

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790760

研究課題名(和文)肺動脈性肺高血圧症早期診断マーカーの同定

研究課題名(英文)The identification of the marker for early diagnosis of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

土肥 由裕(Dohi, Yoshihiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：20455786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症は、肺動脈血管平滑筋の増殖により肺動脈の狭窄や閉塞をきたし、肺血管抵抗の上昇から右心不全、死に至る致死性の疾患である。治療の遅れは予後の悪化を招くため、早期診断が重要である。本研究により、心肺運動負荷テストにおける呼気終末二酸化炭素分圧は平均肺動脈圧と強く相関し、非侵襲的な早期診断に有用である可能性が示唆された。また血清中のバイオマーカーとして、可溶性RAGE(Receptor for Advanced Glycation End-product)もまた、早期診断、病勢および治療反応性の指標となりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension is the life-threatening disease characterized by excessive vascular resistance, smooth muscle cell proliferation in small pulmonary artery, leading to elevation of pulmonary vascular resistance, right ventricular failure and death. Early diagnosis is important because delayed treatment leads to poor prognosis. In this study, we demonstrated that end-tidal carbon dioxide during cardiopulmonary exercise testing strongly correlate with mean pulmonary arterial pressure, leading to the possibility of usefulness of early diagnosis noninvasively. Moreover, soluble RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-product) can also be a potential biomarker of early diagnosis, clinical stage, and response of treatment.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺高血圧症 肺動脈性肺高血圧症 早期診断 心肺運動負荷テスト

1. 研究開始当初の背景

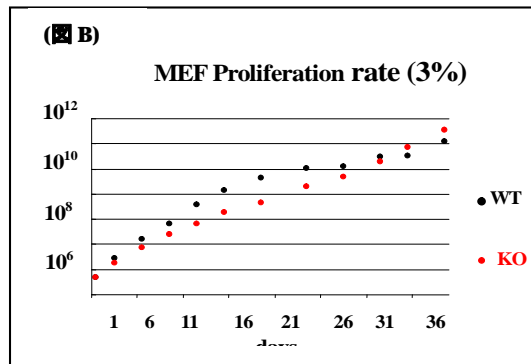
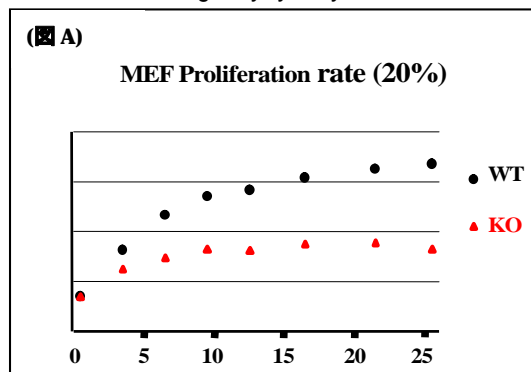
肺高血圧症は平均肺動脈圧 25mmHg 以上と定義された疾患群であり、その中でも肺動脈性肺高血圧症は極めて予後不良な疾患である (circulation 1984;70:580-587)。現在、肺動脈の収縮と拡張に関与する主要 3 大系路、プロスタサイクリン系、cGMP-NO 系、エンドセリン系それぞれに作用する治療薬、プロスタノイド、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ 5 阻害剤が治療の中心となっている。これらの治療薬は肺動脈性肺高血圧症の予後を飛躍的に改善した (Circulation 2010;122:106-108)。しかし、重症例においてはエポプロステロール持続静注療法を行ったとしても、依然として予後不良である (J Heart Lung Transplant. 1996;15:100-105)。

これら主要 3 大系路に作用する治療薬は、1970 年代から続いてきた血管収縮物質過剰-弛緩物質欠乏のアンバランスによる“機能的収縮過剰”を標的としている。近年、肺動脈性肺高血圧の基本病態は血管壁の変性-炎症-腫瘍性増殖と抗 apoptosis による血管壁の過剰な remodeling 反応によると考えられるようになった。

近年、imatinib に代表される抗腫瘍薬が肺動脈性肺高血圧症治療に用いられる様になってきた。これらの抗腫瘍薬は、血管内皮・中膜細胞の増殖を抑制することにより remodeling 抑制に有効であると考えられているが、現在その適応は重症例に限られている。研究代表者はこれらの薬剤は肺動脈壁の remodeling が完成していない病期、すなわち肺動脈壁の腫瘍性増殖が進行しつつある初期の肺動脈性肺高血圧症にこそ有効であると考えている。このためには、病初期の肺血管床減少を早期に把握することが重要と考えている。早期の治療介入が可能となれば、肺動脈 remodeling 抑制、予後改善に大きく

寄与することができると考えている。しかしこの病期は、肺血管床は減少しているものの安静時肺動脈圧の上昇を認めないため、右心カテーテル法や心エコー図による診断は不可能である。健常肺は、運動により肺野において日常生活レベルでは血流が乏しいとされる領域 (ゾーン 1、ゾーン 2) の血流を増加して酸素化能を増強させる。しかし、肺血管床が減少し、肺動脈拡張が障害されている場合、運動時に肺血流は増加できない。このため、肺動脈圧の上昇と、肺血管抵抗の上昇、それに伴う心拍出量の低下が出現する。この変化を、心エコー図、心肺運動負荷テストにて確認できると考えている。

Heme oxygenase-1 (HO-1) は低酸素、高酸素、アシドーシス、酸化ストレスなど様々なストレスにより誘導される酵素であり (Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:1475-1479)、その活性は抗炎症作用、抗増殖作用などホメオスタシス維持に重要である (Am J Respir Crit Care Med 2005;172:660-670)。HO-1 は酸化ストレス活性を有するヘムを分解し、抗酸化作用を示すビリルビン、一酸化炭素を生成する。一酸化炭素は guanylyl cyclase を刺激し



て細胞内 cGMP レベルを上昇させる。cGMP は肺動脈拡張作用を有する 3 大系路の一つであるだけでなく、血管平滑筋細胞の増殖制御にも関与する。肺高血圧症において、HO-1 が肺動脈性肺高血圧症の進展を抑制するという報告は数多くなされている (Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:8798-8803)。研究代表者は、HO-1 の発現を抑制する転写因子 Bach1 のノックアウトマウスを解析し、HO-1 高発現において細胞増殖が抑制され、その効果は酸化ストレス存在下にて顕著であることを報告した (Nat Struct Mol Biol. 2008;15(12):1246-54: 図 A、図 B)。この結果は、HO-1 高発現が肺動脈性肺高血圧症を抑制する過去の報告と矛盾しない。これらの知見から、研究代表者は、Bach1 ノックアウトマウスでは、低酸素ストレスによる肺障害が抑制される可能性が高いと考えている。さらにその抑制効果は肺動脈壁の細胞増殖抑制が関与していると考えられ、肺動脈性肺高血圧症発症の重要なメカニズムのひとつである。これらの解析を行うことで、酸化ストレス依存性の肺動脈血管壁細胞の異常増殖メカニズムを明らかにできると考えている。

2. 研究の目的

(1) 肺動脈性肺高血圧症発症の high risk 群のうち、肺動脈性肺高血圧症を発症する群に特徴的な所見の同定を目的とする。High risk 群とされる膠原病患者 (強皮症・SLE・MCTD・シェーグレン症候群) において、肺機能検査における拡散能 (%DLco)、心エコー図および心肺運動負荷試験を行う。同時に血液サンプルも採取し、肺動脈性肺高血圧症に特異的なバイオマーカーを検索する。肺動脈性肺高血圧症症例において、リモデリングした肺動脈血管壁では RAGE(Receptor for Advanced Glycation

End-product) の発現が増加している事や、RAGE を抑制することで肺高血圧症発症が抑制されることが動物実験レベルではあるが報告されている。このため、肺動脈性肺高血圧症では血清中の RAGE も上昇している可能性があり、病態の種類あるいは重症度、治療効果判定等についての有用性を検討した。さらに、間質性肺炎では血清中の RAGE が低値を示すことが報告されており、間質性肺炎を合併する肺動脈性肺高血圧症の鑑別に有用であるかどうかを検討した。

(2) 肺高血圧症モデルマウスの作成

肺高血圧症発症における酸化ストレスの影響を検討するため、野生型および Bach1 ノックアウトマウスに低酸素刺激を加えた肺高血圧症モデルマウスを作成する。得られたモデルマウスを用いて、肺・心筋・血清からサンプルを採取、タンパク質発現および mRNA 発現量を比較・検討した。

3. 研究の方法

(1) 肺高血圧症における循環生理・呼吸生理を安静時および運動時に評価し、健康人との比較、肺動脈性肺高血圧症と慢性血栓塞栓性肺高血圧症との比較を行う。

肺機能検査：通常の肺活量、一秒量、一秒率に加え、肺拡散能も測定を行う

心エコー図：ルーチン検査に加え、右室・右房の評価も詳細に行う。

心肺運動負荷テスト：通常のエルゴメーター負荷 (ramp20) にて運動負荷を施行。Peak $\dot{V}O_2$ 、AT 時、RC ポイントでの $PETCO_2$ 、 VE/VCO_2 slope など各種パラメーターを記録する。

(2) 可溶性 RAGE は、間質性肺炎では低

値を示す事が指摘されている。間質性肺炎、慢性血栓性肺高血圧症、肺動脈性肺高血圧症それぞれの症例から採取した血清サンプルにおける RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-product) を ELISA 法により計測する。

(3) 低酸素暴露による肺高血圧モデルマウスの確率

10%酸素で飼育可能なチェンバーを作成、3週間から9週間マウスを低酸素に暴露させた。

様々な期間低酸素に暴露させたマウスの肺動脈血管壁リモデリング、右室肥大の程度を解析し、肺高血圧症モデルマウスとして適切な暴露期間を検討した。

低酸素に暴露したマウスにおいて、実際に肺動脈圧が上昇している事を確認するため、イソフルラン吸入麻酔下に右室内圧測定を行った(プライムテック社)。

4. 研究成果

(1) 健常人と比較して、肺高血圧症(肺動脈性肺高血圧症: 23例, 慢性血栓性肺高血圧症: 18例)において、予想に反して%DLco/VAに有意な低下は認められなかった(健常人 vs 肺高血圧症: $83.0 \pm 2.9\%$ vs $81.3 \pm 5.7\%$, $p = n.s.$)。しかし、心肺運動負荷テストにおいては、ピーク時の酸素摂取量(健常人 vs 肺高血圧症: $72.9 \pm 1.4\%$ vs $59.7 \pm 2.3\%$, $p < 0.0001$)および酸素脈(健常人 vs 肺高血圧症: $75.7 \pm 1.6\%$ vs $51.9 \pm 2.7\%$, $p < 0.0001$)。さらに、呼気終末二酸化炭素分圧においては、ピーク時(健常人 vs 肺高血

症: $35.7 \pm 0.4\%$ vs $27.6 \pm 0.8\%$, $p < 0.0001$)のみならず、嫌気性代謝閾値(健常人 vs 肺高血圧症: $39.1 \pm 0.4\%$ vs $30.9 \pm 0.6\%$, $p < 0.0001$)、さらに安静時においても強い有意差を認めていた(健常人 vs 肺高血圧症: $35.6 \pm 0.3\%$ vs $39.8 \pm 0.5\%$, $p < 0.0001$)。その上、特に嫌気性代謝閾値での呼気終末二酸化炭素分圧は右心カテーテルで得られた平均肺動脈圧と相関しており($r^2 = 0.41$, $p < 0.0001$)、その相関は三尖弁圧較差($r^2 = 0.36$, $p < 0.0001$)よりも強かった。このことから、呼気終末二酸化炭素分圧は、肺動脈圧の上昇を非侵襲的に、早期に診断出来るツールとして極めて有用である事が示唆された。

(2) 健常人6例、間質性肺炎に伴う肺高血圧症15例、肺動脈性肺高血圧症17例、慢性血栓性肺高血圧症11例について、血清中のsRAGEをELISA法にて測定、比較検討した。結果、健常人と比較して間質性肺炎を伴う肺高血圧症では有意差を認めなかったが(1060 ± 318 vs 1129 ± 1056 , $p = n.s.$)、肺動脈性肺高血圧症(1060 ± 318 vs 2448 ± 1375 , $p < 0.01$)、慢性血栓性肺高血圧症(1060 ± 318 vs 1887 ± 929 , $p < 0.05$)といずれも有意な上昇を認めた。さらに、肺動脈性肺高血圧症および慢性血栓性肺高血圧症において、治療前後で比較を行った。治療前後で平均肺動脈圧は有意に低下(44.8 ± 3.0 vs 29.9 ± 2.3 , $p < 0.01$)し、sRAGEも低下を認めた(2046 ± 312 vs 1300 ± 351 , $p < 0.01$)。sRAGEは肺動脈圧の上昇、治療に伴う病勢を

反映することが示唆された。また、肺動脈性肺高血圧症において、間質性肺炎の有無にて検討をしたところ、平均肺動脈圧には有意差を認めなかったが（間質性肺炎有り vs 無し：27.4±8.8 vs 24.5±7.4, p = n.s.），sRAGE は有意に間質性肺炎無しの群で高値を示し（間質性肺炎有り vs 無し：683 ± 482 vs 2437 ± 1846, p < 0.05），鑑別診断に有用である可能性が示唆された。

(3) 低酸素暴露による肺高血圧モデルマウスを確率するため、10%酸素飼育可能なチェンバーを作成、3週から9週間飼育を行い、右室心筋重/左室+心室中隔を用いて右室肥大を比較・検討した。結果、10%酸素により5週以上飼育することにより右室肥大を認めることが確認できた（コントロール vs 低酸素飼育：0.351 vs 0.381, p < 0.05）。肺動脈血管壁の肥厚も確認できた。しかし、現時点では有意な右室圧の上昇を確認できておらず、今後圧測定法のさらなる検討が必要である。

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 1件)

Akifumi Higashi, Yoshihiro Dohi, et al. "The potential role of inflammation associated with interaction between osteopontin and CD44 in a case of pulmonary tumor thrombotic microangiopathy caused by breast cancer" 査読有り, internal medicine (in press)

〔学会発表〕(計 10件)

1. 土肥 由裕 他, "心肺運動負荷テストは肺高血圧症スクリーニングに有用である" 第111回日本内科学会中国地方会, 2014.11.8, 島根大学医学部看護学科棟(島根・島根)
2. 土肥 由裕 他, "当院における肺高血圧症診療とその成果", 第67回広島医学会総会, 2014.11.9, 広島県医師会館(広島・広島)
3. 土肥 由裕 他, "心肺運動負荷テストにおける End-Tidal CO2 は肺高血圧症早期診断に有用である", 第62回日本心臓病学会総会, 2014.9.28, 仙台国際センター(宮城・仙台)
4. 木下 弘喜、土肥 由裕 他, "肺高血圧症における肺血管障害は早期から心肺運動負荷テストにより非侵襲的に診断しうる", 第17回日本心不全学会, 2013.11.29, 大宮ソニックシティ(埼玉・大宮)
5. 佐田 良治、土肥 由裕 他, "右房圧はうっ血性心不全の強力な予後予測因子である", 第1回日本肺高血圧学会, 2013.10.14, 慶応義塾大学日吉キャンパス協生館(神奈川・日吉)
6. 土肥 由裕 他, "肺動脈性肺高血圧症に左心疾患を伴う肺高血圧症を合併した一例", 第2回日本肺循環学会, 2013.6.23, 東京ステーションコンファレンス(東京・東京)
7. Yoshihiro Dohi, et al. "Differences in Ventilatory Inefficiency Between Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension" ISHR XXI congress, July 2, 2013, San Diego (USA)
8. 上田 朋子、土肥 由裕 他, "重度大動脈弁狭窄症に肺動脈性肺高血圧症を合併した一例", 第100回日本循環器病

学会中国・四国合同地方会，2012.6.23，
広島国際会議場（広島・広島）

9. 土肥 由裕 他，“生体肝移植後に肺動脈性肺高血圧症が改善した一例”，第100回日本循環器病学会中国・四国合同地方会，2012.6.23，広島国際会議場（広島・広島）

10. 土肥 由裕 他，“エポプロステノール維持療法を離脱可能であった膠原病性肺動脈性肺高血圧症の一例”，第100回日本循環器病学会中国・四国合同地方会，2012.6.23，広島国際会議場（広島・広島）

〔図書〕(計 1件)

土肥 由裕 他，科学評論社，循環器内科，第74巻第6号，特集 肺高血圧症 -内科的治療の展開-，肺高血圧症総論～病態生理と患者予後～ 2013，548-555

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土肥 由裕 (DOHI YOSHIHIRO)

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：20455786