

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791144

研究課題名(和文)次世代型DNA解析システムを用いた肺高血圧治療薬の有効性と遺伝子多型の関連の検討

研究課題名(英文)Evaluation between gene-polymorphism and efficacy of therapy for pulmonary arterial hypertension using next-generation DNA analysis system

研究代表者

杉本 昌也(Sugimoto, Masaya)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20400096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：先天性心疾患に伴う肺高血圧に関して、高感度トロポニンIが肺高血圧患者で有意に上昇が見られ、肺体血圧比(Pp/Ps)と良く相関していることがわかった。また、心臓MRI検査を実施し、流速波形から求めるMCFRがカテーテル検査で求めたPp/Psと良く相関していることを突き止めた。さらに、川崎病冠動脈病変を遠隔期まで有する症例は肺血管床のコンプライアンスが悪いことがわかった。肺高血圧患者の病態の解明に一定の成果が得られたが、次世代型DNA解析システムを用いた先天性心疾患における肺高血圧をもたらす遺伝子多型の調査は、現在データ解析中であり、今後も引き続き研究を継続していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：We studied pulmonary arterial hypertension in children with congenital heart disease. Serum high sensitivity cTnI levels significantly correlated with Pp/Ps in children. The Qs and Qp/Qs obtained by MRI strongly correlated with those obtained by catheterization, and a significant correlation was observed between the MCFR and Pp/Ps. Moreover, unlike patients with regressed CALs (coronary arterial lesion) in Kawasaki Disease, patients with persistent CALs have abnormal mechanical properties and hemodynamics of the pulmonary artery.

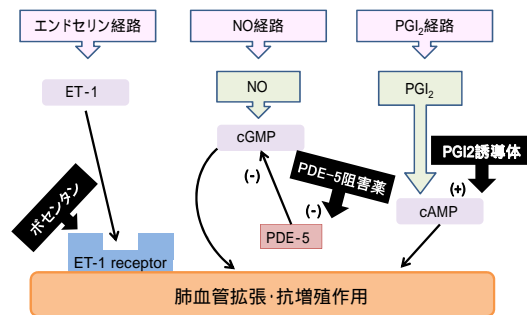
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺高血圧症 先天性心疾患

## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧(PH)は心臓疾患あるいは肺疾患の最終的な病態のひとつであり、難治性で生命予後が非常に悪い。PHの病態としてエンドセリン(ET-1)、アンジオテンシン、トロンボキサン A2 などの過剰産生による血管収縮、平滑筋細胞増殖、血栓形成があり、それらを抑制する一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)の産生が減少している。これらのメディエーターの濃度は各々遺伝子発現により調節され、現在までにBMPR2、NO合成酵素、ET-1受容体、PGI<sub>2</sub>合成酵素、セ



(図. 肺動脈を拡張する経路と肺高血圧治療薬)

ロトニン(5HT)、ポタシウムチャンネル(Kv)および活性酸素(ROS)の関与が知られている(Ghofrani HA, J Am Col Cardiol, 54: 108-117, 2009)。従って、これらの蛋白質の遺伝調節を解明することはPHの病因、予後を改善させる情報を提供する可能性がある。

### 【肺高血圧治療薬の登場】

肺血管を拡張させる経路として図(次頁)が知られており、それぞれの経路をターゲットにした治療薬が開発されている(Humbert M, N Engl J Med, 351: 1425-1436, 2004)。ET-1受容体拮抗薬であるボセンタンには、肺高血圧症213例に対し16週間にわたる二重盲検プラセボ対照試験を行い、治療群で6分間歩行距離とNYHA心機能分類が改善したとする報告がある(Rubin L, N Eng J Med, 896-903, 2002)。一方、血管平滑筋の細胞内でNOや心房性Na利尿ペプチドなどにより生成されるcGMPは血管拡張や細胞増殖抑制に作用する。ホスホジエステラーゼ5(PDE-5)阻害薬であるシルデナフィルは、cGMPを特異的に分解しPHに対し容量依存性に血行動態を改善する(Galiè N, N Eng J Med, 353: 2148-2157, 2005)。また、PGI<sub>2</sub>誘導体であるエポプロステノールの持続静注療法はPH患者の長期生存率を大幅に改善させることが知られている(McLaughlin VV, Circulation, 106: 1477-1482, 2002)。

### 【先天性心疾患と肺高血圧】

先天性心疾患の中には、生直後からPHをきたす症例が存在する。酸素投与やNO吸入療法を行い、適切な外科治療の介入によって多くは改善がみられる。しかし、一部で治療に対する反応性の乏しい例や術後早期の突然の低拍出症候群により救命できない症例も多数経験する。さらにPHが長期に及ぶと、リモデリングによる肺血管自体の硬化が起こり、Eisenmenger化という不可逆変化を引き起こす。そこで近年、肺高血圧治療薬の投与が試みられている。これらの臨床経験から申請者は、生直後からPHをきたす先天性心疾患の原因をなんとか突き止めたいと考えた。

### 【肺高血圧と遺伝的素因】

NO合成酵素のGlu298Asp多型は高血圧の強い危険因子であり、PGI<sub>2</sub>受容体のR212H多型はPGI<sub>2</sub>受容体の結合親和性を低下させる(Rossi GP, J Am Col Cardiol, 41: 938-45, 2003)。ET-1受容体遺伝子のうちETAには6つの多型とETBの3つの多型には投与薬剤の反応性に差があるという報告がある(Nicaud V, Am J Hypertens, 12: 304-10, 1999)。こうした研究から薬物に対する反応性の違いは患者本人の遺伝的背景に起因する可能性が大きいと考えられている。しかし、先天性心疾患に伴うPHに対し、肺高血圧治療薬の反応性を受容体遺伝子の多型性といった観点から検討した報告はなく、さらに他の遺伝的素因を網羅的に調査することは試みられていない。

## 2. 研究の目的

以下の2点を研究目的として、実験計画を立案した。

- (1)先天性心疾患に伴う肺高血圧の原因遺伝子の同定。
- (2)肺高血圧治療薬の有効性と受容体遺伝子多型の検討。

## 3. 研究の方法

### (1)心臓カテーテル検査

PH患者を対象に心臓カテーテル検査を行い肺動脈圧(PAP)、体血圧(ABP)、肺体血圧比(Pp/Ps)、肺血管抵抗(Rp)および、心拍出量(C.O.)を求める。さらに、急性肺血管反応試験としてNO吸入によるPAPの変化やRpの変化を調査する。

### (2)血液サンプルの採取とDNAの抽出

PH患者の血液サンプルを採取し、DNAを抽出する。同時に、NT-proBNPやP<sub>2</sub>、高感

度トロポニン I などの血清バイオマーカーを測定する。

(3) Sure Select ターゲットリシーケンスシステムを用いた特定領域の選定

Sure Select ターゲットリシーケンスシステムを用いて、シーケンスしたいターゲット領域を決定する。例えば、エンドグリンや ALK1 遺伝子は TGF family に属する PH 遺伝子である (Machado RD, J Am Coll Cardiol, 54: 32-42, 2009)。そこで TGF family のすべての遺伝子の塩基配列解析を行なうなど効率良くデータが得られる領域を選定し、DNA オリゴをデザインする。

(4) 次世代型 DNA 解析システム (SOLiD™ システム) による解析

抽出した DNA を SOLiD™ システムを用いて、全エクソンの塩基配列解析および、受容体遺伝子多型の解析を行う。このシステムは 1 回のシーケンシングで 3 ギガ (30 億) ベース以上のマッピングが可能なデータを生み出す (Metzker ML, Nat Rev Genet, 11: 31-46, 2010)。

4. 研究成果

まず初めに、先天性心疾患を有する患者を対象に、心臓カテーテル検査を行い肺動脈圧 (PAP)、体血圧 (ABP)、肺体血圧比 (Pp/Ps)、肺血管抵抗 (Rp) および、心拍出量 (C.O.) を求めた。患者群を疾患別に分類、さらに肺高血圧の有無に注目して分類した。

また、臨床データの収集と同時進行で、血液サンプルの採取と DNA の抽出を行った。さらに、得られた血液データから各種バイオマーカーを測定した。

心筋障害の最も鋭敏なマーカーである高感度トロポニン I (cTnI) を測定したところ、PH 患者で有意に上昇が見られた (図 2)。さらに、cTnI は肺体血圧比 (Pp/Ps) と良く相関していることが分かった (図 3)。このことは、心室中隔欠損に伴う PH 患者の他覚的評価につながる可能性がある (Sugimoto M, Circulation Journal, 75: 2213-2219, 2011)。

図 2. cTnI と肺高血圧疾患

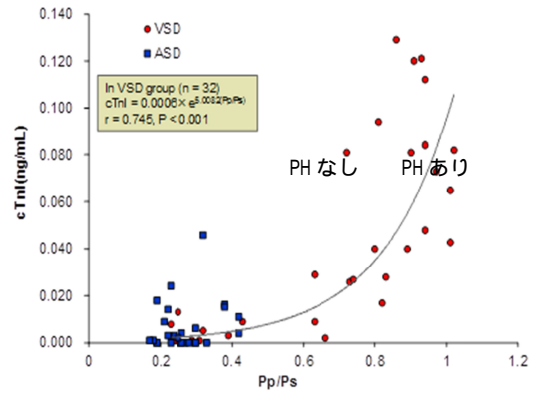
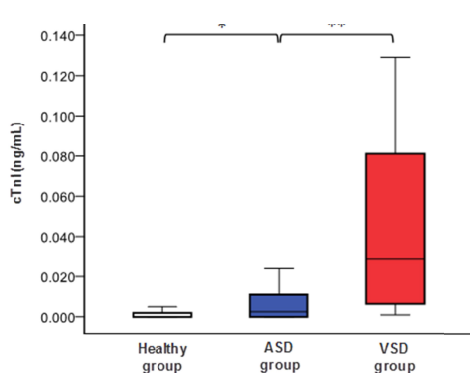


図 3. cTnI と Pp/Ps

今回の研究で、心臓カテーテル検査を行った疾患群のうち、川崎病の冠動脈病変を有する患者が一定数存在した。このため、血行動態解析のサブ解析として、川崎病罹患後遠隔期における冠動脈病変の有無と、肺血管床のコンプライアンスとの関係を調査した。その結果、冠動脈病変を遠隔期まで有する症例は肺血管床のコンプライアンスが悪いことがわかった (表)。(Sugimoto M, Am J Cardiol, 109: 1219-1222, 2012)

表. 疾患別肺血管インピーダンス

Variable	Patients With CALs		Controls
	Persistent	Regressed	
Heart rate (beats/min)	108 ± 18	111 ± 16	108 ± 19
Cardiac index (L/min/m <sup>2</sup> )	4.3 ± 0.8	4.2 ± 0.7	4.6 ± 0.7
Systolic blood pressure (mm Hg)	99 ± 14	95 ± 14	98 ± 13
Characteristic impedance (dyne · s · cm <sup>-5</sup> · m <sup>2</sup> )	49 ± 28	44 ± 16	45 ± 22
Pulmonary vascular resistance (dyne · s · cm <sup>-5</sup> · m <sup>2</sup> )	287 ± 117	274 ± 108	247 ± 80
Compliance (ml/mm Hg/m <sup>2</sup> )	5.2 ± 2.5* <sup>†</sup>	8.4 ± 4.0	8.4 ± 5.4
Reflection coefficient (dyne · s · cm <sup>-5</sup> · m <sup>2</sup> )	50 ± 38* <sup>†</sup>	37 ± 26	36 ± 24

Data are expressed as mean ± SD.

\* p < 0.05 versus patients with regressed CALs; <sup>†</sup> p < 0.05 versus controls.

一方、肺高血圧の評価を非侵襲的に行うことを目的として、心臓 MRI 検査を合わせて実施した。cine MRI の撮影法のうち位相画像 (phase contrast) 法は任意の血管断面の心時相毎の流速が測定でき、観血的な心臓カテーテル検査などと比べ、より低侵襲で安全に行える測定法として注目されている。今回我々は、本研究のサブ解析として MRI を用いて肺血流および体血流を定量し、心臓カテーテル検査で求めた計測値と比較しその有用性を検討した。

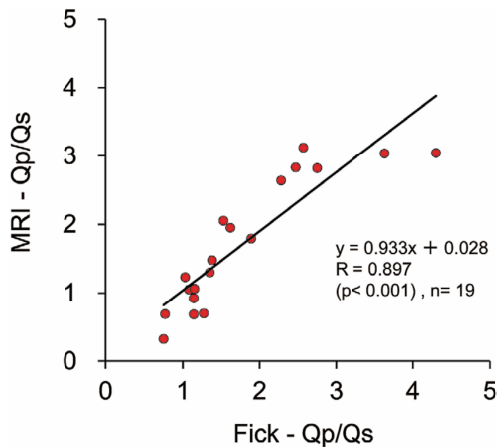


図4. 心カテで求めた Qp/Qs と MRI の比較

図4は cineMRI で求めた肺体血流比(Qp/Qs)が実際の心臓カテーテル検査で求めた値と良く相関していることを示す。さらに、平血圧を推定する指標としてMRIの流速は波形に注目し、そこから求めたMCFR(maximal change in flow rate during ejection)がカテーテル検査で求めた肺血圧(Pp/Ps)と良く相関していることを突き止めた(図5)。(Sugimoto M, Circulation Journal, 77: 3015-3022, 2013)

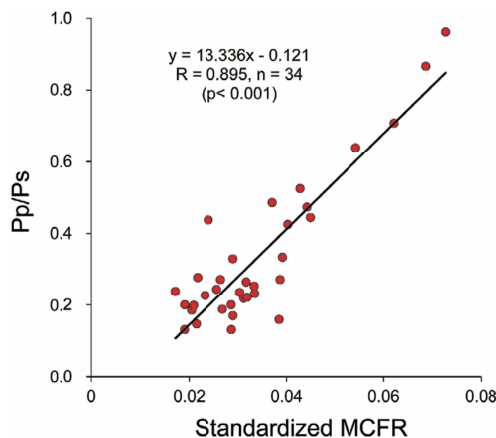


図5. MRI で求めた MCFR と Pp/Ps の比較

以上が、本研究における研究成果となる。対象患者から得られたDNAを用いて、次世代型DNA解析システム(SOLiD™システム)による解析を現在施行中これまでに得られたゲノムマッピング情報も膨大な量に膨れ上がっており、解析にはあと数年かかることが予想される。今後も引き続き解析を継続し、先天性心疾患に伴う肺高血圧の原因遺伝子の同定。肺高血圧治療薬の有効性と受容体遺伝子多型の検討を行っていく所存である。

## 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6件)

杉本昌也(1), 桑田聖子(2), 先崎秀明(3), 計3名(査読なし)  
オーバーラップする疾患群: ミトコンドリア病と左室心筋緻密化障害、小児循環器学会雑誌、30巻2号130-132, 2014年。

Sugimoto M(1), Kajino H(2), Azuma H(6), 計6名(査読あり)  
Assessment of pulmonary arterial pressure by velocity-encoded cine magnetic resonance imaging in children with congenital heart disease.  
Circ Journal, 77(12), 3015-3022, 2013.

Inuzuka R(1), Sugimoto M(3), Senzaki H(6), 計6名(査読あり)  
Pulmonary Arterial Wall Stiffness and Its Impact on Right Ventricular Afterload in Patients With Repaired Tetralogy of Fallot.  
Ann Thorac Surg, 96: 1435-1441, 2013.

Sugimoto M(1), Ishido H(2), Senzaki H(6), 計6名(査読あり)  
Findings in the pulmonary vascular bed in the remote phase after Kawasaki disease.  
Am J Cardiol. 109(8):1219-22, 2012.

Nakamura E(1), Sugimoto M(6), Kajino H(9), 計10名(査読あり)  
Sugimoto M, Ishido H, Seki M, et al:  
Findings in the pulmonary vascular bed in the remote phase after Kawasaki disease.  
Am J Cardiol. 109(8):1219-22, 2012.

Sugimoto M(1), Ota K(2), Kajino H(6), 計6名(査読あり)  
Volume overload and pressure overload due to left-to right shunt induced myocardial injury: evaluation using a highly sensitive cardiac troponin-I assay in children with congenital heart disease.  
Circulation Journal 75(9): 2213-2219, 2011.

〔学会発表〕(計7件)

Sugimoto M(1), Azuma H(4) 計4名  
Constantly changing biological reactions and biomarkers during exercise in Fontan circulation, ESC congress 2014, 31Aug-3Sep, 2014, Barcelona, Spain.(発表予定).

Sugimoto M(1), Azuma H(4) 計4名  
Soluble fms-like tyrosine kinase 1 and placental growth factor ratio - a novel biomarker for assessing congestion and angiogenesis in children with congenital heart disease, AHA scientific sessions 2013, 16-20, Nov, 2013, Dallas, USA.

杉本昌也(1), 梶野浩樹(4), 東寛(5) 計5名  
先天性心疾患患者における肺高血圧の評価に血中高感度心筋トロポニンIとTはどちらが優れているか  
第49回日本小児循環器学会学術集会東京, 2013.7.10

杉本昌也(1), 東寛(4) 計4名  
フォンタン循環における運動時の刻々と変化する生体反応とバイオマーカー, 名古屋  
第33回日本小児循環動態研究会, 2013.10.27

杉本昌也(1), 梶野浩樹(4), 東寛(5) 計5名  
Noninvasive evaluation of the pulmonary arterial pressure using velocity-encoded cine MRI in children with congenital heart disease, 第77回日本循環器学会学術集会, 横浜, 2013.3.16

Sugimoto M(1), Azuma H(5) 計5名  
Assessment of pulmonary arterial pressure in children with congenital heart disease by velocity-encoded cine magnetic resonance imaging, AHA scientific sessions 2012, 4-7, Nov, 2012, Los Angeles, USA.

杉本昌也(1), 梶野浩樹(4) 計4名  
肺循環評価における Velocity-encoded cine MRI の優位性, 京都  
第48回日本小児循環器学会学術集会, 2012.7.5

〔図書〕(計3件)

Sugimoto M(1), Senzaki H(2), 計2名  
Hemodynamics: Monitoring, Theory and Applications - Serological Monitoring of Hemodynamics. Nova Sciences Publishers, 131-145, 2013.

杉本昌也(1), メジカルビュー社,  
HeartView, 16(12)増刊号 90-95, 2012.

杉本昌也(1), 梶野浩樹(2), 東京医学社,  
小児内科・43増刊号, 141-143, 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 昌也 (SUGIMOTO MASAYA)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20400096

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし