

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592057

研究課題名(和文) 肺高血圧における細胞外マトリックスの役割とその制御

研究課題名(英文) Specific inhibition of tenascin-C with Cilostazol attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats

研究代表者

新保 秀人 (SHIMPO, HIDETO)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70179076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：テネイシンC(TNC)はリモデリングに重要な役割を有している。一方、シロスタゾールはTNCを介してリモデリングを抑制する可能性が示唆されている。そこで、肺高血圧におけるTNCの役割とシロスタゾールの関与についてモノクロタリン(MCT)投与肺高血圧ラットを用い検討した。その結果、シロスタゾール投与群で非投与群と比較し有意に肺高血圧が抑制された。EVG染色にて投与群で非投与群と比較し内膜・中膜肥厚が有意に抑制された。さらにTNC染色でも投与群で非投与群と比較しNC発現が有意に抑制された。以上より、シロスタゾールがTNCを介して肺高血圧の進行を抑制する可能性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Three weeks after monocrotaline administration to induced pulmonary hypertension (PH), daily treatment of phosphodiesterase inhibitor with Cilostazol significantly reduced mean pulmonary artery (PA) pressure and morphometric changes of PA. Tenascin-C expression were significantly reduced during all periods. We showed that Cilostazol ultimately prevented the progression of PH.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：肺高血圧 細胞外マトリックス テネイシン

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患の領域では術前、手術手技の向上、周術期管理の工夫などにより治療成績が格段に向上し、極めて複雑な心疾患においても遠隔成績が論じられるようになってきた。また肺塞栓症例も生活習慣の欧米化により近年とみに増加している。その中で先天性心疾患症例や肺塞栓症例においては肺高血圧が予後を大きく左右する因子の一つとなっている。そのため肺血管拡張療法の重要性が認識され薬剤が開発されたりしつつある。ところが病態の解明は全身の動脈に比べて遅れているのが実情で肺高血圧の十分な制御、治療法の確立に至ったとは言いがたい。このような現状から肺血管再構築、中でも平滑筋増殖の機序のさらなる解明が必要となっている。

細胞外マトリックス(ECM)は常に強い物理的ストレスにさらされる血管の構造を支持し組織恒常性の維持に貢献している。最近、ECMの中でも組織リモデリングに伴って高発現し、強い生理活性によって組織リモデリングを制御する matricellular 蛋白と呼ばれる分子群が注目されている。テネイシンC(TNC)は最も典型的な matricellular 蛋白で、組織障害などに際して限られた場所に高発現し、炎症、血管新生、繊維化を抑制し、組織構築改変で重要な役割を有している。しかし、肺高血圧における TNC の役割については詳細な研究成果がないところから役割の解明が待たれるところである。

現在までの知見として、肺血管平滑筋の増殖に炎症反応が関与していることが明らかとなっており、モノクロタリン(MCT)投与肺高血圧ラットにおいては肥厚した肺動脈中膜でのサイトカイン活性上昇が報告されている。我々の検討では、MCT 投与肺高血圧ラットの肺組織と肺動脈における TNF- α と IL-1 β の mRNA 及び p38 MAPK が対照群に比して有意に高値であることを認めた。そこでサイトカイン発現に関与する p38 MAPK の阻害剤(pyridinyl imidazole 化合物の一種である FR167653)を用いて検討を行った。MCT 投与ラットに p38 MAPK 阻害剤の FR167653 を投与すると、1、2、3、4 週目において上記の mRNA と p38 MAPK の発現が FR167653 非投与群に比べて抑制されており、肺動脈中膜肥厚、筋性化率、肺高血圧が強く抑えられることを証明した(図 1、Lu J, Shimpo H, Shimamoto A, et al. Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128(6):850-9)。

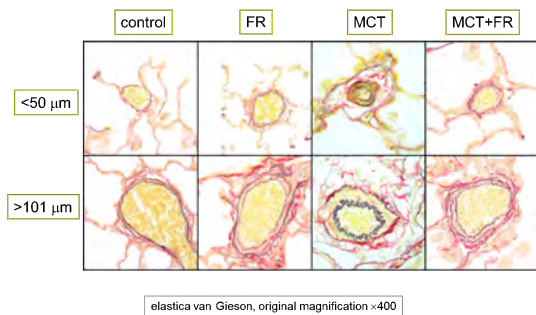


図 1. 径が 50 μ m 以下の肺動脈と 101 μ m 以上の肺動脈における MCT 投与による肺動脈中膜肥厚と MCT 投与群に FR167653 を投与した群での肺動脈肥厚程度の軽減効果を示されている

TNC は動脈硬化などにおける血管壁リモデリングにおいてある時期に規則的に発現し、細胞増殖の促進、抑制を制御している。我々はラット動脈グラフト移植吻合部狭窄モデルを作成し、TNC の発現を検討したところ、TNC の発現が経時的に変化することを見出した。TNC は 7 日後では中膜に強く発現するが 14 日後では中膜の発現は減弱し、内膜に強く発現した。さらに動脈グラフトの外膜側に Cilostazol を投与したところ心性内膜形成と TNC の発現が著明に抑制され動脈グラフトにおいて TNC の発現と心性内膜との間に強い相関関係があることを見出し報告した(図 2、Fujinaga K, Shimpo H, et al. Locally applied cilostazol suppresses neointimal hyperplasia by inhibiting tenascin-C synthesis and smooth muscle cell proliferation in free artery grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128(3):357-63)。

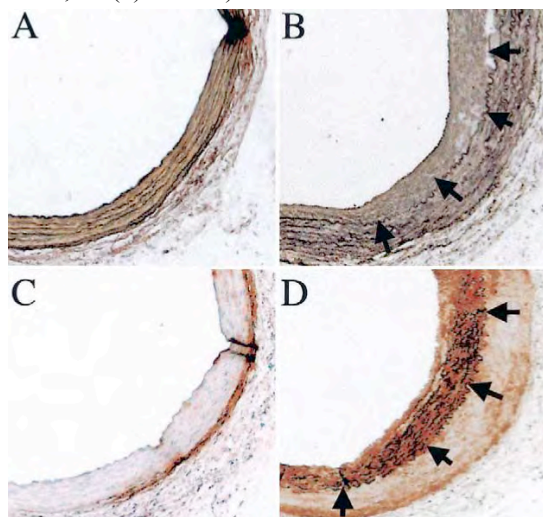


図 2. ラット動脈グラフト移植吻合部狭窄モデル:A, CはCilostazol投与群、B, Dは非投与群。C, DはTNC免疫染色。Dに比較しCではTNCの発現が強く抑制されている

TNC ノックアウトマウスも作成し検討したところ、新生内膜の肥厚は著明に抑制され動脈あるいは動脈グラフトにおける血管壁リモデリングにおいて TNC は極めて重要な役割を有する因子であることを見出した。

2. 研究の目的

TNC の動脈における血管壁リモデリングの役割に着目し、肺動脈のリモデリング、肺高血圧における役割を解析し、かつ制御する。

TNC の肺高血圧における役割を解析し、TNC 発現抑制効果のある、Cilostazol 投与による制御効果を検討する。

3. 研究の方法

生食をラットに皮下注射し3週間生食を経口投与した群(C群, n=7)、60mg/kgのMCTをラットに皮下注射し3週間生食を経口投与した群(M群, n=8)、さらに60mg/kgのMCTをラットに皮下注射し3週間20mg/kg/dayのCilostazolを経口投与した群(T群, n=9)の3群を作成。3週間後、体血圧(SBP)及び肺動脈圧(PAP)を測定した後、肺を摘出、EVG染色に加えTNC抗体による免疫染色にてTNCの発現を測定した。

ラットを用いたMCT投与肺高血圧モデルは既報の方法で作製する。免疫染色などの評価のための組織の固定切片作製は既報の方法で行う(Mitani Y, Shimpo H, et al. Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax* 1999;54(1):88-90)。また、肺血管床の評価のためのmorphometryは既報の方法で行う(Mitani Y, et al. Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation* 1997;96(2):689-97)。

4. 研究成果

PAPはC群 26.0 ± 5.6 mmHg、M群 60.5 ± 12.7 mmHg、T群 35.9 ± 5.9 mmHg といずれの群間も有意差を認めた。PAP(平均圧)はC群 15.6 ± 2.2 mmHg、M群 35.2 ± 6.8 mmHg、T群 20.8 ± 7.0 mmHg と、C・T群間以外は有意差を認めた。さらにSBPはそれぞれ、C群で 140.9 ± 10.8 mmHg、M群で 136.9 ± 8.2 mmHg、T群で 133.1 ± 12.0 mmHg と、いずれの群間でも有意差を認めなかった(図3)。またEVG染色にてM群では内膜及び中膜に肥厚を認めしたが、T群では肥厚の程度は軽度であった。さらにTNC染色でもM群では肥厚した中膜に多くのTNC発現を認めたのに対し、T群ではTNC発現は軽度であった(図4)。以上より、CilostazolがTNCを介して肺高血圧の進行を抑制する可能性が認められた。

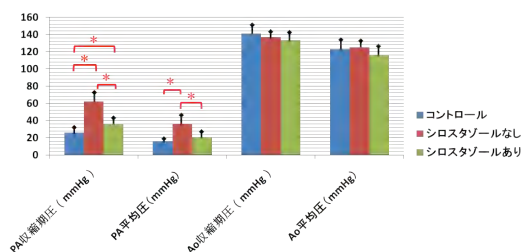


図3. 肺動脈圧への効果(病態生理学的検討)

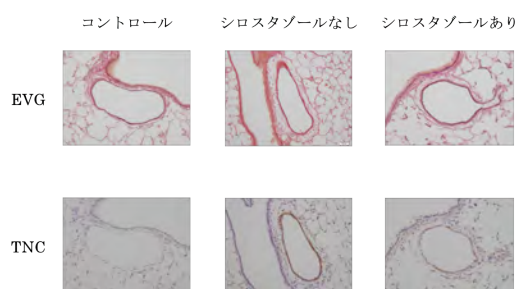


図4. 肺動脈壁への効果(形態学的検討)

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 1件)

モノクローリン誘発肺高血圧ラットモデルにおけるテネイシンCの役割とシロスタゾールの効果の検討

真栄城 亮、小林 晶、阪本瞬介、小暮周平、山本直樹、金光真治、小沼武司、島本 亮、高尾 仁二、新保 秀人

第68回日本胸部外科学会定期学術集会(平成27年10月20日、神戸ポートピアホテル[兵庫県・神戸市])

[図書] (計 0件)

[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

新保秀人 (SHIMPO HIDETO)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70179076

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

島本 亮 (SHIMAMOTO AKIRA)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90324524

真栄城 亮 (MAESHIRO RYO)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90647124

後藤健宏 (GOTO TAKEHIRO)

三重大学・医学部附属病院・技術補佐員

研究者番号：80774877

松尾映里 (MATSUO ERI)

三重大学・医学系研究科・特定事業技術補佐員

員

研究者番号：40751665