

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462357

研究課題名(和文)肺高血圧におけるスーパーオキシドの役割とキサンチンオキシダーゼ阻害による治療

研究課題名(英文)Role of superoxide in pulmonary hypertension and treatment with xanthine oxidase inhibition

研究代表者

横地 歩 (Yokochi, Ayumu)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60359768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：スーパーオキシドは、肺高血圧血管病変に関与している。我々は、肺高血圧の病態において、ある悪循環が存在するとの仮説を設けた。スーパーオキシドがNOと反応し、ペルオキシナイトライトが発生。その結果、uncoupled NOSが増加し、さらにスーパーオキシドの産生が高まるという悪循環である。

スーパーオキシド産生を抑制する方法として、キサンチンオキシダーゼ阻害作用をもつフェブキソスタットを用い、2つの確立されたラット肺高血圧モデルの肺高血圧発症過程に投与し、その効果を検討した。結果、両モデルのいずれの評価項目でも、有意な発症抑制効果を認めなかった。上記仮説は、正しくない可能性が推察される。

研究成果の概要(英文)：Febuxostat, being a novel xanthine oxidase inhibitor, is apparently having a beneficial role in improving the endothelial dysfunction. The purpose of the present study was to investigate whether febuxostat (FBS) prevents the development of pulmonary hypertension (PH) in both monocrotaline (MCT)-injected rats and in rats exposed to chronic hypobaric hypoxia (CH)(380 mm Hg, 10% oxygen).

The mean pulmonary artery pressure (mPAP), right ventricular hypertrophy (RVH), percentages of muscularized peripheral arteries (%muscularization), and medial wall thickness of small muscular arteries (%MWT) were measured. MCT increased mPAP, RVH, %muscularization, and %MWT. CH increased mPAP, RVH, %muscularization, and %MWT. FBS treatment did not significantly reduced mPAP, RVH, %muscularization, and %MWT in both MCT-injected rats and in rats exposed to CH. FBS does not appear to prevent the development of pulmonary hypertension (PH) in both MCT-injected rats and in rats exposed to CH.

研究分野：医学

キーワード：肺高血圧 スーパーオキシド キサンチンオキシダーゼ フェブキソスタット

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺高血圧をきたす疾患では、肺動脈血管での血管平滑筋の新生・肥大・増殖(肺高血圧血管病変)が発生する(1-2)。培養細胞レベルでは、スーパーオキシドがこの増殖を促進する。一方、一酸化窒素(NO)は肺高血圧血管病変の発生を抑制するが、NO合成酵素(NOS)の発現を高めても必ずしも肺高血圧血管病変の発生を抑制できない(2-5)。

(2) NOSは、2分子からなるmonodimer(coupled NOS)であるが、1分子のmonomer(uncoupled NOS)になるとNOではなく、スーパーオキシドを産生する。

(3) キサンチンオキシダーゼは、スーパーオキシドの産生源である。キサンチンオキシダーゼ阻害剤の投与は、スーパーオキシド産生を抑制する方法の一つとなる(5)。

## 2. 研究の目的

(1) スーパーオキシドがNOと反応すると、ペルオキシナイトライトが発生し、その結果、uncoupled NOSが増加し(6)、さらにスーパーオキシドの産生が高まると考えられる。その結果、増えたスーパーオキシドが、NOと反応し、さらにペルオキシナイトライトが発生し、uncoupled NOSがより増加し、スーパーオキシドの産生が、高まるという悪循環が成立するかもしれない。我々は、肺高血圧の病態において、この悪循環が存在するとの、仮説を設けた。

(2) この仮説が妥当なら、肺高血圧モデルの肺高血圧発症過程において、スーパーオキシドの産生を抑制する操作をおこなえば、肺高血圧発症が抑制されるはずである。

(3) 当研究の目的は、キサンチンオキシダーゼ阻害剤であるフェブキソスタット(FBS)

投与による肺高血圧発症抑制作用を検討することである。キサンチンオキシダーゼの肺高血圧発症への寄与の有無を明らかにするとともに、上記仮説の妥当性も、いくぶん検討できると考えた。

肺高血圧を、スーパーオキシドの産生亢進状態(前記の悪循環が存在)として捉えるのが、本研究の特色である。

## 3. 研究の方法

(1) 動物モデルとして、モノクロタリン(MCT60mg/kg皮下注)誘起肺高血圧ラット(60mg/kg)(4,8)と、低酸素暴露肺高血圧ラット(1/2気圧×14日間)(9-10)を用いた。それぞれ、6週齢のSDラットを4群にわけた；すなわち、正常ラットにV(Vehicle:カルボキシメチルセルロース)\*投与群、正常ラットにFBS\*(5mg/kg/日)投与群、MCTラットにV\*投与群、MCTラットにFBS\*(5mg/kg/日)投与群；正常ラットにV投与群、低酸素ラットにV投与群、低酸素ラットにFBS(3mg/kg/日)投与群、低酸素ラットにFBS(10mg/kg/日)投与群、の各群である。( \* ; MCT皮下注1日前から23日間、毎日1回、経口投与。)( ; 低酸素暴露1日前から16日間、毎日1回、経口投与。)

(2) MCTラットで投与21日後、低酸素暴露ラットでは14日後に、全身麻酔下で動脈と肺動脈にカテーテルを挿入し、24時間後に完全覚醒下で、動脈圧(mAP)、肺動脈圧(mPAP)を測定した。

(3) 全身麻酔下で脱血後、心肺を一塊として摘出。肺動脈より70mmHgの圧力でバリウムゼラチンを注入し、気管側からは35cmH<sub>2</sub>Oの圧力で10%ホルマリンを注入した。72時間の固定を行い、肺組織切片を作成する。肺組織切片では、本来血管平滑筋を持たない末梢肺動脈での筋性血管の出現率(Musc)及び、

血管平滑筋を持つレベルの肺動脈での中膜肥厚 (MWT) の変化を算出した。心臓については、右心室肥大の指標として、{ 右室 / ( 中隔 + 左室 ) } の重量比を測定・算出した。(1-2)

#### 4 . 研究成果

( 1 ) モノクロタリン誘起肺高血圧ラット : 肺動脈圧(mmHg)(n)、 19.8±0.9(7)、 20.5±0.6(8)、 30.3±1.5(7)、 30.5±2.4(7)。右心室肥大(重量比)、 0.26±0.01(8)、 0.25±0.01(9)、 0.34±0.01(10)、 0.32±0.01(11)。Musc(15~100 μm)(%) (n)、 1.5±0.6(8)、 3.2±1.2(9)、 35.4±4.5(10)、 41.1±5.0(11)。MWT(101~200 μm)(%) (n)、 1.7±0.3(8)、 2.8±0.5(9)、 4.2±0.3(10)、 3.4±0.1 (11)。MWT(51~100 μm) (%) (n)、 1.0±0.8(8)、 1.2±0.7(9)、 5.1±0.6(10)、 4.3±0.2(11)。どの測定項目もモノクロタリン皮下注によって、有意に上昇したが、これら変化を、FBS 投与は抑制しなかった。FBS による肺高血圧発症抑制効果は認められなかった。

( 2 ) 低酸素暴露肺高血圧ラット : 肺動脈圧(mmHg)及び、右心室肥大(重量比)について、  
、  
、  
の3群間に有意差を見いだせなかった。Musc(%), MWT(%)においても、同様であった: Musc(%) (n)、 1.4±0.5(7)、 69.2±5.9(8)、 61.8±3.2(7)、 67.1±1.4 (5)。MWT(101~200 μm)(%) (n)、 1.9±0.3(7)、 4.9±0.5(8)、 4.3±0.1(7)、 4.6±0.4 (5)。MWT(51~100 μm) (%) (n)、 0.2±0.2(7)、 6.6±0.3(8)、 6.6±0.1(7)、 7.1±0.3(5)。どの測定項目も低酸素暴露によって、有意に上昇したが、これら変化を、FBS 投与は抑制しなかった。FBS による肺高血圧発症抑制効果は認められなかった。

( 3 ) NO は、様々な細胞において、NOS により産生され、それぞれ、重要な役割を演じて

いることが分かってきている。また、様々な病的状況下において、これら NOS が、様々なオキシダントを産生する。例えば、キサンチンオキシダーゼにより産生されるスーパーオキシドは、肺高血圧の病状に寄与していることが報告されている。(6)

今回の結果では、FBS は、2種類の肺高血圧モデルにおいて、肺高血圧発症を抑制しなかった。今回の我々の条件では、キサンチンオキシダーゼの肺高血圧発症への寄与は、証明できなかった。

ただ、全く寄与しないと証明できたわけでもない。結果の解釈には慎重を要する。なぜなら、オキシダントに関する系は複雑系であるからだ。今回の結果のみで、キサンチンオキシダーゼの肺高血圧発症への寄与が無いとの断言はできない。

複雑系であることを考えると、例えば、複数のアプローチの併用の方が、肺高血圧発症抑制効果を得るためには、有利かもしれない。

#### < 引用文献 >

Maruyama J, etc. Continuous low-dose NO inhalation does not prevent monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol.* 1997 Jan;272(1 Pt 2):H517-24.

Mitani Y, etc. Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. *Circulation.* 1997 Jul 15;96(2):689-97.

Mitani Y, etc. Atrial natriuretic peptide gene transfection with a novel envelope vector system ameliorates pulmonary hypertension in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Jul;136(1):142-9.

Zhang E, etc. Effect of all-trans-retinoic acid on the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circ J*. 2010 Aug;74(8):1696-703. Epub 2010 Jul 1.

Maruyama J, etc. Prolonged nitric oxide inhalation during recovery from chronic hypoxia does not decrease nitric oxide-dependent relaxation in pulmonary arteries. *Chest*. 2004 Dec;126(6):1919-25.

Jankov RP, etc. Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Feb;294(2):L233-45. Epub 2007 Dec 14.

Zou MH, etc. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(6):817-26.

Ilkiw R, etc. SC-39026, a serine elastase inhibitor, prevents muscularization of peripheral arteries, suggesting a mechanism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circ Res*. 1989 Apr;64(4):814-25.

Maruyama J, Maruyama K. Impaired nitric oxide-dependent responses and their recovery in hypertensive pulmonary arteries of rats. *Am J Physiol*.

1994 Jun;266(6 Pt 2):H2476-88.

Yokochi A, Itoh H, Maruyama J, Zhang E, Jiang B, Mitani Y, Hamada C, Maruyama K. Colforsin-induced vasodilation in chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Anesth*. 2010 Jun;24(3):432-40.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Sasagawa S, Nishimura Y, Sawada H, Zhang E, Okabe S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Mitani Y, Maruyama K, Tanaka T. Comparative Transcriptome Analysis Identifies CCDC80 as a Novel Gene Associated with Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Pharmacol*. 2016 Jun 7;7:142. (査読あり)

Zhang E, Maruyama J, Yokochi A, Mitani Y, Sawada H, Nishikawa M, Ma N, Maruyama K. Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin 5HT2A receptor antagonist, ameliorates the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Anesth*. 2015 Oct;29(5):715-23 (査読あり)

Shinohara T, Sawada H, Otsuki S, Yodoya N, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Saitoh S, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats: early intervention in overcoming the survivin-mediated resistance to apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Mar 15;308(6):L523-38 (査読あり)

Otsuki S, Sawada H, Yodoya N, Shinohara T, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Potential contribution of phenotypically modulated smooth muscle cells and related inflammation in the development of experimental obstructive pulmonary vasculopathy in rats. *PLoS One*. 2015 Feb 25;10(2):e0118655. (査読あり)

Iwashita Y, Zhang E, Maruyama J, Yokochi A, Yamada Y, Sawada H, Mitani Y, Imai H, Suzuki K, Maruyama K. Thrombomodulin protects against lung damage created by high level of oxygen with large tidal volume mechanical ventilation in rats. *J Intensive Care*. 2014 Oct 1;2(1):57. (査読あり)

[学会発表](計5件)

澤田博文、張 尔泉、横地 歩、丸山一男 Impact of pulmonary arterial hypertension target therapy on the treatment of Persisted Pulmonary Hypertension of Newborn associated with Congenital Diaphragm Hernia 日本小児麻酔学会 2014年8月29-30日 東京国際交流館 プラザ平成(東京都・江東区)

大槻祥一郎、澤田博文、張 尔泉、新保秀人、丸山一男、三谷義英、他。肺動脈性肺高血圧の進行における炎症の関与：ヒト肺動脈性肺高血圧類似ラットモデルを用いた検討(第2報)。日本小児循環器学会 2015年7月16-18日 ホテル日航東京(東京都・港区)

張 尔泉、澤田博文、横地 歩、丸山一男、他。モノクロタリン誘起肺高血圧症に対するフェブキソスタットによる発症抑制効

果。日本麻酔科学会 2016年5月26-28日 マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

澤田博文、張 尔泉、横地 歩、丸山一男 Liver Transplantation for Congenital Extrahepatic Portocaval Shunt after Upfront Triple Combination Therapy for Severe Pulmonary Arterial Hypertension 日本小児麻酔学会 2016年10月9日 新横浜国際ホテル(神奈川県・横浜市)

張 尔泉、他。慢性低酸素誘起肺高血圧症に対するアロプリノールによる発症抑制。日本麻酔科学会 2017年6月9日 ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横地 歩 (YOKOCHI, Ayumu)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号： 60359768

### (2) 研究分担者

丸山 一男 (MARUYAMA, Kazuo)  
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号： 20181828

澤田 博文 (SAWADA, Hirofumi)  
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  
研究者番号： 30362354

張 尔泉 (ZHANG, Erquan)  
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  
研究者番号： 30456727

### (3) 研究協力者

丸山 淳子 (MARUYAMA, Junko)