

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462081

研究課題名(和文)肺高血圧症における放射光微小血管撮影法を用いた微小血管血流変化と血管内皮細胞障害

研究課題名(英文) Synchrotron radiation pulmonary micro-angiography for evaluating micro-vasculature remodeling and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension.

研究代表者

徳永 千穂 (TOKUNAGA, CHIHO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30451701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高エネルギー加速器研究機構放射光研究施設と共同研究開発した放射光微小血管撮影法を応用し、肺高血圧症の微小肺動脈閉塞性病変の形態変化を解析することを目的とした。モノクロータリン誘導肺高血圧ラットの肺動脈放射光微小血管撮影を行ったところ、コントロールに比して有意な肺微小血管の狭小化を認めた。また、可視化された微小肺動脈リモデリング所見と組織学的な微小肺動脈血管壁肥厚所見が合致することが明らかとなった。さらに、免疫組織学的解析により、微小血管狭小化の所見は、ET-1を介した肺動脈リモデリングの進行による血管壁の肥厚と、NOの発現低下による血管攣縮により誘導されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously established a synchrotron radiation pulmonary micro-angiography (SRPA) in an in-vivo rat model. In this study, we aimed to qualify micro-vascular remodeling in crostaline induced pulmonary arterial hypertension (PAH) rats. To determine the association of endothelial function to the vascular remodeling, local expression of endothelin-1 (ET-1), endothelial nitric oxide synthase(eNOS) was evaluated by immunohistochemical staining. Microvascular density measured by SRPA was significantly decreased in the PAH rats. eNOS expression was decreased and ET-1 expression was increased significantly in the PAH rats. SRPA is a useful method to visualize decreased and narrowed pulmonary micro-vasculature in the PAH rats. Increased ET-1 expression may contribute to a proliferation and remodeling of pulmonary arterioles. Also, decreased eNOS expression may associate with vasospasm of pulmonary arterioles induced by endothelial dysfunction due to increased shear stress in PAH.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺高血圧症 放射光微小血管撮影法 シアストレス

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症は、原発性ないし種々の疾患に伴って肺動脈圧が上昇する肺血管疾患であり、無治療では予後不良の病態である。肺動脈性肺高血圧症の原因には特発性肺動脈性肺高血圧や膠原病、先天性心疾患に伴う高肺血流によるものなどが様々であるが、いずれの肺高血圧症でも肺細動脈の中膜肥厚や内膜増殖、さらには叢状病変を認める。これらの変化は、炎症や増加した shear stress によって血管内皮細胞が障害され、エンドセリン (Endothelin: ET) や血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor :VEGF) などの物質が肺動脈閉塞の進行へ関与している可能性が示唆されている。肺高血圧症の病理組織では、肺細小動脈のびまん性閉塞を認め、これが肺高血圧の重症度に相関すると考えられているが、この重症度評価は病理組織診断に基づいて行なわれることが多く、非侵襲的な評価は困難であり、重症症例では診断のための侵襲の大きさが問題であった。さらに、現在の臨床の場では、肺高血圧症における肺動脈圧は心臓カテーテル法や心エコーにより測定されるが、いずれも中枢肺動脈での測定である。このため、肺動脈閉塞性病変の進行の経時的変化と、末梢細動脈においてどのような血管リモデリングが生じているかの判断は、今まで測定の方法がなく明かではなかった。

我々は独自の技術として、高エネルギー加速器研究機構放射光研究施設との共同研究において造影剤を用いた放射光微小血管撮影法を開発し、血管径 50 μ m までの血管の撮像を可能とした。そして、NHK 放送技術研究所で開発された高感度受像管 (HARP 管) およびハイビジョン撮影技術を放射光血管撮影に応用し、静止画像およびテレビ動画像として微小血管を可視化することにも成功した。この技術を応用することにより、生体内で非侵襲的に微小肺動脈閉塞性病変の進行を可

視化し、肺動脈における微小血管血流変化と血管内皮細胞障害の機序を解明することが可能となると考えた。

2. 研究の目的

炎症性肺高血圧症であるモノクロタリン誘導肺高血圧ラットモデルラットを作製し、高感度放射光微小血管撮影法をもちいて肺動脈造影を行い、得られた画像から微小肺動脈の形態変化を解析する。また、肺動脈における血管内皮細胞障害の機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)モノクロタリン誘導肺高血圧モデル作成

モノクロタリン (Wako Chemical, Osaka, Japan) 60 mg/kg を 4 週 Sprague-Dawley 雄ラットに皮下注射し、モノクロタリン誘発性肺高血圧症モデルを作成した。モノクロタリン投与 2 週間後に全身麻酔下に Vevo[®]2100 (VisualSonics Inc. Canada) を用いてラット心エコーをおこない、心機能 (EF, LVDd, LVDs, PWT, IVS) や右心負荷の有無と肺高血圧症の評価 (pulmonary acceleration time, pulmonary ejection time、主肺動脈における肺動脈流速) を行った。

(2)高感度放射光微小血管撮影

高エネルギー加速器研究機構放射光研究施設において、6.5GeV の高エネルギー電子シンクロトロンから分離される放射光をシリコンクリスタルに反射させることにより、単色 X 線に変換する。肺動脈造影は、この放射光由来 X 線源を用いて、全身麻酔下にラット右外頸静脈から上大静脈に 24G 静脈内留置針を留置し、非イオン性造影剤を注入して行った。さらに高解像、高コントラスト画像を得るために、NHK 放送技術研究所と協力し、超高感度 HARP 受像管とハイビジョンシステムを用いて高感度放射光微小血管撮影を行った。

(Fig1)

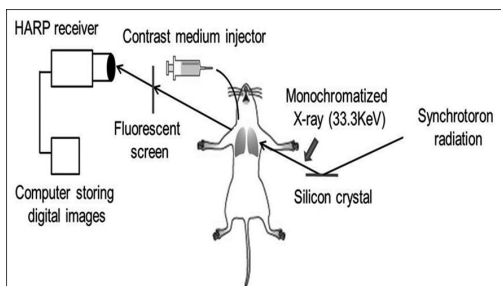


Figure 1 放射光微小肺血管撮像システム

(3)肺動脈微小血管血流画像解析

得られた肺細動脈血流動画における末梢肺動脈の血管径の経時的变化を追跡し、微小肺血管リモデリングの可視化を行った。

(4)モノクロタリン誘導肺高血圧症の組織学および血管内皮細胞障害解析

肺動脈造影後の肺高血圧ラットの肺を摘出し組織染色を行い肺細動脈組織の構造変化を評価した。さらに、エンドセリン-1の発現の増加および eNOS (endothelial NO synthase; 内皮型一酸化窒素合成酵素)などの内皮細胞障害マーカーの肺組織内での発現を、免疫組織染色を用いて評価した。

4. 研究成果

(1)モノクロタリン誘導肺高血圧モデル

心エコーで測定した主肺動脈の最大血流速度は、モノクロタリン誘導肺高血圧ラット群においては 1237.6 ± 77.3 mm/sec、コントロール群では 1827.9 ± 80.3 mm/sec であり、モノクロタリン誘導肺高血圧ラット群で有意な血流速度の増加を認めた。(Fig.2)

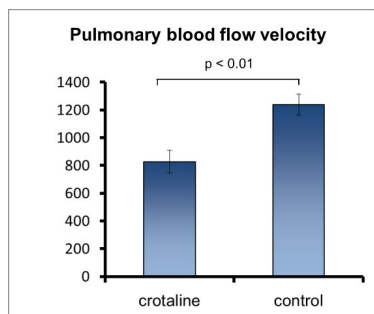


Figure 2 心エコーで測定したモノクロタリン誘導肺高血圧ラットにおける肺血流速度

これより、モノクロタリン誘導肺高血圧ラット群においては主肺動脈における肺血流速

度が減少しており、高い肺血管抵抗により微小肺細動脈に shear stress のかかる状態となっていることが推察された。

(2)肺動脈微小血管血流画像撮影と解析

高エネルギー加速器研究機構において、高感度放射光微小血管撮影法を肺動脈造影に応用し、約 $100 \mu\text{m}$ までの肺細動脈の撮影を可能とした。(Fig.3)

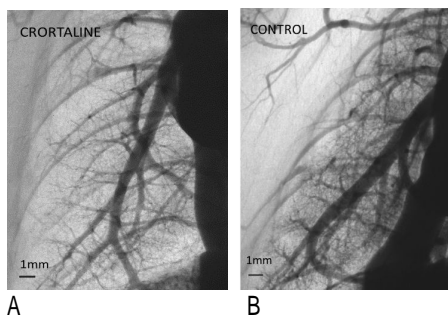


Figure 3 放射光微小肺血管撮像

A; モノクロタリン誘導肺高血圧ラット
B: コントロール

(3)モノクロタリン誘導肺高血圧症の組織学および血管内皮細胞障害解析

モノクロタリン誘導肺高血圧ラット群ではコントロール群に比べ有意な壁肥厚を認めた (0.68 ± 0.08 vs. 0.56 ± 0.07 , $p < 0.05$)。免疫組織染色評価は4段階半定量法を用いて行った。モノクロタリン誘導肺高血圧ラット群はコントロール群に比べ ET-1 の有意な発現の増加を認めた (ET-1: 1.53 ± 0.45 vs. 0.80 ± 0.14 , $p < 0.05$)。eNOS の発現はモノクロタリン誘導肺高血圧ラット群でコントロール群に比べ有意な発現の減少を認めた (1.12 ± 0.59 vs. 1.91 ± 0.66 , $p < 0.05$)。一方 VEGF の発現には有意差を認めなかった。(Fig.4)

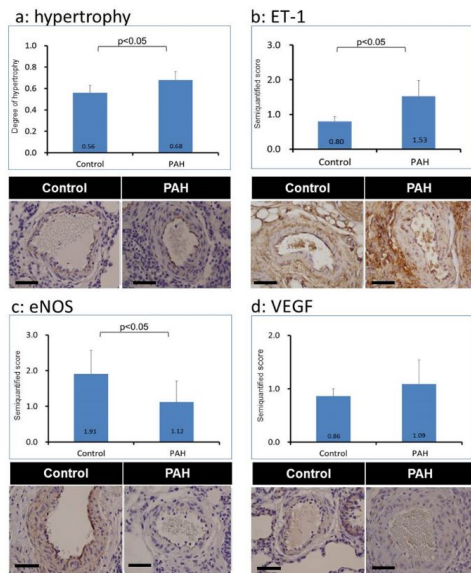


Figure 4 組織学的および免疫組織学的解析結果

a, 微小肺動脈血管壁肥厚 b, ET-1 発現
c, eNOS 発現 d, VEGF 発現

これらの結果より、放射光微小肺血管撮影によって可視化されたモノクロタリン誘導肺高血圧症における微小肺動脈リモデリング所見と組織学的な微小肺動脈血管壁肥厚所見が合致することが明らかとなった。また免疫組織学的解析により、微小肺血管撮影によって可視化されたモノクロタリン誘導肺高血圧症における微小血管狭小化の所見は、ET-1 を介した肺動脈リモデリングの進行による血管壁の肥厚と、NO の発現低下による血管攣縮によ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)

- Miya K, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Sakamoto H, Mizutani T, Hiramatsu Y: Renal contrast microangiography with synchrotron radiation: a novel method for visualizing structures within nephrons in vivo. Acta

Radiologica. Vol 58, 505-510. 2017 doi: 10.1177/0284185116658685, 査読あり

- Tokunaga C, Tsukada T, Sakamoto H, Naruse Y, Yoshida K, Sekiguchi Y, Imai A, Aonuma K, Hiramatsu Y: Intractable Electrical Storm After Coronary Artery Bypass Grafting Originating in Abnormal Purkinje Fibers. Journal of Cardiac Surgery. Vol. 31,74-77, 2016
doi: 10.1111/jocs.12670, 査読あり
- Fuji S, Matsushita S, Hyodo K, Osaka M, Sakamoto H, Tanioka K, Miyakawa K, Kubota M, Hiramatsu Y, Tokunaga C: Association between endothelial function and micro-vascular remodeling measured by synchrotron radiation pulmonary micro-angiography in pulmonary arterial hypertension. Geneneral Thoracic and Cardiovascular Surgery. Vol 64, 597-603, 2016
doi: 10.1007/s11748-016-0684-6, 査読あり
- Sakamoto H, Tokunaga C, Hiramatsu Y: Intramyocardial lipoma. Journal of Cardiac Surgery. Vol 31, 689, 2016
doi: 10.1111/jocs.12854, 査読あり

[学会発表](計 3 件)

- Tokunaga C, Fujii S, Matsushita S, Hyodo K, Sakamoto H, Matsubara M, Aikawa S, Enomoto Y, Sato F, Hiramatsu Y: Association between endothelial function and micro-vascular remodeling measured by synchrotron radiation pulmonary micro-angiography in pulmonary arterial hypertension. European society of cardiology ESC congress 2015. (London, United Kingdom) 2015.9.1
- 藤井聡子、松下昌之助、徳永千穂、坂

本裕昭、榎本佳治、金本真也、平松祐司、榎原謙:放射光肺動脈造影による実験的肺高血圧細動脈変化の免疫組織化学的検討 第67回日本胸部外科学会総会(福岡県福岡市、福岡国際会議場) 2014.10.3

3. Tokunaga C, Matsushita S, Hyodo K, Sakamoto H, Hiramatsu Y, Sakakibara Y: Synchrotron radiation pulmonary micro-angiography to visualize pulmonary micro-vasculature in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension rats. European society of cardiology ESC congress 2014. (Barcelona, Spain) 2014.8.31

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

徳永 千穂 (TOKUNAGA CHIHO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30451701

(2) 研究分担者

松下昌之助 (MATSUSHITA SYONOSUKE)
筑波技術大学・保健科学部・教授
研究者番号：70359579

坂本裕昭 (SAKAMOTO HIROAKI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30611115

酒井 俊 (SAKAI SATOSHI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30282362

宮内 卓 (MIYAUCHI TAKASHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60222329

兵頭 一行 (HYODO KAZUYUKI)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・准教授
研究者番号：60201729

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()