

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461621

研究課題名(和文) 肺高血圧症における内皮由来過分極因子の役割解明と治療応用

研究課題名(英文) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in pulmonary artery hypertension

研究代表者

早瀬 康信 (HAYABUCHI, Yasunobu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：20403686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小児における肺高血圧症は心不全の増悪を引き起こす予後不良の病態である。本研究では肺高血圧病変における血管内皮由来過分極因子(EDHF)の作用状態、肺高血圧病変進行抑制における役割解明と治療応用に関してカリウムチャネル制御の点から検討した。モノクロタリン投与または低酸素暴露によって肺高血圧症を呈したラット肺血管組織では内皮依存性弛緩およびEDHF依存性弛緩が低下していた。肺動脈血管内皮細胞におけるKCa3.1、KCa2.3、平滑筋細胞でのKCa1.1発現低下が確認された。これらはEDHFに依存する血管拡張作用の低下を示し、EDHF経路活性化に伴う肺高血圧治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a poor prognostic condition in children. We investigated the involvement and the impact of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the pathological progression. EDHF-dependent vasodilation in PAH rat induced by monocrotaline or hypoxia was significantly lower than in control rats. The expression of KCa3.1 and KCa2.3 of endothelial cells and KCa1.1 of smooth muscle cells were significantly reduced. These data suggest that EDHF-dependent pulmonary vasodilation is suppressed in PAH. Furthermore, the signal transduction of EDHF would have great impact on the treatment of PAH.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧症 肺動脈 血管内皮由来過分極因子 チャネル カリウムチャネル 血管 内皮細胞 平滑筋細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小児における肺高血圧症には特異性・遺伝性・先天性心疾患を原因とするものなどが挙げられる。これらの肺血管組織所見は類似し、共通の発症機序も示唆されているため、2008年に発表された Dana Point 分類では肺動脈性肺高血圧症の項に分類されている。病態の進行とともに、血管内膜の肥厚線維化・中膜の平滑筋層肥大・叢状病変と呼ばれる複雑な像を呈する病変が認められ、心不全の増悪を引き起こし、患児の予後に大きく影響している。

(2) 血管内皮は、プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)、一酸化窒素(NO)、内皮由来過分極因子(EDHF)の3種類の血管内皮依存性弛緩因子を産生・放出し、血管機能の恒常性を維持している。PGI<sub>2</sub>、NOは作用機序や役割が精力的に研究され、肺高血圧治療の領域においても既に臨床応用されている。EDHFは以前より、その存在は知られているが(Feletou & Vanhoutte, *Br J Pharmacol* 1998)、本体は未だ同定しておらず、作用機序や働きも明瞭ではない点が多く存在する。しかし、EDHFの作用は糖尿病や高脂血症などの動脈硬化危険因子により障害され、EDHFシグナリングを改善させることによって血管病変の改善や血管内膜作用の回復の可能性があることが、体循環系の血管において示唆されている(Matsumoto T, et al. *Eur J Pharmacol* 2006)。一方、EDHFの肺血管での働きや肺高血圧病態下での作用は明らかではなく、治療に関する有用性は示されていない。既知の血管内皮依存性弛緩因子であるPGI<sub>2</sub>及びNOはその本体や関連する細胞内シグナル制御を用いて肺高血圧治療に臨床使用されている。しかし、肺高血圧症患者の予後は未だ厳しい状態であり、肺血管におけるEDHF関連のシグナル経路の解明と治療応用を研究することが有用ではないかと考えた。

(3) EDHFは血管内皮細胞に対するアゴニスト刺激やずり応力などの様々な刺激により産生・放出され、血管平滑筋細胞に作用して過分極させることにより血管平滑筋の弛緩を惹起する。EDHF本体に関する仮説としては、1)cytochrome P450 epoxygenaseを介してアラキドン酸から産生される epoxyeicosatrienoic acids (EETs), 2)過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 3)K<sup>+</sup>イオン, 4)gap junctionなどの説があるが、動物種や臓器差、血管径などによって反応性に差があり、いずれの説もそれだけでは説明がつかない点も多いため、現在まで不確定であり、複数のEDHFの存在も示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、このような肺高血圧病変における血管内皮由来過分極因子(Endothelium-derived hyperpolarizing

factor, EDHF)の作用状態、及びEDHFの肺高血圧病変進行抑制における役割解明と肺高血圧症への治療応用の開発に関して、主として、カリウムチャネル制御の点から検討していくことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) EDHFに対する反応をコントロール(正常肺動脈圧)ラットと肺高血圧ラットから摘出した肺動脈で検討する。各々における血管弛緩反応、膜電位変化・チャネル電流を測定する。さらに、血管内皮細胞におけるKCa3.1, KCa2.3 channelのmRNA、平滑筋細胞のKCa1.1 mRNAレベルの変化を観察する。また、免疫組織染色を用いて発現を確認する。EDHFに対する血管の反応に関してはNO合成阻害剤、PGI<sub>2</sub>阻害剤使用下での実験やKCa3.1, KCa2.3 channel活性化剤を使用して施行する。

(2) 次に、KCa3.1, KCa2.3 channel活性化剤が肺高血圧ラットに与える影響を検討する。KCa3.1, KCa2.3 channelを活性化させるSKA-31, SKA-20は、EDHFの発現・作用を増強させる作用があるとされ(Hasenau AL, et al. *Acta Physiol* 2011)、EDHF作用による肺高血圧ラットの肺動脈圧、右室心筋重量の軽減や組織学的な平滑筋細胞の増殖・内膜肥厚線維化や中膜筋層肥大などの改善が認められか否かを検討する。さらに、平滑筋細胞の形質転換の状態やKCa1.1 channel電流量・膜電位の変化について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 正常および肺高血圧ラットにおけるEDHF産生・遊離の状態およびEDHFに対する肺血管の反応を検討するため、摘出した肺血管の血管張力測定、電気生理学的検査(Patch-clamp法、多光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた電位測定)、血管内皮細胞のKCa3.1, KCa2.3 channel発現をWestern blotを用いて観察した。

モノクロタリン投与または低酸素暴露によって肺高血圧を呈したラットの肺血管組織を摘出し、血管張力測定を施行して、内皮依存性弛緩およびEDHF依存性弛緩について観察する。EDHF依存性弛緩の検討ではPGI<sub>2</sub>阻害剤、NO産生阻害剤、グアニル酸サイクラーゼ阻害剤などを適宜使用して施行する。肺高血圧ラットにおいては内皮依存性の血管弛緩反応低下が認められた。肺血管のEDHFに対する反応についてもコントロールラットと比較して有意に低値であった。

次に、各々のラット群において、血管内皮細胞のKCa3.1, KCa2.3 channel、平滑筋細胞のKCa1.1 Channelの発現量をWestern blot、免疫組織染色、および電気生理学的手法を用いて検討した。血管内皮細胞のKCa3.1, KCa2.3 channelの発現量が低下しており、さらに電流量の低下が認められた。

(2) EDHF の作用増強によって肺高血圧の改善が得られるか否かの検討を施行するために、KCa3.1, KCa2.3 channel の活性化剤である SKA-31, SKA-20 を肺高血圧ラットに投与して実際の肺動脈圧や右室心筋重量などを測定した。さらに、血管張力測定、電気生理学的検査、分子生物学的検査、組織染色に関しても SKA-31, SKA-20 投与の有無による変化を検討し、EDHF の効果を観察した。

SKA-31, SKA-20 を投与群と非投与群とで肺動脈圧、右室心筋重量などを測定し、肺動脈の組織所見の相異について検討したが、有意な変化は認められなかった。投与方法や経過観察期間などの問題もあるかもしれないが、今後の検討課題である。

## 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 18 件)

Hayabuchi Y, Ono A, Kagami S. Pulmonary annular motion velocity assessed using Doppler tissue imaging -Novel echocardiographic evaluation of right ventricular outflow tract function- Circulation Journal 査読有、2016, 80: 168-176. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0695

Hayabuchi Y, Ono A, Homma Y, Kagami S. Tricuspid L and L' waves. International Journal of Cardiology 査読有、2016, 211: 64-65. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.02.160.

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Fibromyxoid excrecence of the aortic valve that manifested after catheterisation and required resection. Cardiol Young 査読有、2015 ;25(2):362-364. doi: 10.1017/S1047951114000092

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Assessment of the Helical Ventricular Myocardial Band Using Standard Echocardiography. Echocardiography. 2015 査読有、32(2):310-318. doi: 10.1111/echo.12624

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Multidetector Row Computed Tomography Evaluation in Pediatric Heart Diseases -Additional Information to Echocardiography and Conventional Cardiac Catheterization Int J Pediatr Res 査読有 Int J Pediatr Res 2015,1:001. <http://clinmedjournals.org/International-Journal-of-Pediatric-Research.php>

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Right ventricular myocardial deformation patterns in children with

congenital heart disease associated with right ventricular pressure overload. Eur Heart J Cardiovasc Imaging 査読有 2015, 16(8):890-899. doi: 10.1093/ehjci/jev011.

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Bronchogenic cyst compressing the pulmonary artery and the left atrium. Eur Heart J Cardiovasc Imaging 査読有 2015;16(7):746. doi: 10.1093/ehjci/jev059.

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Aortic forward flow in aortic atresia via ventriculo-coronary arterial onnections. Eur Heart J Cardiovasc Imaging 査読有 2015, 16(8) :847. doi: 10.1093/ehjci/jev077.

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Optical coherence tomography can visualize the pulmonary artery in Williams-Beuren syndrome. Eur Heart J Cardiovasc Imaging 査読有、2015;16:967. doi: 10.1093/ehjci/jev109.

Hayabuchi Y, Sakata M, Kagami S. Assessment of two-component ventricular septum: Functional differences in systolic deformation and rotation assessed by speckle tracking imaging. Echocardiography 査読有、2014;31(7):815-824. doi: 10.1111/echo.12624

Hayabuchi Y, Sakata M, Inoue M, Mori K, Kagami S. Echocardiographic assessment of anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery. J Echocardiography 査読有 2014; 12(2):60-61. DOI 10.1007/s12574-014-0207-3

Ono A, Hayabuchi Y, Sakata M, Ichihara Y, Kagami S, Mori K. Right ventricular thrombosis in two patients with pulmonary atresia with intact ventricular septum J Echocardiography 査読有、2014 12(2):62-64. DOI 10.1007/s12574-014-0210-8

早瀬康信, 阪田美穂, 小野朱美, 香美祥二. 光干渉断層像 (Optical Coherence Tomography) で肺血管病変を観察した特発性肺動脈性肺高血圧症. 日本小児循環器学会雑誌 査読有 2014;30(3): 365-370.

<http://jspccs.umin.ac.jp/site/html/journal/magazine.php>

早瀬康信. 一酸化窒素吸入療法と Phosphodiesterase-5 阻害薬による肺高血圧および心不全治療の可能性. 日本小児循環器学会雑誌 査読無 2014;30(1): 36-38.

<http://jspccs.umin.ac.jp/site/html/journal>

[al/magazine.php](#)

Kurobe H, Tominaga T, Sugano M, Hayabuchi Y, Egawa Y, Takahama Y, Kitagawa T. Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune response: Three-year tracing study after pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 査読有、2013 Mar;145(3):656-662. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.12.015

Sakata M, Hayabuchi Y, Inoue M, Onishi T, Kagami S. Left atrial volume change throughout the cardiac cycle in children with congenital heart disease associated with increased pulmonary blood flow: evaluation using a novel left atrium-tracking method. *Pediatr Cardiol.* 査読有、2013 Jan;34(1):105-111. doi: 10.1007/s00246-012-0395-4.

Hayabuchi Y, Sakata M, Ohnishi T, Inoue M, Kagami S. Ratio of early diastolic tricuspid inflow to tricuspid lateral annulus velocity reflects pulmonary regurgitation severity but not right ventricular diastolic function in children with repaired tetralogy of Fallot. *Pediatr Cardiol.* 査読有、2013 Jun;34(5):1112-1117. doi: 10.1007/s00246-012-0612-1

Hayabuchi Y, Inoue M, Sakata M, Ohnishi T, Kagami S. Subclavian and pulmonary artery steal phenomenon in a patient with isolated left subclavian artery and right aortic arch. *J Clin Ultrasound.* 査読有、2013 41(4):265-268. doi: 10.1002/jcu.21874.

〔学会発表〕(計 18件)

早淵康信 小野朱美 本間友佳子 香美祥二. Tissue Doppler 法と Speckle tracking 法を用いた右心室収縮様式の解析. 第27回日本心エコー図学会学術集会 平成28年4月22-24日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

早淵康信 小野朱美 本間友佳子 香美祥二. 組織ドプラ法による肺動脈弁輪部運動速度の解析は肺動脈コンプライアンスの非侵襲的評価に有用である. 第27回日本心エコー図学会学術集会 平成28年4月22-24日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

小野朱美 早淵康信 香美祥二. 拘束性障害を呈し肺高血圧を来したアントラサイクリン誘発性心筋症の1例. 第27回日本心エコー図学会学術集会 平成28年4月22-24日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

早淵康信. 教育講演 成人先天性心疾患診療に役立てる心エコー検査 「未修復先天

性心疾患者が大人になったら - エコーで何を見る - 第80回日本循環器学会学術集会 平成28年3月18-20日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

本間友佳子 森一博 井上美紀 寺田知正 早淵康信. M-mode心エコー図による新生児左室後壁 diastolic wall strain. 第80回日本循環器学会学術集会 平成28年3月18-20日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

本間友佳子、早淵康信、小野朱美、阪田美穂、香美祥二. 正常肺組織を犠牲にすることを前庭としてコイル塞栓術を施行した両側肺全区域びまん性肺動脈瘻の1例. 第22回日本小児肺循環研究会 平成28年2月6日 笹川記念会館(東京都港区)

小野朱美、早淵康信、香美祥二. 合併した肺分画症に対するコイル塞栓術が著効した心筋虚血発作を繰り返す純型肺動脈閉鎖(PAIVS)の1新生児例. 第27回JPIC学会学術集会 平成28年1月28日~30日 広島国際会議場(広島県広島市)

阪田 美穂, 早淵 康信, 香美 祥二. 右室圧負荷を有する先天性心疾患症例における手術前後のDWSの変化. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会 平成27年7月16~18日 ホテル日航東京(東京都港区)

小野朱美 早淵康信 阪田美穂 香美祥二 井上美紀 森一博. 光干渉断層像(Optical Coherence Tomography:OCT)を用いたWilliams症候群における肺動脈病変の観察. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会 平成27年7月16~18日 ホテル日航東京(東京都港区)

本間友佳子, 早淵康信, 阪田美穂, 香美祥二. 類洞交通を介した駆出によって上行大動脈順行性血流と冠状動脈貫流を認めた大動脈弁閉鎖の1例. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会 平成27年7月16~18日 ホテル日航東京(東京都港区)

早淵康信, 阪田美穂, 香美祥二. 光干渉断層像(Optical Coherence Tomography:OCT)を用いた先天性心疾患肺血管病変の観察. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会 平成27年7月16~18日 ホテル日航東京(東京都港区)

早淵康信, 阪田美穂, 香美祥二. 新しい指標による右室機能解析 - 肺動脈弁輪部運動速度を用いた右室流出路機能評価 - 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会 平成27年7月16~18日 ホテル日航東京(東京都港区)

早淵康信, 阪田美穂, 香美祥二. 光干渉断層像(Optical Coherence Tomography:OCT)を用いた先天性心疾患肺血管病変の観察. 第118回日本小児科学会学術集会 平成27年4月17~19日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

早淵康信 阪田美穂 香美祥二. 新しい指標を用いた右室機能解析 -

circumferential strain (右室自由壁円周方向収縮)と肺動脈弁輪部運動速度(右室流出路機能) - 第 26 回日本心エコー図学会学術集会 平成 27 年 3 月 26 ~ 28 日、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

早淵康信 阪田美穂 香美祥二. 正常肺組織を犠牲にすることを前提としてコイル塞栓術を施行した両側肺全区域びまん性肺動静脈瘻の 1 例. 第 26 回日本 Pediatric Interventional Cardiology 学会 平成 27 年 1 月 22 ~ 24 日 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

早淵康信 阪田美穂 香美祥二. シンポジウム 右室を見る-最新の画像診断 -多方向からの右室機能解析の重要性 - 右室自由壁円周方向の収縮 (Circumferential strain) と右室流出路の収縮 (肺動脈弁輪運動速度) の解析 - 第 50 回日本小児循環器学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 3 - 5 日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

早淵康信 阪田美穂 小野朱美 香美祥二. 光干渉断層像 (Optical Coherence Tomography: OCT) を用いた特発性肺動脈性肺高血圧症における肺血管病変の観察. 第 50 回 日本小児循環器学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 3 - 5 日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

阪田美穂 早淵康信 森一博 香美祥二. 右室圧負荷を有する先天性心疾患症例では心室中隔の心筋伸展性が低下する - DWS を用いた心室中隔のスティフネス測定 - 第 50 回 日本小児循環器学会総会・学術集会 平成 26 年 7 月 3 - 5 日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

〔図書〕(計 1 件)

早淵康信. 小児心電図診断基準. 森博愛・丸山徹編著 徹底解説! 心電図 - 基礎から臨床まで - 2015 年 医学出版社; 総ページ数 14 (pp.215-226)

〔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

早淵 康信 (HAYABUCHI, Yasunobu)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号: 20403686

(2) 研究分担者

阪田 美穂 (SAKATA, Miho)  
徳島大学・病院・特任助教  
研究者番号: 80532514