

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591069

研究課題名(和文)肺高血圧症における血管平滑筋細胞増殖マーカーLR11の役割

研究課題名(英文)The role of LR11,proliferation marker of Vascular smooth muscle cell for Pulmonary hypertension

研究代表者

小西 博心(KONISHI, HAKUOH)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50459145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：血清可溶性LR11(sLR11)濃度が未治療患者において肺動脈性肺高血圧患者において上昇およびsLR11濃度と平均肺動脈圧、肺血管抵抗に相関があることを見出したことで、sLR11が血管平滑筋細胞増殖及び血管リモデリングの指標になる可能性を発見した。早期診断としてのバイオマーカーになる可能性を見出した。基礎研究では、LR11欠損マウスを用い、低酸素惹起性肺高血圧発症の抑制を証明した。PAHにおいても血管平滑筋細胞増殖にLR11とHIF-1が重要な役割を持つ可能性に注目し、低酸素負荷でのLR11発現調節、さらに、中和抗体を作成し、新たな治療薬を確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is pathophysiologically characterized with medial thickening of smooth muscle cells (SMCs). LR11 is expressed in intimal smooth muscle cells. This study examined the role of LR11 in pulmonary hypertension. The expression LR11, together with HIF-1 was significantly increased under hypoxic conditions compared with normoxia in mouse lung. Serum sLR11 levels were increased under hypoxic condition. The increased right ventricular systolic pressure, right ventricular hypertrophy and medial thickening in wild-type mice were attenuated in KO mice. The expression of LR11 and HIF-1 was increased in cultured SMCs under hypoxic conditions and the knockdown of HIF-1 abolished the hypoxia-induced LR11 induction. Human study showed that serum sLR11 levels were significantly higher in patients with PAH. The sLR11 levels were positively correlated with pulmonary vascular resistance and mean pulmonary arterial pressure. Soluble LR11 may be a novel biomarker.

研究分野：循環器内科

キーワード：肺高血圧症 血管平滑筋細胞 LR11 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性高血圧症 (PAH) は、未治療の予後は極めて不良であり、成人例では、未治療での発症後の平均生存期間は、2.8 年とされる。(D'Alonzo G.E. *et al. Ann Intern Med.* ;1991: 343-349.) 近年肺高血圧に対する治療薬が開発され、Quality of life の改善、生存率の改善が、見込めるようになって来たが、(Humbert M. *Eur Respir J.* 2010; 36: 549-555.) 明らかな症状出現時には、既に高度の肺高血圧症に進展していることがあり、可逆的な変化にとどまっている早期に診断、治療を開始することが重要である。現状では、心臓エコー検査を用い推定右室圧を測定、スクリーニングをすることが一般的である。現在、欧米、国内の肺高血圧症ガイドラインでは、バイオマーカーとして BNP/NT-proBNP 濃度があげられているが、肺動脈病変を直接反映したマーカーではない。そのため、早期診断に対してのバイオマーカーとして、血管リモデリングを反映したマーカーの開発が重要である。

共同研究者武城は、血管平滑筋細胞の新たなマーカーである LDL receptor relative with 11 ligand-binding repeats (LR11) が、動脈硬化層の新生内膜、主に血管平滑筋細胞で発現し、可溶性 LR11 (sLR11) が、冠動脈疾患患者血清で上昇していることを示した。また、ELISA キットが積水メディカル株式会社と共同研究で、開発され市販化されており、現在、可溶性 LR11 濃度測定が可能となっている。本研究では、肺動脈性肺高血圧症の初期病変として、血管平滑筋細胞増殖により生じる微小肺動脈の中膜肥厚が肺動脈病変に認められるが、肺動脈性肺高血圧症においても同様に、血管平滑筋細胞増殖マーカーである LR11 が発現し、sLR11 の上昇を認める可能性があり本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究目的は、血管平滑筋細胞増殖のあらた

なるマーカーである LR11 が、肺動脈性肺高血圧症の新たなバイオマーカーになるか及び LR11 欠損マウスを用い、肺血管リモデリングに対するメカニズムを解明する 2 点である。

3. 研究の方法

方法：1) 臨床研究 対象：肺高血圧外来受診者の中で、心エコーで三尖弁逆流速度 3m/s 以上あるいは呼吸困難感などの有症状患者で三尖弁逆流速度 2.5m/s 以上の膠原病患者、門脈圧亢進症患者連続 20 例に対し、右心カテーテル施行。PAH 群 11 例、非 PAH 群 9 例をコントロール群として血清可溶性 (s)LR11 濃度を比較するとともに 6 分間歩行距離、WHO 機能分類、BNP、尿酸を比較した。また、PAH と診断、治療中の患者に対し、sLR11 濃度測定及び患者背景を検討した。

2) 基礎研究 (in vivo)

方法 LR11 欠損マウスと Wild type (各群 6~8 週令各 n=8) に対し低酸素 10%O₂ 下で、3 週間飼育し肺高血圧モデルを作製した。挿管後、吸入麻酔下で、頸静脈より Millar catheter を右室まで挿入し右室圧を測定した。圧測定後、心臓を取り出し、右室の自由壁 (RV) と中隔 (S) 左室自由壁 (LV) の重量を測定し RV/LV+S を右室肥大の指標とした。組織学的検討として 4% paraformaldehyde を肺動脈に還流固定したのち、組織標本を作製、動脈径 50~100um の筋性血管 10vessel の vascular wall thickness を測定することで、血管リモデリングを評価した。

低酸素負荷により HIF-1 及び LR11 蛋白発現を検討するために肺組織より蛋白を抽出しウエスタンブロット法を用い検討した。

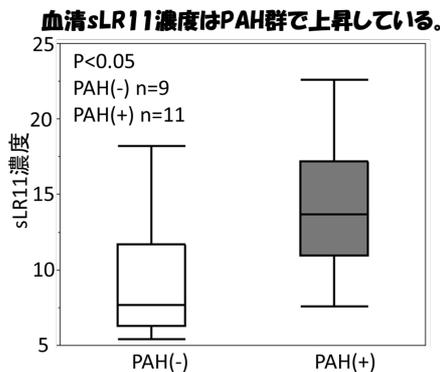
(in vitro)

HIF-1 と LR11 発現の関係を確認するためにヒト肺動脈血管平滑筋細胞を 1%O₂ 下で培養した。低酸素刺激により血管平滑筋細胞中の LR11 発現が上昇するか、HIF-1

上昇に伴い LR11 発現が上昇するか、また LR11 プロモーター領域に HIF-1 が binding site を持つことが報告されているが、siRNA を用い HIF-1 をノックダウンすることで、LR11 発現上昇に HIF-1 が関与しているか検討した。

4. 研究成果 臨床研究

1)連続 20 症例の血清可溶性 LR11 濃度を測定したところ、下図の如く PAH 群で有意に s LR11 濃度が上昇していた。



また肺血管抵抗、平均肺動脈圧と s LR11 濃度には正の相関を認めた。

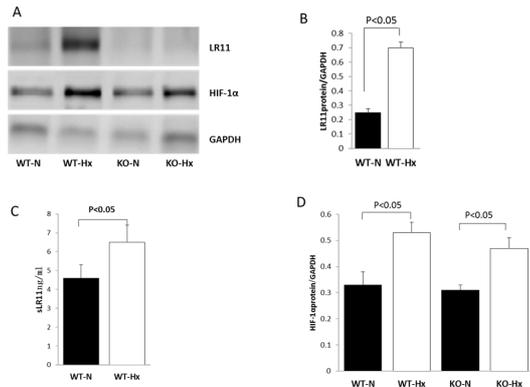
n=20	n	Pearson's correlation coefficient	P
Age (years)	20	-0.029	0.902
No. women	20	0.075	0.754
WHO FC (I/II/III/IV)	20	0.317	0.173
BNP (pg/ml)	20	0.017	0.945
UA (mg/dl)	20	0.054	0.821
mRAP (mmHg)	19	0.137	0.575
mPAP (mmHg)	20	0.633	0.003
PVR (dyne·sec·cm ⁻⁵)	20	0.580	0.007
CI(L/min/m ²)	20	-0.093	0.697

2) PAH 患者に対し、各治療薬と s LR11 濃度について検討したが、経口群と PG12 持続静注群を比較すると、PG12 持続静注群で有意に s LR11 濃度が低かった。PG12 持続静注製剤は強力な血管平滑筋細胞増殖抑制作用があるため s LR11 濃度が低かった可能性が示唆された。

以上の臨床研究より未治療の PAH 患者の s LR11 濃度上昇は血管平滑筋細胞増殖により生じている可能性があるため、メカニズム解明のため基礎研究を行った。

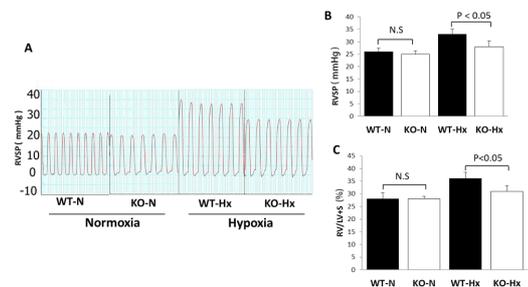
2)LR11 欠損マウス及び野生群を低酸素チャンバー(10%酸素)内で飼育し肺高血圧モデルを作製し LR11 の役割を検討した。

低酸素刺激で野生群では低酸素刺激で

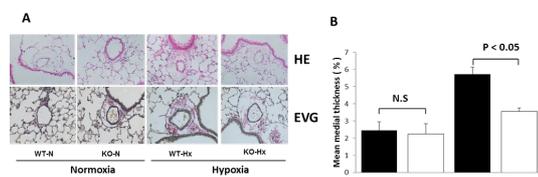


HIF-1 及び LR11 蛋白発現は上昇していた。また血清中においても、s LR11 濃度は、野生群において、低酸素刺激により大気圧群と比較し有意に上昇していた。

右室収縮期圧は、大気圧群では、野生群、LR11 欠損マウス群に差は認めなかったが、低酸素



負荷による右室収縮期圧上昇は、LR11 欠損マウス群では野生群と比較し有意に抑制されていた。また右室/左室重量比を検討すると、

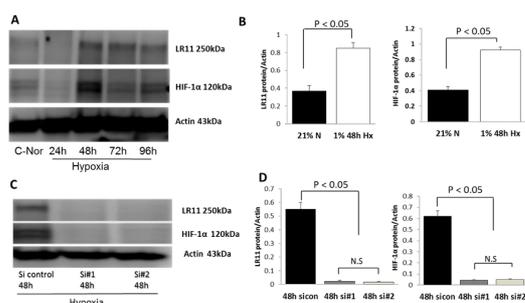


LR11 欠損マウスでは有意に右室肥大の抑制が認められた。

組織学的検討では、100 μm 以下の微小肺動脈壁肥厚は、LR11 欠損マウスでは、野生群と比較し有意に壁肥厚の抑制が認められた。

3) ヒト肺動脈血管平滑筋細胞 (PAVSMC) を低酸素チャンバー(1%)で培養し、HIF-1

と LR11 の関係を検討した。
 まず、低酸素刺激による LR11、HIF-1 蛋白発現の経時的变化を観察すると HIF-1 及び LR11 は、48 時間で発現上昇ピークを認めた。LR11 プロモーター領域に HIF-1 が binding site を持つことより siRNA を用い HIF-1 をノックダウンすると、48 時間で上昇のピークを迎えた LR11 蛋白発現は、完全に抑制され



た。このことより低酸素刺激で HIF-1 が上昇し LR11 発現が誘導されることが示された。

以上の臨床研究の成果から、可溶型 LR11 濃度は、肺血管抵抗、平均肺動脈圧と正の相関が認められることは、肺動脈リモデリングの新たな指標になる可能性を見出し、また PG12 持続静注群が経口剤群と比較し有意に可溶型 LR11 濃度が低いことは、より薬剤投与の効果判定に用いられる可能性も考えられた。また、基礎研究の成果からは、LR11 欠損あるいはノックダウンでは、血管平滑筋細胞の LR11 発現は HIF-1 によって制御されており、LR11 欠損で血管平滑筋細胞増殖が抑制されることは、中和抗体作製により今後、新たな肺動脈性肺高血圧症への治療介入の可能性も考えられた。

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0件)

[学会発表](計5件)

第79回日本循環器学会学術集会

LR11 Gene Deletion Prevents Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling under Hypoxia Condition

Le Jiang, Hakuoh Konishi, Meizi Jiang, Hideaki Bujo, Hiroyuki Daida

2014年 American Heart Association Scientific Sessions

LR11 Gene Deficiency Prevents Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling in Mice

Le Jiang, Hakuoh Konishi, Meizi Jiang, Hideaki Bujo, Hiroyuki Daida

2014年 European Society of Cardiology

LR11 Gene Deletion Prevents Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling under Hypoxia Condition

Hakuoh Konishi, Jiang Le, Hiroyuki Daida

2014年 Annual of American Thoracic Society

LR11 Is a Novel Biomarker of Pulmonary Arterial Hypertension

Hakuoh Konishi, Jiang Le, Hiroyuki Daida

2015年

LR11 Gene Deficiency Prevents Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling in Mice

Le Jiang, Hakuoh Konishi, Meizi Jiang, Hideaki Bujo, Hiroyuki Daida

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 新規な肺高血圧症のマーカー

発明者: 小西博応、代田浩之、海老沼宏幸、藤村建午

種類: 公開特許公報(A)

番号: 特開2014-167428

出願年月日: 平成25年2月28日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

小西 博応 (Konishi Hakuoh)

順天堂大学医学部准教授

研究者番号 50459145