

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791597

研究課題名(和文)病的肺における血管張力とフォスフォジエステラーゼ

研究課題名(英文) Phosphodiesterase expression related to lung disease

## 研究代表者

廣瀬 佳代(Hirose, Kayo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40532221

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)：特発性肺線維症は、有効な治療法は明らかにされていない。近年、肺線維症と同じく肺高血圧症を呈する原発性肺高血圧症に対して治療法が確立された。原発性肺高血圧症の治療が特発性肺線維症にも応用されることが期待されており、申請者はフォスフォジエステラーゼ(PDE)の発現の変化に着目した。タンパク質の発現量の差異をみたところ、肺線維症肺において、対照肺よりもPDE5発現の増加を認めた。局在を明らかにする免疫染色では、線維芽細胞で抗PDE5抗体が濃染した。当初はPDE5増加により血管収縮がおり肺高血圧が増悪すると考えたが、得られた結果からは、PDE5の増加が線維化そのものに影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a specific form of chronic progressive fibrosing interstitial lung disease of unknown cause that carries a dismal prognosis, with a 5-years survival of approximately 20%. There is no available therapy including corticosteroids. Recently, primary pulmonary hypertension(PPH) is reported to improve their prognosis owe to new medication, which express similar pathology to terminal IPF. Therefore, effective treatment of PPH is tried to apply to IPF treatment. We focused on phosphodiesterase(PDE) expression of IPF patients compared to normal lung. Westernblotting revealed the increased expression of PDE5A in IPF lung compared to normal lung. Immunohistochemistry showed localization of expressed PDE5A in fibroblasts. The result was different from our expectation that PDE5A is increased in vascular smooth muscle cells. The results obtained from this study suggests that increased expression of PDE5A may be related to progression of lung fibrosis itself.

研究分野：麻酔学

キーワード：フォスフォジエステラーゼ 肺 間質性肺炎

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は、慢性進行性、原因不明の肺疾患であり、一部の症例で肺高血圧症を合併する。その機序は肺実質障害に伴う細動脈・毛細血管の圧排、閉塞および低酸素性肺血管攣縮と考えられている。

近年、IPFと同じく肺高血圧を呈する肺動脈性肺高血圧症 (PAH) に対してフォスフォジエステラーゼ (PDE) 5阻害薬の有効性が報告された (Galie N et al. *N Engl J Med* 2005; 353: 2148-57)。PAHは、1990年代前半には、確定診断からの平均生存期間が3年という、予後不良の疾患であったが、いくつかの有効な治療法が確立され、予後が飛躍的に改善されてきた。PAHとIPFは異なる疾患ではあるが、共通する病態も多く存在する。数多くの基礎研究、臨床研究が試みられているにもかかわらず、肺線維症にたいする有効な治療法は明らかにされておらず、古から現在に至るまで、ステロイド療法が唯一の治療法である。PAHの治療法がIPFにも応用されることが期待され、IPFに対してもPDE5阻害剤の臨床試験が開始されている (Ghofrani HA et al. *Lancet* 2002; 360: 895-900, Zisman DA et al. *N Engl J Med* 2010; 363: 620-8)、必ずしも有効性は支持されていない。

PDE5阻害薬の作用機序は細胞内セカンドメッセンジャーであるcGMPの加水分解を妨げ、血管を拡張することである (図)。そして、PDE5阻害薬が肺高血圧を改善すると考えられる根拠はその分布にある。11種類のPDEファミリーの中でPDE5は肺と陰茎に多く分布するため、肺血流を増加させると考えられている。正常肺においては、PDE5発現の優位性が知られているが、原発性肺高血圧症のような病的肺では、PDEの肺におけるmRNA発現が変化している可能性が示唆された (Rajkumar R et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H1235-48)。

IPFの終末期には、血圧低下と高度頻脈

が認められる。これは、肺の線維化のために肺高血圧となり、右心不全から PH crisis を起こして体血圧の低下に至る、その代償として頻脈が出現していると考えられる。終末期のみならず、慢性期にも潜在的な肺血管抵抗の上昇が予測される。この病態に対してPDE阻害薬にはcAMPもしくはcGMPの増加を介した肺血管拡張作用が有効であると期待される。

さらに、近年、循環作動物質PDE阻害薬の新たな側面として、血管内皮細胞保護や臓器保護が期待されるようになった。この作用は末梢循環改善以外の機序により惹起される可能性がある。PDE3阻害薬により、虚血や炎症病態で導かれる活性酸素の除去、ミトコンドリア機能維持、Akt活性化などを介して、細胞機能が維持されうる (Matsuda N. *Cardiovascular Anesthesia* 2004; 8: 61-7.)。

## 2. 研究の目的

フォスフォジエステラーゼを特発性肺線維症の病態を改善する標的の一つと考え、正常肺との発現の差を明らかにしようと考え、仮説を立てる。

・IPF患者の肺では、PDEファミリーの中のいずれかの型のタンパク発現が増強している。

・上の結果得られた型のPDEは、肺組織の中の血管平滑筋細胞に局在している。

以上の仮説を検証する。

## 3. 研究の方法

### 実験1. ウエスタンブロッティング

肺癌患者からの摘出標本の中の正常組織をコントロール群、IPF患者から得られた肺組織を対照群とする。

肺組織のタンパク質を抽出後、タンパク質の立体構造を破壊するために、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)や2-メルカプトエタノールを加えたバッファーにタンパク質を溶解させる。これをSDS-PAGEにて展開し、ニトロセルロース膜に転写する。この膜に対して免疫染色を行うことで、タンパク質を検出する。それぞれの群におけるPDE5Aの発現量を定量する。

## 実験 2 . 免疫染色

肺組織をホルマリン固定し、パラフィン切片を作成する。

PDE5A に対する抗体を室温で 60 分間パラフィン切片と反応させる。次にヤギの二次抗体を反応させ、染色結果を撮像し、目的とする PDE の局在を明らかにする。

## 4 . 研究成果

### 実験 1 .

手術に伴い得られた健常肺と IPF 肺の組織からタンパク質を抽出し、PDE5A のタンパク質発現をウエスタンブロット法で定量したところ、IPF 患者において PDE5A の発現増強を認めた。

### 実験 2 .

PDE5A の増強が認められる部位を明らかにするために摘出標本のパラフィン切片を用いて免疫染色を行ったところ、当初予想された血管平滑筋ではなく、線維芽細胞の増勢した部位に抗体が濃染した。

当初、申請者らは、血管平滑筋分布の PDE が発現増強することにより肺高血圧を呈するのではないかと仮定し、肺線維症に伴う肺高血圧症に対する治療ターゲットとなり得るのではないかと考えていた。しかし、線維芽細胞における PDE5 発現の増強が認められたことから、線維化そのものという、より病態形成に近い部分で PDE が関与している可能性が示唆された。

## 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 4 件)

1. Hirose K, Hirose M, Yamada Y.  
Conceivable differential diagnosis of abnormal hypotension related to anaesthesia induction in a patient with a low body mass index. *Br J Anaesth* 2015
2. Hirose K, Kawahito S, Mita N, Kitahata H. Usefulness of artificial endocrine pancreas during resection of insulinoma. *J Med Invest* 61: 421-425, 2014
3. Hirose K, Hirose M, Tanaka K, Kawahito

S, Tamaki T, Oshita S. Perioperative management of severe anorexia nervosa *Br J Anaesth* 112: 246-54, 2014

4. Hirose K, and Hirose M. Postoperative conversion disorder in severe anorexia nervosa. *J Anesth.* 28: 140, 2014

[学会発表](計 6 件)

1. 浦中誠、廣瀬佳代、桑島謙、山田芳嗣、河野崇、術後多幸感に及ぼすホルモン動態の受診者動作特性 (ROC) 分析、第 62 回日本麻酔科学会 平成 27 年 5 月 28 日 神戸ポートピアホテル 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
2. Kayo Hirose, Ken Kuwajima, Takashi Kawano. Expression of postoperative ecstasy in anesthetized patients. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2014 平成 26 年 10 月 12 日 New Orleans(USA)
3. 廣瀬佳代、桑島謙、太田宗幸、鳥海信一、河野崇、術後恍惚(POE)出現における内分泌機構 Expression of postoperative ecstasy (POE) in anesthetized patients 第 61 回日本麻酔科学会 平成 26 年 5 月 15 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
4. 廣瀬佳代、甲藤貴子、太田宗幸、鳥海信一、神経性食思不振症により高度の栄養障害を有する患者の麻酔経験、Anesthesia for anorexia nervosa with severe malnutrition 日本麻酔科学会 中国四国支部第 49 回学術集会、平成 24 年 9 月 8 日 高知市文化プラザかるぽーと (高知県・高知市)
5. 廣瀬佳代、イソフルランによる心筋保護効果における O-Linked -N-Acetylglucosamine の役割 学術賞記念講演 第 59 回日本麻酔科学会、平成 24 年 6 月 7 日 神戸ポートピアホテル 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
6. 北村園恵、河野崇、河野裕明、曾我朋宏、廣瀬佳代、横山正尚：急性術後痛に対する術前の患者認識と術後痛管理への満足度の関係、日本麻酔科学会 第 59 回学術集会 神戸ポートピアホテル 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

[図書](計 4 件)

1. 廣瀬佳代、北畑洋 Chapter 14 歯科医師に必要な検査値の読み方・活かし方 歯科展望別冊/歯科医のための全身性疾患ガイド 194-202 2014 医師薬出版株式

- 会社
2. 北畑洋、**廣瀬佳代**  
心筋細胞に存在する受容体とその作用  
For Professional Anesthesiologists  
心血管作動薬 3-18, 2013
  3. **廣瀬佳代**、川人伸次  
III 心血管作動薬の使用法：薬力学と薬物動態を踏まえて 5.カルシウム拮抗薬  
For Professional Anesthesiologists  
心血管作動薬 160-169, 2013
  4. **廣瀬佳代**、川人伸次  
II 心血管作動薬の使用法：薬力学と薬物動態を踏まえて 6.カリウムチャンネル開口薬 For Professional Anesthesiologists 心血管作動薬 170-178, 2013

〔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 なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
廣瀬佳代 (HIROSE KAYO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40532221

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：