

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25日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790687

研究課題名（和文） 血漿マイクロパーティクルを用いた膠原病肺高血圧の発症に関わる分子発現異常の評価

研究課題名（英文） Evaluating Plasma Endothelial Cell-derived Microparticles for Detecting Abnormal Expression of Molecules Involved in Onset of Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Connective Tissue Diseases

研究代表者 丸山 秀和 (MARUYAMA HIDEKAZU)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：30528493

研究成果の概要（和文）：肺高血圧症に対する新たな診断法の確立を目的として、肺高血圧症患者の末梢血中の血管内皮細胞由来マイクロパーティクルを測定した。既存の報告を参考にして6種類の表面抗原をマーカーとして定量したが、有意に増減しているものは認められなかった。新たな表面マーカーの選定のため、接触障害の抑制を指標とした培養細胞モデルを作製した。臨床的に発症に関連していると考えられる2因子が、接触障害の抑制に必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We aimed to establish a new method for diagnosing pulmonary arterial hypertension. The endothelial cell-derived microparticles in plasma are quantified targeting six surface antigens, although, we could not find significant change between the patients and controls. To select new surface markers, we created an in vitro model using cultivated endothelial cells evaluated by impairment of contact inhibition. Certain two factors, which are thought to be related to onset of the disease, were essential for this impairment.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 2011年度 | 300,000 | 90,000 | 390,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：肺高血圧症、血管内皮細胞、バイオマーカー、マイクロパーティクル、膜タンパク、膠原病、接触障害、セロトニン

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症は原因が特定されておらず、現在の診断基準は肺動脈圧の上昇に基づいている。しかしながら、肺動脈圧は有効肺血管床が1/3以下となって上昇するため、

診断の時点で必然的に有効肺血管床の大半は喪失している。発症への関与が疑われる血管内皮細胞由来の分子の測定が可能となり、それより同疾患を診断することができれば、発症以前の内服治療の介入によって Quality of Life の向上や多額の医療費の削減が期待

できる。

進行した肺高血圧症患者では、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)、 α -smooth muscle actin (α SMA) などの発現異常が肺動脈の血管内皮細胞に認められる。それらの発現異常が本疾患の発症に関与しており、その発現量の評価が発症の早期発見に有用であると考えられた。しかしながら肺生検は侵襲性が高いため日常診療では行えない。

血管内皮細胞は刺激を受けると、膜分子を含んだ小胞 (endothelial cell-derived microparticles: EMP) を細胞表面から循環血液中に放出する。血漿の EMP は血管内皮細胞に特異的な抗原をもとにフローサイトメトリーを用いて評価される。現在までに VE-カドヘリンや PECAM-1 のような安定して発現している血管内皮マーカーが陽性の血漿 EMP 数が、冠動脈疾患など循環器疾患で上昇していることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、末梢血中に存在する内皮細胞由来の分子のうち発症に関与する分子を特定し、最終的に肺高血圧症の病初期のマーカーとして利用することである。肺動脈圧が上昇する以前の診断は不可能であったが、本研究の手法が確立すれば発症以前に肺高血圧症の前兆の発見が期待できるため、より早期の治療介入が可能となる。また初期から異常をきたしている分子が特定できた場合、発生機序の解明および治療標的の検討、治療効果の判定にも有益であると考えられる。

肺動脈血管内皮細胞で発現している接触阻害に関与する膜タンパクの発現低下が、本疾患の発症に関与していると仮説をたてた。EMP のマーカーの選定のため培養細胞を用いたモデルを作製し、膜タンパクの異常を検索する。

3. 研究の方法

EMP のマーカーの候補の選定を以下の 3 つの方法で行うこととした。(1)既存の報告をもとに検討する、(2)培養細胞モデルを作製し膜タンパクの異常を検索する、(3)肺高血圧症患者の肺組織を用いてマイクロアレイで検索する。

肺高血圧症患者、肺高血圧症を合併していない膠原病患者、および健常者の末梢血を採血し、血漿を遠心分離し凍結保存した。肺高

血圧症患者が疑われる患者は右心カテーテルを施行し、肺動脈圧、心拍出量、肺血管抵抗を測定した。症例が一定数に達したところで血漿を解凍し、蛍光標識抗体を添加してフローサイトメトリーを用いて EMP およびこれまでの報告から発症に関連すると予測した PECAM-1、 β 1-integlin、ICAM-1、PDGFR α 、PDGFR β 、KDR が陽性の血漿マイクロパーティクル数を定量した。

培養系でのそれらの変化を評価するためのモデルを作製した。購入した培養血管内皮細胞を一層で培養し、培地に肺高血圧症の危険因子と考えられている薬剤 (セロトニンなど) を複数組み合わせ投与した。コンフルエントに達した直後、細胞層をアルコールで固定した。固定後の同細胞層の上に重層して血管内皮細胞を播種し、細胞の増殖を定量評価し、接触阻害の低下をもたらす因子を考察した。

EMP で評価する膜タンパクの選定のために肺組織のマクロアレイが有用と考えられた。肺高血圧患者および肺腫瘍患者 (対照) の肺組織を得るため、ベルギーにおける肺高血圧治療の中心的施設であるブリュッセル自由大学に留学し共同研究を開始した。

4. 研究成果

(1) 特発性もしくは膠原病に合併する肺動脈性肺高血圧症患者群、肺高血圧を合併しない膠原病患者群、健常ボランティア群の各々 8 例、12 例、12 例を登録した。特発性もしくは膠原病に合併する肺動脈性肺高血圧症患者は全例で右心カテーテル検査を行い、肺動脈圧、肺血管抵抗を測定した。登録した患者から末梢血を採取し、血漿を遠心分離し凍結保存した。

(2) 保存した血漿を解凍して、フローサイトメトリーを用いて PECAM-1、 β 1-integlin、ICAM-1、PDGFR α 、PDGFR β 、KDR 陽性の血漿マイクロパーティクル数を定量した。現在までの解析では肺高血圧症群で統計学的に有意な増減を示すものは認められていない。

(3) 肺動脈血管内皮細胞で発現している接触阻害に関与する膜タンパクの発現低下が、新生内膜の形成に関与していると仮説をたてた。培地に肺高血圧症の危険因子と考えられる薬剤 (セロトニンなど) を複数組み合わせ投与した後、培養血管内皮細胞層をアルコールで固定した。

同細胞層の上に重層して血管内皮細胞を播種したところ、I 型コラーゲンおよび血管

平滑筋細胞層を固定したものと比較し、薬剤を投与していない血管内皮細胞層を固定したものに血管内皮細胞を重層させた場合は細胞増殖が有意に阻害されていた(図1.)。

培養液中に6薬剤すべて同時に投与した場合には、投与せずに培養した内皮細胞層と比較して有意に阻害が抑制された(図2.)。このことは、膜タンパクを介した接触阻害のシグナルが抑制されたことを示唆していると考えられた。

そのうちの必須な要素を検討する目的で6薬剤のうち5薬剤のみの組み合わせを投与した。2種の薬剤が増殖阻害の抑制に必須であると考えられた(図3.)。

この時点で下記(4)の留学が開始となった。留学先施設でこのモデルで低下している接触阻害関連膜タンパクの検索を計画している。

(4) 新たなマーカーの候補としての膜タンパクの検索のため、ベルギーにおける肺高血圧治療の中心的施設(ブリュッセル自由大学)と共同研究を計画し、同施設での留学を開始した。同施設において肺高血圧症に対する肺移植手術が施行されている。その際に得られる肺高血圧症患者の肺組織3件、および肺腫瘍に対する手術によって得られた対照としての肺組織3件を用いて mRNA マイクロアレイを行って新たな EMP のマーカーの候補を選定する予定である。

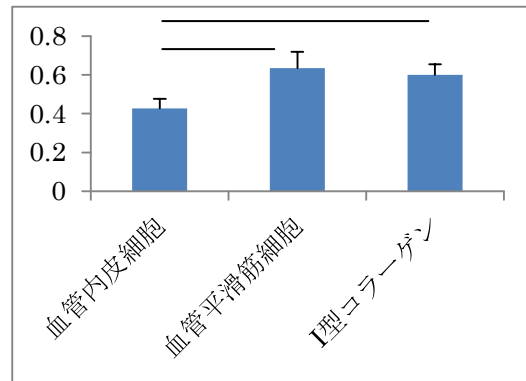


図 1.

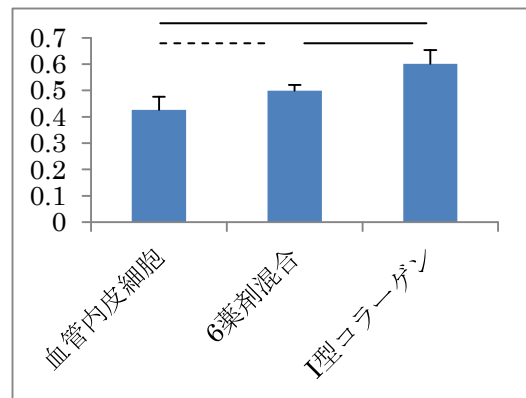


図 2.

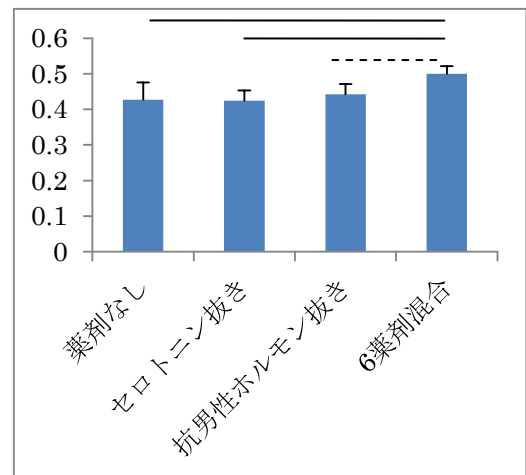


図 3.

----- p<0.01
 ————— p<0.05

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)

なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
丸山 秀和 (MARUYAMA HIDEKAZU)
筑波大学・附属病院・病院講師
研究者番号：30528493