あたり傍気管支肺動脈は 10~20 個を認め、肺胞内細動脈は 20~30 個を認めた。MWT% と muscularization% は EPL 群 20.7 ± 7.4 、 52.3 ± 5.3 で Vehicle 群 43.5 ± 7.5 、 80.2 ± 5.8 と比べて有意に低く ($p < 0.01$)、Sham 群 15.3 ± 2.9 、 11.1 ± 3.7 と有意差はなかった。

右心室の心筋：Vehicle 群では Sham 群に比著明な心筋細胞肥大と間質線維化が生じた。EPL 群ではその変化は軽度であった。算出した右心室心筋細胞横断面における間質線維化% は Sham 群 2.2 ± 0.4 に比し EPL 群は 3.1 ± 0.6 であり有意に増加していたものの、Vehicle 群 8.2 ± 1.0 と比べて有意に低値であり、線維化を抑制していた ($p < 0.05$)。

(4) 分子生物学的検討

肺組織における transforming growth factor (TGF- β 1)、mineralocorticoid 受容体 (MR)、Angiotensin 1a 型受容体 (AT1aR) の mRNA の発現を下図に示す。MCT の投与により Vehicle 群では TGF- β 1 と MR、および AT1aR の発現は Sham 群と比較して著明かつ有意に上昇していた ($p < 0.01$)。一方 EPL 投与により MCT 投与により増強したこれらの発現は有意に抑制され ($p < 0.01$)、正常値レベルであった。

各種 mRNA 発現



mean \pm SD, ** $p < 0.01$ vs. Sham, †† $p < 0.01$ vs. Vehicle

(5)血清 aldosterone 測定

Sham 群は 68.0 ± 34.7 g/mLであったが、Vehicle 群では 173.5 ± 37.3 g/mLと有意に高値であった ($p < 0.05$)。一方 EPL 群では 88.4 ± 7.3 g/mLと Vehicle 群に比し有意に低値であり ($p < 0.05$)、かつ Sham 群と同等であった。

(6)結果のまとめ

本研究から以下の所見を得た。MCT 誘発肺高血圧ラットモデルにおいて、初期からの EPL 投与により著しい肺高血圧の存在を反映する右室圧上昇と続発する右心室機能障害の防止が可能であった。また、これは左心室形態と機能に対しても良好な影響を与えていた。組織学的には MCT によって生じる一連の肺小動脈中膜肥厚と筋性化および右心室の心筋細胞肥大と心筋間質線維化が EPL により有意に抑制された。加えて MCT 投与後無治療群 (Vehicle 群) で生じた肺組織での MR, AT1aR の mRNA の過剰発現が EPL 投与で抑制された。更に組織増殖因子のなかでも代表的な TGF- β 1 の mRNA の発現の MCT 投与により惹起される肺組織での発現上昇が EPL により抑制された。MCT に誘発された PH ラットでは血清 aldosterone 値が有意に上昇していたが、EPL 投与により正常と同等のレベルに抑制されていた。以上より MCT 誘発肺高血圧ラットにおける肺血管病態形成の少なくとも一部に aldosterone-MR 系が関与する可能性が示唆された。同時に EPL は MCT による肺高血圧における増殖性の肺血管リモデリングを修飾し得ることが示唆された。

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)

羽森 貴、根本慎太郎、佐々木智康、勝間田敬弘、岸勘太、奥村謙一、尾崎智康、

片山博視、Monocrotaline 誘発肺高血圧ラットにおける肺小動脈リモデリング形成過程における Mineralocorticoid receptor 拮抗剤 eplerenone の効果、日本小児循環器学会誌、査読あり、第 30 巻、2014、印刷中

羽森 貫、モノクロタリン誘発肺高血圧ラットに対するエプレレノンの効果、大阪医科大学雑誌、査読あり、第 69 巻、2010、11-31

〔学会発表〕(計 4 件)

羽森 貫、佐々木智康、禹 英喜、垣田真理、岸 勘太、奥村謙一、森 保彦、勝間田敬弘、根本慎太郎、モノクロタリン誘発肺高血圧ラットに対するエプレレノンの効果、第 47 回日本小児循環器学会総会・学術集会、2011.7.6 福岡

Kan Hamori, Shintaro Nemoto.

Mineralocorticoid receptor blockade attenuates proliferative changes in the rat pulmonary artery in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. American Heart Association, Scientific Sessions 2010.11.15, Chicago, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

根本慎太郎 (NEMOTO Shintaro)
大阪医科大学・医学部・胸部外科学・准教授
研究者番号：20237811

(2)研究分担者

寺崎文生 (TERASAKI Fumio)
大阪医科大学・医学部・内科学 3・准教授
研究者番号：20236988

高井真司 (TAKAI Shinji)
大阪医科大学・医学部・薬理学・准教授
研究者番号：80288703

岸 勘太 (KISHI Kanta)
大阪医科大学・医学部・小児科学・助教
研究者番号：20408503

森 保彦 (MORI Yasuhiko)
大阪医科大学・医学部・小児科学・助教
研究者番号：20287345

(3)連携研究者

奥村謙一 (OKUMURA Kenichi)
大阪医科大学・医学部・小児科学・助教
研究者番号：10349699

羽森 貫 (HAMORI Kan)
大阪医科大学・医学部・リハビリテーション医学・助教
研究者番号：90581207