

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461113

研究課題名(和文)肺高血圧症の早期診断における新規酸化ストレスマーカーの探索的検討

研究課題名(英文) Exploratory study of novel oxidative stress markers for early diagnosis of pulmonary hypertension

研究代表者

池田 聡司 (IKEDA, Satoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号：10336159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は予後不良の病態であり、その早期診断、治療が必要となるが、その診断に有用な血中のバイオマーカーはまだ確立されていない。PAHの成因には酸化ストレスが関与していることから、本研究では、グルタチオン化蛋白とPGC-1の2つの酸化ストレスに関わる蛋白がその指標となるかをPAHモデル動物で検討した。しかし、対照群の動物と比べ、明らかな変化が認められず、この2つの蛋白はバイオマーカーとしては適さないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of pulmonary arterial hypertension (PAH) is poor; therefore, early diagnosis and treatment is required. However, the useful biomarkers for the diagnosis have not been established. In the present study, we examined whether oxidative stress-related proteins, such as glutathionylated protein and PGC-1, could be the biomarkers, because oxidative stress is involved in PAH development and progression. As a result, the expression of the two proteins did not differ between PAH model and control animal. We concluded that these proteins were not good biomarkers for the diagnosis of PAH.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧症 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

我々は、肺高血圧症の早期診断に以前より取り組み、比較的軽度の肺高血圧症の推定に有用な指標を従来の検査法（心電図や心エコー図検査）にて示してきたが、さらにその診断精度を上げる為には、血液中のバイオマーカーが非侵襲的で有用な検査と考えた。従来、Brain natriuretic peptide (BNP)や尿酸値などがバイオマーカーとして用いられているが、平均肺動脈圧を推定する感度・特異度は十分でない。

肺高血圧症の成因として、血管壁の異常な細胞増殖が考えられており、その誘因には血管壁の炎症、変性や腫瘍性増殖などがある。そして、その発症には遺伝子異常のみならず、環境因子が加わって生じることが示唆されている。酸化ストレスもその一因子である。我々は以前より、細胞内のグルタチオン修飾に関心を持ち、動脈硬化薬における有用性を示してきた。蛋白のSH基はグルタチオンとの間で活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS)により酸化修飾を受け、S-グルタチオニル化 (-S-SG)を生じる。このグルタチオニル化は比較的、低濃度のROS産生により生じ、グルタレドキシンを介して蛋白の脱グルタチオニル化を生じる。このことは、蛋白のグルタチオン化は軽度の酸化ストレスで生じ、可逆的であると推測される。

またミトコンドリアの電子伝達系におけるROS産生は、転写因子のコアクチベーターである peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR-) coactivator-1 protein- (PGC-1)を制御し、ミトコンドリア生成に関わる。すなわち、PGC-1 は酸化ストレスの制御に深くかかわっている。本研究では、グルタチオン化蛋白や PGC-1 の肺高血圧症診断における有用性を検討する。

2. 研究の目的

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は予後不良であり、早期診断・早期治療が必要となる。その早期診断には心エコーや心電図が用いられるが、その感度・特異度はまだ不十分で、軽度の肺高血圧を診断するのはなかなか困難である。そこで、これらの指標とともに有用な血中のバイオマーカーを組み合わせることで、さらに診断精度があがれば、肺高血圧症患者の早期診断、さらには治療につながり予後の改善が見込まれる。しかしながら、現在までに、感度・特異度が十分に確立したバイオマーカーはない。本研究では、肺高血圧症の発症機序に關与する酸化ストレスの観点から、肺高血圧症診断に有用なバイオマーカーを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

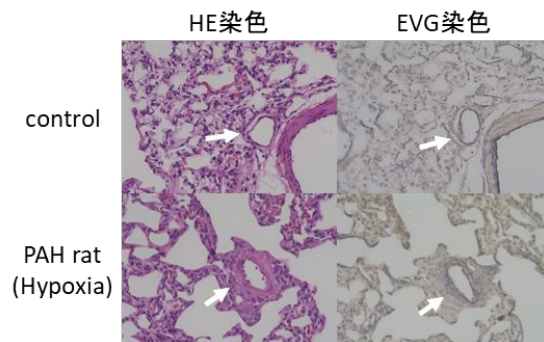
<基礎研究>

PAH モデルとして、VEGF 受容体拮抗薬/低酸素飼育による PAH モデルラットあるいは低酸素飼育による PAH モデルマウスを作成し、実験に使用した。肺高血圧症の確認には、心エコーによる肺動脈血流波形の経時的な変化の測定、最終的にカテーテル検査による右室圧の測定や心重量/肺組織にて確認した。採取した肺組織を免疫染色あるいは Immunoblot にて、グルタチオン化蛋白や PGC-1 蛋白発現を検討した。また培養細胞（ヒト肺動脈平滑筋細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞）を用いて、invitro の系でも、それらの発現を検討した。

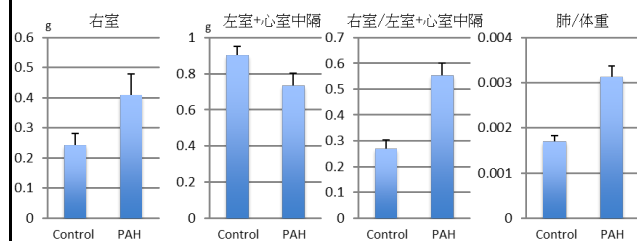
*当初、臨床研究に着手する予定であったが、基礎研究の結果が想定通りに出ず、臨床研究を着手するには不十分と考えられた。

4. 研究成果

(1) PAH モデルラットの心/肺重量、肺組織の検討

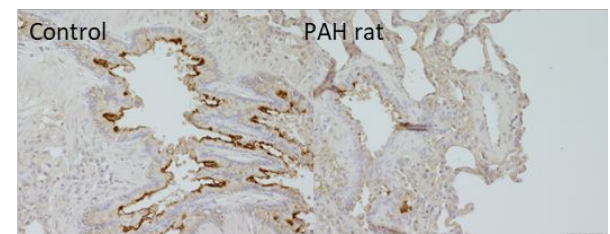


PAH モデルラットでは、上記のいずれの方法にて、上図に示すような肺動脈の中膜肥厚が認められた (HE 染色: Hematoxylin Eosin 染色、EVG 染色: Elastica van Gieson 染色)。また、下図のように、右室、肺重量の増加、右室圧の増加が PAH モデル動物にて認められた。



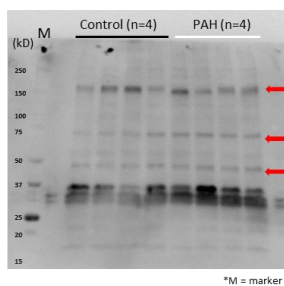
以上から、PAH モデルとして妥当であると考えられ、以後の実験を行った。

(2) グルタチオン化蛋白に関する検討



我々が作成したグルタチオン化蛋白抗体を用いた検討では、上図のように、control

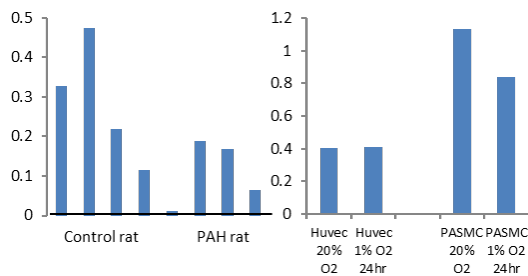
群と PAH モデルラット群の肺組織において有意な差異はなく、主に気管上皮細胞が染色され（茶色）肺動脈では染色されなかった。



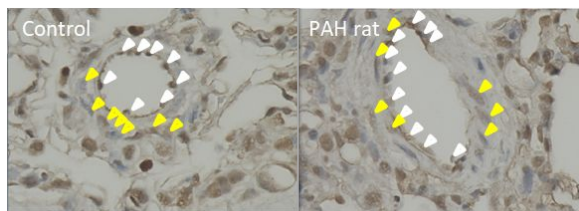
また左図のように、肺組織から抽出した蛋白を本抗体で Immunoblot をすると、3つのバンドが検出され特異性が不明であった。さらにいずれのバンドにても control 群と PAH 群での差

異が見られなかった。培養細胞に GSSG 添加や過酸化水素水処理をして、バンドの特異性も検討したが、明らかでなかった。そこで本抗体による PAH の検出は困難と判断した。

(3) PGC-1 に関する検討



上図（左）は、PAH モデルラットの肺組織における PGC-1 の蛋白発現であるが、PAH ラット群で発現量が低い傾向にあった。しかしながら、個体差が大きく、また複数回の実験では一定の傾向が得られなかった。そこで、培養細胞にて低酸素培養下での PGC-1 の蛋白発現を検討した。肺動脈平滑筋細胞にて、低酸素培養下での PGC-1 の蛋白発現が低下する傾向が見られた（上図：右）。



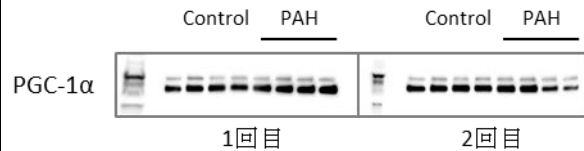
PGC-1α陽性細胞（血管内皮細胞△,血管平滑筋細胞▲）

上図は、PGC-1 抗体による免疫染色であるが、上記の培養細胞で平滑筋細胞における変化が見られたため、肺動脈壁の陽性細胞の分布を詳しく検討した。免疫染色では、control 群と PAH 群において、有意な差は認められなかった。

Rao らの報告(Mol Cell Biochem, 2012)によれば、ラット肺動脈平滑筋細胞において PGC-1 の発現は低酸素培養にて 24 時間にて増加し、以後、経時的に発現が低下していたため、PAH の病態が形成されてしまった状況ではなく、その形成過程において PGC-1 の

発現が増加していることが推測された。

そこで、PAH モデルラットは VEGF 受容体拮抗薬 (SU5416) + 低酸素飼育 3 週間に、さらに室内気での 5 週間の飼育が必要であるが、低酸素飼育直後 (3 週間目) でも検討をおこなった。



結果は、上図のように、PAH モデルラットにて一定の傾向がなく、PAH 発症過程の早期の段階でも、PGC-1 の発現に関して結論付けるのは困難であった。

上記以外にも、低酸素飼育による肺高血圧モデルマウスも作成し、上記のような実験を行ったが、ラットと同様に一定の結果が得られず、肺高血圧発症における PGC-1 の役割は明らかにできなかった。

グルタチオンはコピキタスに存在するペプチドで、そのグルタチオニル化されたタンパクもコピキタスに存在すると考えられ、また PGC-1 は転写因子のコアクチベータであり、その発現量が元々、少ないことが、本研究の結果が一定でなかった理由の一つと思われる。さらに PAH 発症・進展過程における酸化ストレスもその進展に伴い、単調に増加していく訳でもないため、実験の時期の違いや肺高血圧症の程度により、差異が生じる可能性があり、このことも本研究にて推定していた結果が得られなかった一因と考えられた。

以上の基礎研究の結果を踏まえ、当初予定していた患者検体を採取して、臨床応用への検討を行う研究は、有用なデータが出る可能性が低く断念した。

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 3 件)

1. Ikeda S, Koga S, Yamagata Y, Eguchi M, Sato D, Muroya T, Yonekura T, Tsuneto A, Yoshimuta T, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Comparison of the effects of edoxaban, an oral direct factor Xa inhibitor, on venous thromboembolism between patients with and without cancer. J Cardiol, 2018 in press. (査読有)
2. Miura M, Ikeda S, Yoshida T, Yamagata Y, Nakata T, Koga S, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Deeper S wave in lead V5 and broader extent of T wave inversions in the precordial leads are clinically useful electrocardiographic parameters for predicting pulmonary hypertension.

- Int Heart J 59: 136-142, 2018 (査読 有)
3. Yamagata Y, Ikeda S, Nakata T, Yonekura T, Koga S, Muroya T, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Balloon pulmonary angioplasty is effective for treating peripheral-type chronic thromboembolic pulmonary hypertension in elderly patients. Geriatr Gerontol Int. 18: 678-684, 2018 (査読 有)

[学会発表](計 6 件)

1. 池田聡司. 担癌患者の静脈血栓症治療における DOAC の有用性. 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018 年
2. Sato D, Ikeda S, Yamagata Y, Koga S, Eguchi M, Koide Y, Kawano H, Maemura K. Comparative effects of factor Xa inhibitors on venous thromboembolism in patients with and without cancer. The 82th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2018.
3. 山方勇樹, 池田聡司, 中田智夫, 米倉剛, 古賀聖士, 室屋隆浩, 小出優史, 河野浩章, 前村浩二. The differences of right-sided heart function assessed by speckle tracking analysis between chronic thromboembolic pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension. The 82th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2018.
4. 山方勇樹, 池田聡司, 中田智夫, 米倉剛, 江口正倫, 古賀聖士, 室屋隆浩, 小出優史, 河野浩章, 八尾貴子, 世古義規, 前村浩二. Plasma levels of Oxidative Stress-Responsive Apoptosis Induction Protein (ORAIP) is associated with pulmonary hemodynamics in patients with pulmonary hypertension. The 82th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2018.
5. Eguchi M, Ikeda S, Eto M, Sato D, Nakata T, Yonekura T, Koga S, Katayama T, Koide Y, Kawano H, Maemura K: Comprehensive Screening of Circulating mircoRNAs as a Novel Biomarker for Connective Tissue Disease-Pulmonary Arterial Hypertension. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2016.
6. Eto M, Ikeda S, Yoshida T, Yamagata Y, Nakata T, Koga S, Kawano H, Maemura K: Available Electrocardiogram Signs for Predicting over 25mmHg of Mean Pulmonary Arterial Pressure Combined with Tricuspid Valve Regurgitation Velocity by Echocardiography. The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2016.

[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

池田 聡司 (IKEDA, Satoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
講師
研究者番号: 10336159

(2) 研究分担者

浦田 芳重 (URATA, Yoshishige)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
助教
研究者番号: 30185087

(3) 研究分担者

前村 浩二 (MAEMURA, Koji)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号: 90282649