

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09687

研究課題名(和文)慢性肺疾患合併肺高血圧症に対する肺胞増殖を介した新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapy for chronic lung disease associated pulmonary arterial hypertension via proliferation of pulmonary alveoli.

研究代表者

加藤 太一 (KATO, TAICHI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20422777

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)：本研究はラット新生仔に対する高酸素負荷慢性肺疾患モデルを用いて、EGFが肺胞増殖を促進するのか、さらにEGFによる肺胞増殖が肺高血圧治療に有効かを検証することを目的として行った。慢性肺疾患合併肺高血圧モデルの確立のため、ラット新生仔に対する高酸素負荷期間を検討し、14日間で肺胞構造の異常に加え、右室圧の著明な上昇と肺血管病変を確認した。EGF投与は肺高血圧病変及び肺胞構造をやや改善したが、有意ではなく、高酸素負荷で減少したBMP2、FGFR1、MMP14の発現もEGFによる有意な増強は認めなかった。EGF単独治療では慢性肺疾患合併肺高血圧症の十分な改善は得られにくいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied whether EGF promoted the proliferation of pulmonary alveoli and improved pulmonary hypertension using hyperoxia induced chronic lung disease rat neonate model. The time course study on the duration of hyperoxia revealed that compared to control rats, systolic right ventricular pressure (RVP) and the percentage of muscularized pulmonary vessels increased significantly in the rats after 14 days of hyperoxia challenge. Daily administration of EGF slightly decreased RVP and the percentage of muscularized pulmonary vessels and slightly improved the structure of pulmonary alveoli. Furthermore, hyperoxia decreased the expression of BMP2, FGFR1 and MMP14 in the lung, which was not restored by EGF. These results showed chronic hyperoxia for 14 days caused chronic lung disease associated pulmonary hypertension in rat neonates. EGF administration showed only slight improvement of pulmonary hypertension and the structure of pulmonary alveoli in this model.

研究分野：小児循環器学

キーワード：肺高血圧症 慢性肺疾患 EGF

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性肺疾患は肺胞数減少を伴う肺胞構造異常と肺血管の異常を伴う疾患であり、合併する肺高血圧症は生命予後にも重要な影響を与えるが、これまでに確立された治療法はない。

(2) 一方で、特発性肺動脈性肺高血圧症では有効性が証明された薬剤は複数あるが、これまで成人領域も含め、呼吸器に関連する肺高血圧症に対して、有効性が証明された薬剤はなく、肺疾患合併肺高血圧症に対しては新しい治療戦略が必要である。

(3) 慢性肺疾患では、肺胞数の減少などの異常な肺胞構造、線維化、血管の異常、炎症などが複雑に重なった病理像を呈する。肺血管の成長阻害による肺血管密度の減少は肺血管抵抗の上昇から肺高血圧症に関与する。

(4) マウスの片側肺切除モデルにおいて、VEGFR2 および、FGFR1 の活性化を受けた肺胞上皮近傍の内皮細胞が、MMP14 による EGFR の刺激を介して、肺胞上皮細胞の増殖を促し、肺胞の再生、増殖を起こす報告がなされている (Ding et al. Cell 2011)。この研究では EGF の投与が肺胞増殖を起こすことが報告されている。しかしながら、EGF 投与による肺胞の増殖が肺高血圧の改善につながるかは分かっていない。また、慢性肺疾患モデルにおいて同じ機序で肺胞増殖が得られるかについても不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究においてはラット新生仔に対する高酸素負荷慢性肺疾患モデルを用いて、EGF が肺胞増殖を促進するのか、さらに EGF による肺胞増殖が肺高血圧治療に有効かを検証することを目的とした。

(2) また、肺組織において、EGF 投与によって片側肺切除モデルで肺胞の再生・増殖に関与が報告されている分子の発現を検討し、これらの分子の発現の修飾を介して、肺胞増殖並びに肺高血圧の改善に関与しているかを検討することも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 慢性肺疾患モデルであるラット新生仔に対する高酸素負荷慢性肺疾患モデルを高酸素負荷チャンバーにより作成した。

慢性肺疾患モデルとしてはこのモデルは確立されているが、実際にこれまで肺動脈圧あるいは右室圧を測定した報告がないため、慢性肺疾患合併肺高血圧モデルとして適切かは分かっていなかった。そこで、慢性肺疾患合併肺高血圧症モデルの確立のために、最適な高酸素負荷期間を検討した。通常酸素下で飼育したコントロールラット群(以下C群)と高酸素負荷群(以下H群)について7,14,21

日の飼育期間にて後述するような肺血管病変を始めとする肺の morphometry、右室肥大の評価を行った。肺胞構造などの検討のための肺検体は、一定の圧で気管より固定液を注入して固定を行った。

(2) 14、21 日間の高酸素負荷ラットについては、エコー下で肋弓下より、マノメーターに接続された針を直接右室に穿刺することで右室圧測定を行った。続いて、肺血管病変評価用の試料を得るために、ラットを気管切開した上で、小動物用人工呼吸器にて人工換気下に開胸し、右室前壁より肺動脈内にカテーテルを挿入固定した。その上で、固定したカテーテルよりリン酸緩衝生理食塩水にて還流を行った上で 4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。

(3) 肺血管病変の評価として、ヘマトキシリンエオジン染色、エラスチカワンギーソン染色、抗アルファアクチン抗体による免疫染色を行い、肺血管の形態、中膜の筋性化の程度および血管密度を 2 群間で比較した。エラスチカワンギーソン染色にて内弾性板と外弾性板に囲まれた中膜が、50-200 μm の径の肺血管において、周の何%に存在するかを評価した。また、抗アルファアクチン抗体による免疫染色でも同様の血管において血管周長の何%が陽性かを評価した。筋性化の程度の評価にあたっては、周長に対して 25%未満を筋性化なし、25-75%を部分的筋性化、75%以上を筋性化血管と判定し、全体の血管本数に対する部分的筋性化および筋性化血管の本数の合計の割合を筋性化率として比較した。血管密度については肺胞 100 個あたりの血管本数を 20 視野において計測し、比較した。

(4) これらの検討から結果で詳述するように最適と思われた高酸素負荷 14 日のラットにおいて、EGF を高酸素負荷中 14 日間連日腹腔内投与した EGF 治療群を作成した。生理食塩水を同期間投与した慢性肺疾患モデルラット群(以下 EGF 非治療群)あるいは高酸素負荷をせず、生理食塩水を同期間投与した群(以下コントロール群)の 3 群を作成し、同様の方法で、検体を得たうえで、肺胞数を含めた morphometry と肺高血圧、右室肥大の評価を行い、効果を確認した。

(5) EGF 治療群を含めた 3 群において、肺組織より RNA を抽出し、*BMP2*、*FGFR1*、*MMP14* についてリアルタイム PCR にて発現量を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 肺高血圧評価に最適な高酸素負荷期間を検討した。7 日間は圧測定がラットの体格から困難であり、肺病変と右室肥大の評価のみを行った。H 群では C 群と比較して、わず

かに右室肥大、肺血管の筋性化率上昇の傾向が認められたが有意差は認められなかった。肺高血圧病変で認められることが多い炎症細胞浸潤についてもマクロファージの染色を行ったが、H群でややC群よりも血管周囲マクロファージが多い傾向があったが、有意差は得られなかった。

(2) 続いて、14日間高酸素負荷モデルにおいては、右室圧を経皮的に穿刺して測定し、H群ではC群と比較して、右室圧上昇(図1)と右室肥大を有意に認めた。

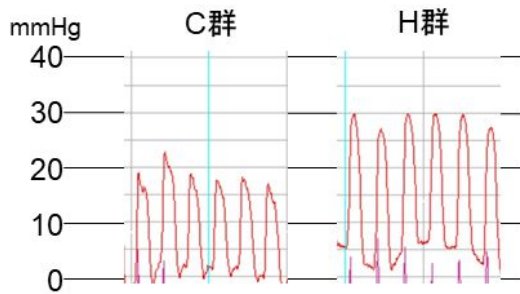


図1. 高酸素 14 日間負荷モデルにおける C 群と H 群の右室圧

また、肺血管の筋性化率は H 群で有意に高かった(図2)。肺胞構造も H 群では C 群に比べて、肺胞系が大きく、単位面積当たりの肺胞数は減少しており、これらは有意差を認めた。

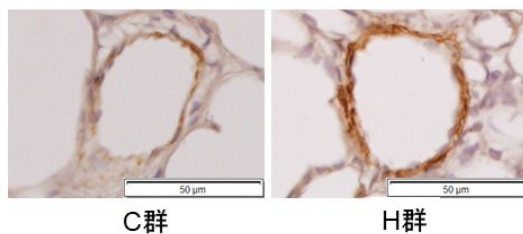


図2. 高酸素 14 日間負荷モデルにおける C 群と H 群の中膜肥厚(アルファアクチンの免疫染色。Scale bar=50 μm)

一方で、高酸素 21 日間負荷モデルは死亡率が高く、モデルには不適と判断した。

(3) これらの検討から高酸素負荷 14 日のラットにおいて、EGF 治療群、EGF 非治療群、コントロール群の 3 群を作成したが、EGF 治療群は EGF 非治療群に比べて右室圧の低下は見られ、右室肥大、肺血管の筋性化率もそれぞれ改善していたが、有意差は得られなかった。また、肺胞構造についての検討においても、EGF 治療群は EGF 非治療群に比べて肺胞数、肺胞径いずれにおいても、肺胞構造の有意な改善は認められなかった。

(4) EGF 治療群を含めた 3 群において、肺組織における遺伝子発現をリアルタイム PCR

にて比較した。多くの肺高血圧モデルで低下し、ヒトの特異性肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子でもある *BMPR2* はコントロール群に比べて EGF 非治療群で有意に低下していたが、EGF 治療による改善は認められたものの有意差はなかった(図 3a)。また、EGF 投与によって片側肺切除モデルで肺胞の再生・増殖に関与が報告されている *FGFR1*、*MMP14* についても検討したが、どちらもコントロール群に対して、EGF 非治療群で有意に低下したが、*FGFR1* については EGF 投与で改善は見られたが、有意差はなく、*MMP14* においては EGF 投与による改善は認められなかった(図 3b,c)。

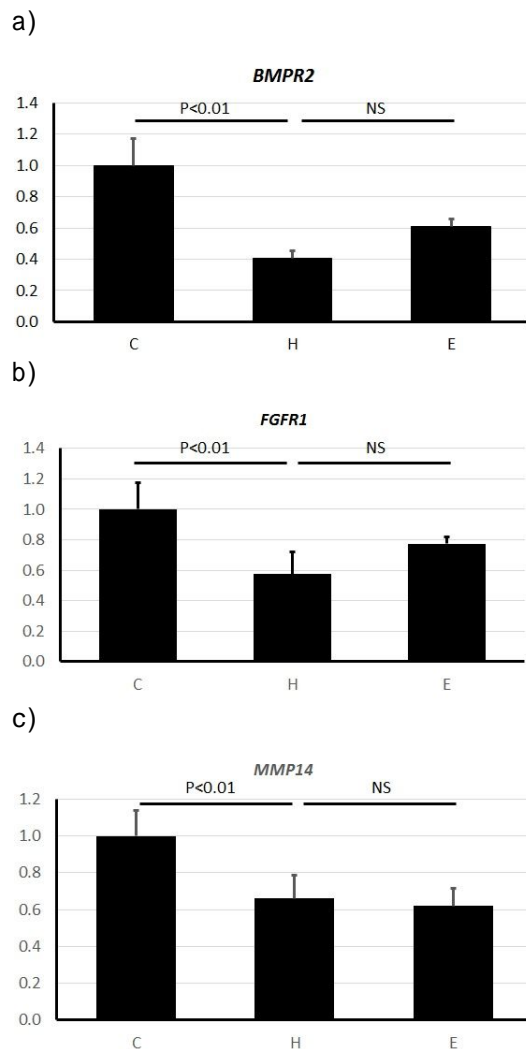


図3. a) *BMPR2* b) *FGFR1* c) *MMP14* の肺における RNA 発現。縦軸は fold increase. C: コントロール群、H: EGF 非治療群、E: EGF 治療群

以上の結果より、高酸素負荷 14 日間によるラット新生仔慢性肺疾患モデルは、肺高血圧症を惹起することが圧測定によっても確認され、組織所見より肺胞構造の異常と肺血管の筋性化率の上昇を始めとした肺および肺血管の異常も確認された。しかしながら、EGF 投与によって、肺胞構造の改善と肺高血

圧の改善も認められたものの、有意な改善ではなかった。これらのことから EGF 単独の治療では慢性肺疾患合併肺高血圧症の十分な改善は得られにくいことが示唆された。なお、肺高血圧モデルについてもさらに検討をし、生直後から 14 日間高酸素負荷をしたモデルをさらに 14 日間通常酸素下で飼育したところ、14 日間高酸素負荷モデルよりも有意に右室圧の上昇、著明な右室肥大を認めた。今後はこのモデルでの検討および、EGF と肺血管拡張薬との併用の効果についての更なる検討が必要と考えられる。

#### 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 5 件)

1. Miura M, Kobayashi T, Kaneko T, Ayusawa M, Fukazawa R, Fukushima N, Fuse S, Hamaoka K, Hirono K, Kato T, Mitani Y, Sato S, Shimoyama S, Shiono J, Suda K, Suzuki H, Maeda J, Waki K, and the Z-score Project 2nd Stage (ZSP2) Study Group, Japanese Society of Kawasaki Disease

Association of severity of coronary artery aneurysms in 1006 patients with Kawasaki disease and risk of later coronary events JAMA Pediatr (査読有) 2018; e180030. doi: 10.1001/jamapediatrics.2018.0030.

2. Kato K, Kato T, Hayano S, Fukasawa Y, Numaguchi A, Hattori T, Saito A, Sato Y, Hayakawa M.

Successful infant pneumonectomy with unilateral pulmonary artery occlusion test

Int Heart J. (査読有) 2018; 59(1): 237-239. doi: 10.1536/ihj.16-606.

3. 今井 祐喜, 加藤 太一, 加藤 有一, 久保田 哲夫, 服部 哲夫

先天性心疾患の手術非介入で経過している 18 トリソミーの検討

日小児循環器会誌 2017 (査読有); 33(4): 312-317.

doi:10.9794/jspccs.33.312

4. Kishimoto Y, Kato T, Ito M, Azuma Y, Fukasawa Y, Ohno K, Kojima S.

Hydrogen ameliorates pulmonary hypertension in rats by anti-inflammatory and anti-oxidant effects.

J Thorac Cardiovasc Surg. (査読有) 2015; 150(3): 645-654. e3.

doi: 10.1016/j.jtcvs.2015.05.052.

5. 永田佳敬, 加藤太一, 牧田智, 池田麻衣子, 深澤佳絵, 岸本泰明, 沼口敦, 長井典子

門脈体循環シャントによる肺高血圧症及び肺内シャントを合併した Noonan 症候群の 1 例

日小児循環器会誌 (査読有) 2015; 31(4): 212-219. doi: 10.9794/jspccs.31.212

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Kishimoto Y, Ito M, Azuma Y, Fukasawa Y, Kojima S, Ohno K, Kato T

Molecular hydrogen suppresses the development of pulmonary hypertension in rats by anti-inflammatory and antioxidant effects

The 8<sup>th</sup> TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease, 2017

2. 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 prevents intimal fibrosis of obstructive pulmonary vasculopathy in rats.

The 8<sup>th</sup> TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease, 2017.

3. 深澤 佳絵, 早野 聡, 沼口 敦, 高橋 義行, 加藤 太一

肺高血圧症 (PH) をきたし tadalafil で治療した造血幹細胞移植 (HSCT) 後の 3 例

第 53 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2017 年

4. 加藤太一, 深澤佳絵, 早野聡, 沼口敦, 伊藤美春, 齊藤明子, 佐藤義朗, 内田広夫, 早川昌弘

先天性横隔膜ヘルニア術後肺高血圧に対する治療内容の検討: 単剤療法と多剤併用療法

第 53 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2017 年

5. 加藤 太一, 深澤 佳絵, 早野 聡, 沼口 敦, 伊藤 美春, 齊藤 明子, 佐藤 義朗, 内田 広夫, 早川 昌弘

先天性横隔膜ヘルニア術後肺高血圧に対する肺血管拡張薬の効果と限界

第 52 回日本小児循環器学会 2016 年

6. 深澤 佳絵, 早野 聡, 沼口 敦, 伊藤 美春, 齊藤 明子, 近藤 大貴, 松沢 要, 佐藤 義朗, 早川 昌弘, 小谷 友美, 加藤 太一

MRI による先天性左横隔膜ヘルニアの遠隔期肺高血圧予測

第 52 回日本小児循環器学会 2016 年

7. 加藤 太一, 深澤 佳絵, 早野 聡, 沼口 敦, 岸本 泰明, 伊藤 美春, 齊藤 明子, 佐藤 義朗, 内田 広夫, 早川 昌弘

先天性横隔膜ヘルニア術後に遷延する肺高

血圧に対する治療経験  
第4回日本肺循環学会第3回日本肺高血圧学  
会合同学術集会 2015年

8. 加藤 太一、深澤 佳絵、早野 聡、沼口 敦、  
岸本 泰明、伊藤 美春、齋藤 明子、佐藤 義  
朗、内田 広夫、早川 昌弘  
先天性横隔膜ヘルニア術後肺高血圧に対す  
る内服治療の検討  
第51回日本小児循環器学会 2015年

〔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

加藤 太一 (KATO, TAICHI)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：20422777

### (2) 研究分担者

深澤 佳絵 (FUKASAWA, YOSHIE)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  
研究者番号：00612764

早野 聡 (HAYANO, SATOSHI)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：70747849

### (3) 連携研究者

佐藤 義朗 (SATO, YOSHIAKI)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30435862