

令和元年6月30日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05126

研究課題名(和文) 間歇的低酸素時の肺マクロファージ 3受容体による肺循環調節での肺交感神経の役割

研究課題名(英文) Role of pulmonary sympathetic nerves in the regulation of the pulmonary circulation by beta-receptors on pulmonary macrophages during chronic intermittent hypoxia

研究代表者

白井 幹康 (SHIRAI, Mikiyasu)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：70162758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性間歇的低酸素負荷小動物で肺高血圧症を認めるかどうかについて、一致した結論はない。本研究では、間歇的低酸素を6週間負荷したラットにおいて、肺高血圧症の進展を抑制する2つの交感神経性機構を明らかにした。一つは、間歇的低酸素で肺小動脈周囲に誘導される肺マクロファージの 3アドレナリン受容体を介したiNOS活性化・NO放出機構である。もう一つは、肺小動脈内皮に誘導される 2受容体機構である。これらの肺血管拡張性機構は、交感神経系の低酸素性活動亢進によって活性化され、肺局所機構で起こる低酸素性肺血管収縮を抑制する。低酸素性交感神経活動亢進の 受容体機構を介した新たな肺循環保護作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性間歇的低酸素負荷ラットで見出された肺マクロファージの 3アドレナリン受容体を介した肺高血圧症抑制機構は、肺循環の神経・免疫性調節という新たな概念を提唱し、肺高血圧症の治療・予防法開発に貢献するものと考えられる。

慢性間歇的低酸素は睡眠時無呼吸症候群の基本病態とされているが、この症候群の合併症である体循環の高血圧に対して、遮断薬も治療薬の選択肢となっている。本研究で明らかになった交感神経系を介した 受容体性肺血管拡張機構並びに肺高血圧症抑制機構は、今後の治療における 遮断薬の使用に対して重大な警鐘を鳴しており、睡眠時無呼吸症候群の予後改善に大いに役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：There are no consistent reports as to whether small animal models exposed to chronic intermittent hypoxia develop pulmonary arterial hypertension. This research revealed two sympathetic neural mechanisms that suppress the progression of pulmonary hypertension in rats exposed to six weeks of chronic intermittent hypoxia. The first is a mechanism that releases nitric oxide through activation of iNOS by 3-adrenergic receptors on macrophages recruited to the vicinity of small pulmonary arteries by intermittent hypoxia. The other involves 2-adrenergic receptors induced within the endothelium of small pulmonary arteries. These pulmonary dilatory mechanisms are activated by the accentuation of hypoxic sympathetic neural activity to inhibit the hypoxic vasoconstriction that occurs with the local mechanism in the lung. These findings suggest that pulmonary protection occurs through 3-adrenergic receptors via the accentuation of hypoxic sympathetic neural activity.

研究分野：循環生理学

キーワード：生理学 循環器・高血圧 肺高血圧 マクロファージ 肺交感神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性間歇的低酸素(IH)を負荷した小動物において、肺高血圧症(PH)が生じるかどうかについて、一致した結論はない。

(2) 私共は、IHを6週間負荷したラット(IHラット)では、血中カテコラミン濃度の慢性的な増大に伴い、単球由来マクロファージの肺腔内での増加と肺小動脈周囲への集簇、さらに同マクロファージに3アドレナリン受容体(AR)を介したiNOS活性化 NO放出機構が誘導されることを見出した。

(3) また、IHラットでは、急性低酸素(AH)負荷時、マクロファージ3AR NO放出機構の作動により肺小動脈が拡張し、肺小動脈の局所的機構で生じる低酸素性肺血管収縮(HPV)を強く抑制することを見出した。

(4) さらに、IHラットでは、常酸素を6週間負荷したラット(Nラット、対照)と比較して、AH負荷に対する肺交感神経電気活動応答が著明に亢進しており、この応答亢進は脳室内への選択的1AR遮断剤投与で完全に消失し、同時にIHラットの抑制されたHPV応答がNラットレベルまで回復することを見出した。つまり、AH負荷時のマクロファージ3AR NO放出機構の活性化に中枢1ARを介した交感神経系活動亢進が関与する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、以下の3つの課題を究明することであった。

**課題1:** 私共がIHラットで新たに見出した肺M1マクロファージ3AR/iNOSシグナルを介した肺血管拡張(HPV抑制)機構は、肺交感神経活動の増大で作動するのか?

**課題2:** IHによる肺への3AR高発現M1マクロファージの分化誘導に肺交感神経活動はどの程度関与するのか?

**課題3:** このM1マクロファージ3AR/iNOSシグナルによる肺血管拡張機構はIHによるPH発症に抑制的に働くのか?

研究過程で、以下の課題究明を目的に加えることにした。

**課題4:** IHラットにおいて、マクロファージ1及び2AR並びに肺小動脈の1、2及び3ARは、上記のHPV抑制機構及びPH発症抑制に関与するのか?

## 3. 研究の方法

**課題1**を明らかにするため、IHラットに肺交感神経の電気刺激を行って生じる肺血管拡張応答が、3AR遮断薬、iNOS遮断薬、およびclodronate気管支内投与によって減弱ないし消失するかどうかを放射光高解像度肺血管造影法で調べる。

**課題2**を明らかにするため、肺を切除した後に同所に移植する完全除神経モデルを用いて、IHによる肺への3AR高発現M1マクロファージの分化誘導が生じるかを調べる。

**課題3**を明らかにするため、IHあるいは常酸素の6週間負荷と並行して、3AR遮断薬SR59230Aの浸透圧ミニポンプ投与(0.6mg/day)あるいはマクロファージの慢性的消去(liposomal clodronate 15mg/kgを4日毎静注)を行い、PH、右室肥大、肺小動脈中膜肥厚の有無を調べる。

**課題4**を明らかにするため、放射光高解像度肺血管造影法を用いて、IHラットの急性低酸素性肺血管応答に対する選択的1AR遮断薬atenolol(水溶性で中枢作用は少ない)及び1、2の同時遮断薬nadolol(水溶性)の投与の効果を調べる。また、パラフィン固定肺あるいは組織用凍結肺からスライドを作成して免疫組織化学的検査を行う。さらに、肺胞洗浄法で回収したマクロファージにおいてWestern blot法で1、2、3ARの発現を調べる。また、回収マクロファージをRPMI buffer添加により24時間培養し、安定したところへ3AR刺激薬(CL316243)あるいは1、2AR刺激薬(isoproterenol)を100mMで加え、24時間から48時間でタイムコースをとって、buffer上清内に発生したNitriteの量を蛍光グリース法により測定する。これにより肺マクロファージに発現した各種ARを刺激し、NOが合成・放出されるかを評価する。最後に、課題3と同じ方法で、atenolol、nadololを6週間慢性持続投与し、PH、右室肥大、肺小動脈中膜肥厚の有無を調べる。

## 4. 研究成果

### 課題1の研究結果

星状神経節から分岐する神経束で、肺支配の特異性が高い神経束を分離・切除後、遠心端を電気刺激した。その結果、心臓交感神経活動亢進も同時に生じ、肺循環への影響が無視できないことが判明した。この方法では肺交感神経の選択的な刺激は得られないため、この課題研究の中止を決断した。

### 課題2の研究結果

肺移植による肺の完全除神経法を評価した結果、除神経は完全ではあるが、手術に伴う炎症反応による肺のマクロファージ発現の変化が長期に持続し、IH負荷による肺マクロファージ数の変化の計測が困難であることが判明した。そのため、この課題研究の中止を決断した。

以上の研究の中止により、肺M1マクロファージ3AR/iNOSシグナル活性化及び3AR高発現M1マクロファージの分化誘導に対する肺交感神経活動の特異的効果は証明できなかった。

### 課題3の研究結果

まず、IHラットとNラットにおいて、薬剤の並行投与を行わず、肺動脈圧の指標として右室収縮期圧(RVSP)を測定したところ、両ラット間で差はなかった。また、Fulton係数、右室重量/左室重量+中隔重量(R/L+S)も差はなく、IHラットで有意な右室肥大を認めなかった。次に、両ラットに

3AR遮断薬(SR)あるいはliposomal clodronate(Clo)の慢性投与を行った。その結果、IHラットにのみ、いずれの薬剤投与でもRVSP及びR/L+Sの有意な増加を認め、PHの進展が生じた(図1)。

しかし、PHを認めたラットの肺小動脈中膜肥厚度を測定したところ、中膜肥厚は生じていなかった。この結果から、

3ARの慢性遮断あるいはマクロファージの慢性的消去によって生じたPH及び右室肥大は主に肺小動脈の機能的収縮(HPV)によって惹起されたものであり、肺血管リモデリングの関与は無いが、あるいはあったとしても限定的と考えられた。

### 課題4の研究結果

肺胞洗浄法でM1マクロファージを回収後、Western blot法で1、2、3ARの発現を比べた。3AR発現は、私共の従来研究と同様に顕著に亢進していたが、1、2ARの発現は有意な変化を認めなかった。また、回収マクロファージに選択的3AR刺激薬CL316243を投与すると、私共の従来報告と同様にNO放出が増大したが、非選択的1、2AR刺激薬isoproterenolを投与すると、NO放出は減少した。他方、肺小動脈内皮の受容体を免疫組織化学染色で調べたところ、1、3ARの発現はIH負荷ラットで有意に減少していた。2ARの発現は有意ではないが増加傾向を示した。

放射光高解像度肺血管造影法を用いて、IH負荷ラットの急性低酸素応答に対する各種AR遮断剤を調べたところ、選択的

3AR遮断薬SR5920Aでは、私共の従来報告と同様、抑制されたHPVがNラットレベルまで回復した。選択的1AR遮断薬atenololは、抑制されたHPVに影響を与えなかった。

しかし、1、2ARの同時遮断薬nadololは、3AR遮断薬と同様、抑制されたHPVをNラットレベルまで回復させた。

以上の結果から、IH負荷ラットでは、M1マクロファージ

3AR NO放出によるHPV抑制機構以外に、肺小動脈内皮の2AR機構によるHPV抑制機構も備わっている可能性が示唆された。

IHあるいは常酸素の6週間負荷に並行して、atenolol、nadololを慢性持続投与した結果、atenololを慢性投与したIH及びNラットではPH及び右室肥大は生じなかったが、nadolol慢性投与ではIHラットでのみ生じることが分かった。しかし、nadolol慢性投与のIHラットに肺小動脈中膜肥厚度は見られなかった。この結果から、IHラットでは、肺(末梢)の2受容体の慢性的遮断でもPH及び右室肥大は起こること、また、このPHは3AR慢性遮断及びマクロファージ慢性的消去の場合と同様に、主に肺小動脈の機能的収縮(HPV)によって惹起されたものであることが示唆された。

以上の結果より、IHラットでは、低酸素環境に曝されると、M1マクロファージの3AR/iNOSシグナリング機構、並びに肺血管内皮の2AR機構の活性化により肺小動脈の拡張反応が起こるため、肺小動脈平滑筋の局所機構で生じるHPVが減弱し、PHの進展が抑制されることが示唆された。

#### <引用文献>

Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Ogura S, et al. Pulmonary Macrophages Attenuate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction via beta3AR/iNOS Pathway in Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. PLoS ONE. 2015;10(7):e0131923.

Shirai M, Tsuchimochi H, Nagai H, Gray E, Pearson JT, Sonobe T, et al. Pulmonary vascular tone is dependent on the central modulation of sympathetic nerve activity following chronic intermittent hypoxia. Basic Res Cardiol. 2014;109(5):432.

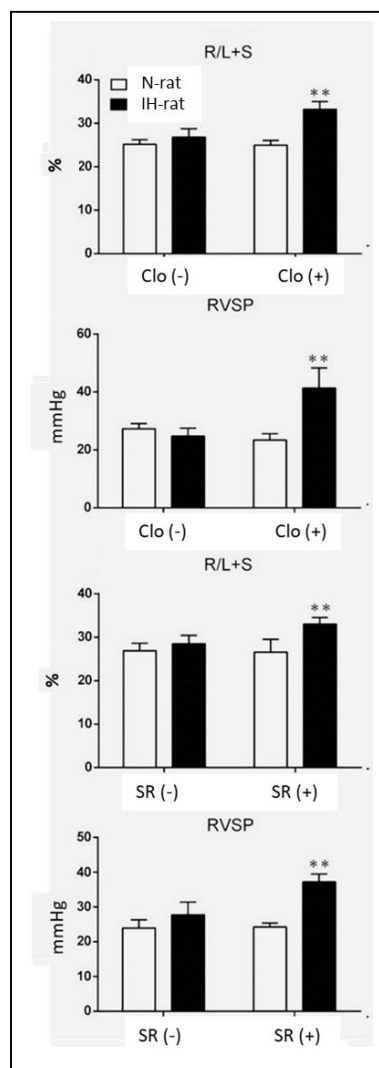


図1 3ARの慢性遮断および肺マクロファージの慢性消去はIHラットにPHを引き起こす

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

- Sukumaran V, Sonobe T, [Tsuchimoshi H](#), Tatsumi E, [Shirai M](#), [Pearson JT](#). Liraglutide treatment improves renal vascular function in Zucker rats as visualized by microangiography. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019 Mar 25 (In Press) (査読有)
- Park HS, Kim HZ, Park JS, Lee J, Lee SP, Kim H, Ahn CW, [Nakaoka Y](#), Koh GY, Kang S. Beta Cell-Derived Angiopoietin-1 Regulates Insulin Secretion and Glucose Homeostasis by Stabilizing Islet Microenvironment. *Diabetes*. 2019;68(4):774-786 (査読有)
- Katare, R., [Pearson JT](#), Lew JKS, Wei M, [Tsuchimochi H](#), Du CK, Zhan DY, Umetani K, [Shirai M](#), Schwenke DO. Progressive decrease in coronary vascular function associated with type 2 diabetic heart disease. *Front Physiol*. 2018;9:696 (査読有)
- Sukumaran V, [Tsuchimochi H](#), Fujii Y, Hosoda H, Kangawa K, Akiyama T, [Shirai M](#), Tatsumi E, [Pearson JT](#). Ghrelin Pre-treatment Attenuates Local Oxidative Stress and End Organ Damage During Cardiopulmonary Bypass in Anesthetized Rats. *Front Physiol*. 2018;9:196 (査読有)
- [Pearson JT](#), Collie N, Lamberts RR, Inagaki T, Yoshimoto M, Umetani K, Davis P, Wilkins G, Jones PP, [Shirai M](#), Schwenke DO. Ghrelin Preserves Ischemia-Induced Vasodilation of Male Rat Coronary Vessels Following  $\beta$ -Adrenergic Receptor Blockade. *Endocrinology*. 2018;159(4):1763-1773 (査読有)
- Kim KH, [Nakaoka Y](#), Augustin HG, Koh GY. Myocardial Angiopoietin-1 Controls Atrial Chamber Morphogenesis by Spatiotemporal Degradation of Cardiac Jelly. *Cell Rep*. 2018;23(8), 2455-2466 (査読有)
- Salybekov AA, [Kawaguchi AT](#), Masuda H, Vorateera K, Okada C, Asahara T. Regeneration-associated cells improve recovery from myocardial infarction through enhanced vasculogenesis, anti-inflammation, and cardiomyogenesis. *PLoS One*. 2018;13(11):e0203244 (査読有)
- [Pearson JT](#), Yoshimoto M, Chen YC, Sultani R, Edgley AJ, Nakaoka H, Nishida M, Umetani K, Waddingham MT, Jin HL, Zhang Y, Kelly DJ, Schwenke DO, Inagaki T, [Tsuchimochi H](#), Komuro I, Yamashita S, [Shirai M](#). Widespread Coronary Dysfunction in the Absence of HDL Receptor SR-B1 in an Ischemic Cardiomyopathy Mouse Model. *Sci Rep*. 2017;7(1):18108 (査読有)
- Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, [Tsuchimochi H](#), Sonobe T, Fujii Y, [Pearson JT](#), Saito A, Harada A, Toda K, [Shirai M](#), Sawa Y. Influence of coronary architecture on the variability in myocardial infarction induced by coronary ligation in rats. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183323 (査読有)
- Sukumaran V, [Tsuchimochi H](#), Tatsumi E, [Shirai M](#), [Pearson JT](#). Azilsartan ameliorates diabetic cardiomyopathy in young db/db mice through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/Mas receptor cascade. *Biochem Pharmacol*. 2017;144:90-99 (査読有)
- Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Inagaki T, Shishido T, [Shirai M](#), [Pearson JT](#). Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312(1):H60-H67 (査読有)
- Torii M, Fukui T, Inoue M, Kanao S, Umetani K, [Shirai M](#), Inagaki T, [Tsuchimochi H](#), [Pearson JT](#), Toi M. Analysis of the microvascular morphology and hemodynamics of breast cancer in mice using SPring-8 synchrotron radiation microangiography. *J Synchrotron Radiat*. 2017;24(Pt 5):1039-1047. (査読有)
- Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Morimoto S, Shimizu S, Kawada T, [Shirai M](#), [Pearson JT](#). Cardiac vagal control in a knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with a troponin mutation. *Auton Neurosci*. 2017;205:33-40. (査読有)
- Lang JA, [Pearson JT](#), Binder-Heschl C, Wallace MJ, Siew ML, Kitchen MJ, Te Pas AB, Lewis RA, Polglase GR, [Shirai M](#), Hooper SB. Vagal denervation inhibits the increase in pulmonary blood flow during partial lung aeration at birth. *J Physiol*. 2017;595(5):1593-1606 (査読有)
- Fujii Y, Tanabe T, Yamashiro T, [Shirai M](#), Takewa Y, Tatsumi E. Effect of Hydroxyethyl Starch Priming on the Systemic Inflammatory Response and Lung Edema after Cardiopulmonary Bypass in a Rat Model. *ASAIO J*. 2017;63(5):618-623 (査読有)
- Flemmer AW, Thio M, Wallace MJ, Lee K, Kitchen MJ, Kerr L, Roehr CC, Fouras A, Carnibella R, Jani JC, DeKoninck P, Te Pas AB, [Pearson JT](#), Hooper SB. Lung hypoplasia in newborn rabbits with a diaphragmatic hernia affects pulmonary ventilation but not perfusion. *Pediatr Res*. 2017;82(3):536-543 (査読有)
- Lew JK, [Pearson JT](#), Schwenke DO, Katare R. Exercise mediated protection of diabetic

heart through modulation of microRNA mediated molecular pathways. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16(1):10 (査読有)

Kawaguchi AT. Artificial Oxygen Carrier as Therapeutics Rather Than Blood Substitute for Transfusion. *Artif Organs.* 2017;41(4):312-315 (査読有)

Chen YC, Inagaki T, Fujii Y, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Edgley AJ, Umetani K, Zhang Y, Kelly DJ, Yoshimoto M, Nagai H, Evans RG, Kuwahira I, Shirai M, Pearson JT. Chronic intermittent hypoxia accelerates coronary microcirculatory dysfunction in insulin-resistant Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;311(2):R426-39 (査読有)

Shirai M, Yagi N, Umetani K. SPring-8 synchrotron radiation imaging for analyzing cardiovascular function in anesthetized small animals. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2016;148(2):92-9 (査読有)

[学会発表](計 15 件)

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Sonobe T, Shirai M, Pearson JT. Liraglutide treatment improves the coronary microcirculation in Zucker obese rats on high-salt diet. *Circ J*, 2019

Waddingham MT, Jin H, Sonobe T, Tsuchimochi H, Asano R, Shirai M, Ogo T, Pearson JT. Changes in the Right Coronary Microcirculation in Pulmonary Arterial Hypertension. 9<sup>th</sup> Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, 2019

中岡 良和、炎症性サイトカインの肺高血圧症病態での役割、第 92 回日本薬理学会 シンポジウム 23、2019

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Tatsumi E, Shirai M, Pearson JT. Microangiography Reveals the Protective Role of Liraglutide on Renal Microvascular Impairment in Rats with Metabolic Syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2018

Waddingham MT, Tsuchimochi H, Sonobe T, Hamdani N, Yagi N, Shirai M, Pearson JT, Ogo T. Understanding the pathogenesis of diastolic dysfunction: from the whole heart to the level of the myofibrillar proteins. The 2nd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, 2018

中岡 良和、Interleukin-6/Interleukin-21 Signaling Axis in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension、第 22 回日本心不全学会 シンポジウム 6 (PAH)、2018  
Pearson JT, Shirai M. Investigating in vivo myocardial and coronary molecular pathophysiology in mice with X-ray radiation imaging approaches. 第 12 回上原国際シンポジウム(Make Life Visible)、2017

Tsuchimochi H, Thambyah H, Edgley AJ, Inagaki T, Waddingham MT, Chen YC, Du CK, Zhan DY, Sukumaran V, Sonobe T, Umetani K, Shirai M, Pearson JT. Beat-blockade prevents coronary microvascular endothelial dysfunction in non-obese salt-sensitive insulin resistant rats on a high salt diet. ESC congress, 2017

Pearson JT, Meagher P, Tsuchimochi H, Edgley AJ, Yoshimoto M, Waddingham MT, Chen YC, KMM Colafella, Hilliard LM, Umetani K, Widdop RE, Shirai M, Denton KM. Effect of insulin resistance on compound 21 mediated coronary microvascular dilation in female rats in vivo. ESC Congress 2017

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Tatsumi E, Shirai M, Pearson JT. Bolus ghrelin administration ameliorates the inflammatory response and oxidative stress during percutaneous cardiopulmonary support in a rat model. Experimental Biology Meeting, 2017

Sukumaran V, Tsuchimochi H, Tatsumi E, Shirai M, Pearson JT. Liraglutide treatment improves renal vascular function in Zucker rats as visualized by microangiography. American Society of Nephrology Meeting Kidney Week, 2017

Pearson JT, Tsuchimochi H, Yagi N, Shirai M. ローキナーゼ及び酸化ストレスによる心筋サルコメア機能の調節作用、第 94 回日本生理学会大会、2017

金 美花、若林 繁夫、古林 創史、土持 裕胤、白井 幹康、ピアソン ジェームズ、大郷 剛、低酸素により誘発される心肥大におけるカルシニューリン B 様蛋白質 3 (CHP3) の新しい役割、第 94 回日本生理学会大会、2017

戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、森本 幸生、白井 幹康、ピアソン ジェームズ、拡張型心筋症ノックインマウスにおける心臓ノルエピネフリン動態異常、第 94 回日本生理学会大会、2017

中岡 良和、肺高血圧症における Interleukin-6/interleukin-21 シグナル軸の役割、第 94 回日本生理学会大会シンポジウム 24「循環器疾患における神経・炎症・代謝性機序の関わりと重要性」、2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：ピアソン ジェームズ

ローマ字氏名：PEARSON, James

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：部長

研究者番号(8桁): 30261390

研究分担者氏名：中岡 良和

ローマ字氏名：NAKAOKA, Yoshikazu

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：部長

研究者番号(8桁): 90393214

研究分担者氏名：川口 章

ローマ字氏名：KAWAGUCHI, Akira

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30195052

研究分担者氏名：土持 裕胤

ローマ字氏名：TSUCHIMOCHI, Hirotsugu

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター

部局名：研究所

職名：室長

研究者番号(8桁): 60379948