

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591166

研究課題名(和文) 肺高血圧症血管リモデリング形成過程における IL - 17 の役割の解明

研究課題名(英文) 9

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：低酸素性肺高血圧症重症度と発症過程に対する IL17A の関与を検討した結果、IL17 A 欠損低酸素曝露群(KO/hypo)は、野生型低酸素曝露群(WT/hypo)と比較して右室収縮期圧、右室肥大の程度で有意な差はなかったが、肺細小血管の筋性化においては抑制傾向を示した。低酸素曝露の全経過を通じて、WT/hypo では炎症性サイトカインの発現上昇がみられ、KO/hypo では抗炎症性サイトカインの発現が上昇していた。以上より IL-17A は重症度と発症過程に関与している可能性が示唆されたが、マウスモデルにおける重症度の解析は困難で、さらなる検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether IL17A is associated with the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension (PH), C57B6 wild type (WT) and IL17A-deficient (KO) mice were exposed to hypobaric hypoxia (hypo) for up to 42 days. The degree of right ventricle systolic pressure (RVSP) and right ventricular hypertrophy (RVH), and percentages of muscularized peripheral vessels (%muscularity) were increased in WT/hypo group compared with WT control group after 21-day hypoxia. No difference was observed in RVSP, RVH between KO/hypo and WT/hypo group. There was slight decrease in %muscularity in KO/hypo group compared with that in WT/hypo group. Inflammatory cytokines were increased in the development process of PH in WT/hypo group, whereas, anti-inflammatory cytokines were increased in KO/hypo group compared with WT/hypo group. In conclusion, IL17A might be associated with the progression of hypoxic PH, however, additional studies are necessary in order to be elucidated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：低酸素 筋性化 右室肥大

1. 研究開始当初の背景

厚生省難病(特定)疾患に指定されている原発性肺高血圧症(IPAH)は、肺血管を構成する細胞の異常増殖による血管内腔の狭窄・閉塞(血管リモデリング)により肺血管床の低下を引き起こし、右心不全と重篤な低酸素血症をきたして死亡する、血管病変を中心とする非可逆性の疾患である。典型的な肺組織では、血管周囲に炎症性細胞浸潤がみられ、interleukin(IL)-6をはじめとする炎症性サイトカインの過剰発現がみとめられる。また、近年、家族性 IPAH の患者に、TGF beta スーパーファミリーの Bone morphogenetic protein receptor (BMPRII) の遺伝子変異が発見されている。TGF beta は、細胞分化・増殖やアポトーシスに関係するサイトカインで、近年、新しい CD4⁺T 細胞サブセットとして発見され、非常に強い炎症作用がある Th17 細胞と、FoxP3⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞(以下 T reg)の分化誘導にとって必須のサイトカインであることが報告されている。

二次性肺高血圧症は、組織の慢性炎症をきたす強皮症、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患患者に高頻度にみられる。自己免疫疾患は、T reg の機能の変化が関与することが明らかになっている。また、一方で、最近、Th17 細胞が、病態形成に密接に関与することが報告されている。この二つの細胞群は、互いに抑制し合うことがわかっており、自己免疫疾患発症においては、Treg / Th17 バランスの不均衡が関与している可能性が考えられる。以上より、原発性肺高血圧症、および二次性肺高血圧症における血管リモデリング形成には、血管障害部位での T 細胞由来サイトカインの過剰発現、あるいは、バランス不均衡が重要な役割を果たしていることが強く疑われる。本研究では、Th17 細胞が主に分泌するとされる IL17A に注目し、低酸素性肺高血圧血管リモデリングへの IL17A の関与について検討する。

2. 研究の目的

肺高血圧症にみられる血管内皮細胞・血管平滑筋細胞などの血管を構成する細胞の異常増殖と、血管機能異常

に対して、炎症がどのように関与するかを IL17A に着目して検討する。

3. 研究の方法

1) 野生型マウスの低酸素曝露における IL17A および関連サイトカインの経時的変化

C57B6 オス野生型マウスを低酸素曝露チャンバー(低圧低酸素、1/2 大気圧)内で飼育し、低酸素曝露 0 日(day 0)、3 日(day3)、7 日(day7)、14 日(day14)、21 日(day21)にネブタール腹腔内麻酔下に開腹、脱血にて安楽死させた後、肺採取する。採取肺を用いて real time PCR 法を用いて解析する。

2) IL17A 欠損マウスと野生型マウスの低酸素曝露における肺高血圧発症過程における血管リモデリングと重症度の経時的変化

(1) 野生型マウス(WT)と IL17A 欠損マウス(KO)の低酸素曝露モデル作成と右室負荷の解析

低酸素曝露群(hypo)は、低圧低酸素曝露チャンバー(1/2 大気圧、380 mmHg)内で 21 日間飼育し、コントロール群(norm)は、同様の期間を大気圧で飼育することにより作成する。ネブタール腹腔内投与により麻酔し、自発呼吸下にて closed chest technique により右室圧を測定後、採血により安楽死させ、灌流後、両肺、心臓を摘出する。摘出した心臓から右室肥大の程度を左室自由壁+心室中隔に対する右室自由壁の重量の比率により定量化し、右心負荷の重症度を評価する(%RV/LV+S)。

(2) 肺血管リモデリング、炎症の程度の解析

摘出した肺は、ホルマリン、またはメタノール/クロロフォルム/氷酢酸混合液により固定し、パラフィン標本を作成し、HE 染色で炎症性細胞浸潤の程度を検討する。また、 α smooth muscle actin について免疫組織化学染色を行い、肺胞管から肺泡に隣接する肺細小血管の筋性化率を定量化することにより血管リモデリング

(%muscularity) の程度を評価する。

%muscularity

= (筋性化細小血管数 / 細小血管総数) × 100 (%)

3) 肺高血圧発症過程における IL17 ファミリーサイトカイン、転写因子、増殖因子、接着因子、血管作動性物質の発現の経時的変化

野生型マウスおよび IL17A 欠損マウスにおいて、day 0 から day42 までの時点でそれぞれ肺を採取し、real time PCR 法で検討し、肺高血圧発症過程との関連を検討する。

4. 研究成果

1) 野生型マウス (wt) の低酸素曝露における IL17A および関連サイトカインの経時的変化

IL17A の発現は、day0 より上昇し、day7 においてピークがみられた。以上から、IL17 は、低酸素曝露されたマウス生体肺において発現の上昇を認めた。一方、ROR gamma-t については、IL17A と同様の経時的変化は認められなかった。

2) IL17A 欠損マウスと野生型マウスの低酸素曝露における肺高血圧発症過程における重症度と血管リモデリングの経時的変化

野生型コントロール群 (WT/norm)、野生型低酸素曝露群 (WT/hypo)、IL17A 欠損コントロール群 (KO/norm)、IL17A 欠損低酸素曝露群 (KO/hypo) の 4 群において、以下の結果を得た。

WT/hypo 群は WT/norm 群と比較して、

ヘマトクリット値

(Ht)、%RV/LV+S、%muscularity において有意に高値を示したことから、低酸素性肺高血圧を発症したと考えられた。KO/hypo 群は WT/hypo 群と比較して、RVSP、RV/LV+S では有意な差は認められなかったが、Ht 値に上昇を認め、%muscularity においては低下傾向を示した。以上より、IL-17 は、低酸素性肺高血圧における肺小血管の筋性化に関与している可能性が示唆された。

従来、肺高血圧動物モデルには、ラットが使用されて来た。ラットは、低酸素曝露およびモノクロタリンに対する感受性が高く、肺高血圧モデルの作成が容易である。さら

にラットは、生理学的手法による解析も容易に行える。一方、近年マウスによる肺高血圧モデルによる研究が増えて来ている。マウスは、低酸素に対する感受性が鈍く、肺高血圧の程度、右室肥大の程度、肺血管リモデリングの程度いずれもラットに比較して軽度であった。KO/hypo 群において、%muscularity のみが WT/hypo 群と比較して低下傾向を示した。検体数を増やして解析を試みたが、野生型の血管リモデリングが軽度であったため、重症度評価が困難であった。

3) 野生型マウス (WT) と IL17A 欠損マウス (KO) の肺高血圧発症過程における IL17 ファミリーサイトカイン、転写因子、増殖因子、接着因子、血管作動性物質の発現の経時的変化

全経過を通じて、TNFalpha, CCL2, VEGF, G-CSF は、WT/hypo で KO/hypo と比較して発現が高かった。一方、IL10 については、KO/hypo が全過程で発現がみられたのに対し、WT/hypo では低かった。

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 3 件)

- (1). Maruyama J, Okada A, Zhang E, Yokochi A, Ma N, Maruyama K. Age and sex dependency of severity of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Exp Clin Cardiol*. In press
査読あり
- (2). Yamada Y, Maruyama J, Zhang E, Okada A, Yokochi A, Sawada H, Mitani Y, Hayashi T, Suzuki K, Maruyama K. Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Anesth*. Feb;28:26-33 (2014)
査読あり
- (3). Maruyama J, Yokochi A, Zhang E, Sawada H, Maruyama K. Nitric oxide in the pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension. *Pulmonary Hypertension*. ISBN

980-953-307-704-3 InTech.
http://dx.doi.org/10.5772/55680 (2013)
査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 張尔泉、山田康晴、丸山淳子、横地歩、大元文香、丸山一男、モノクロタリン(MCT)誘発性肺高血圧発症に対するトロンボモジュリン(TM)の抑制効果の検討. 麻酔(2014) Vol.63 P.63. (抄録) 第61回日本麻酔科学会(横浜)
- (2) 張尔泉、南波里奈、陳通、横地歩、丸山淳子、丸山一男、慢性低酸素暴露肺高血圧に対するH₂Sによる血管病変の抑制効果. 麻酔(2013) Vol.62 P.75. (抄録) 第60回日本麻酔科学会(札幌)
- (3) 山田康晴、丸山淳子、張尔泉、上野浩明、小林睦、岩下義明、横地歩、澤田博文、大元文香、原田慎一、陳通、南波里奈、今井寛、丸山一男、従圧式人工呼吸におけるVILIラットモデルの作成. 抄録集(2013) P.181. 第35回日本呼吸療法医学会学術総会(東京)
- (4) 張尔泉、大森彩加、丸山淳子、横地歩、澤田博文、丸山一男、モノクロタリン誘起肺高血圧症におけるNOS発現とソルスタゾールによる発症抑制作用. 麻酔(2012) Vol.61 P. (抄録) 第59回日本麻酔科学会(神戸)
- (5) 中西雄紀、岡田アムボン、張尔泉、横地歩、丸山一男、丸山淳子、低酸素性肺高血圧症におけるIL17の関与 麻酔(2011) Vol.60 p56 (抄録) 第58回日本麻酔科学会(神戸)

〔図書〕(計 3 件)

- (1) 丸山淳子 呼吸と肺 スタンダード生理学 文光堂 p 77-105 (2013)
- (2) 丸山一男、張尔泉、横地歩. 呼吸の生理. クリテイカルケアにおける呼吸管理. 編集: 氏家良人. 克誠堂出版. p 3-12 (2013)
- (3) Maruyama K, Zhang E, Maruyama J Clinical application of inhaled nitric oxide. Gas biology research in clinical practice. Karger p43-55 (2011)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
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
- (2) 研究分担者
加藤琢磨 (Kato Takuma)
三重大学 大学院 医学系研究科 免疫学
準教授
研究者番号: 60224515
- (3) 研究分担者
丸山 一男 (Maruyama Kazuo)
三重大学 大学院 医学系研究科 麻酔集
中治療学 教授
研究者番号: 20181828