

令和元年6月17日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05836

研究課題名(和文)慢性低酸素性肺高血圧症の新規診断治療法の開発 -高地居住者の分子遺伝学的解析-

研究課題名(英文)Development of new diagnostic treatment for chronic hypoxic pulmonary hypertension-Molecular genetic analysis of highlanders-

研究代表者

水野 史朗(MIZUNO, Shiro)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80397281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：キルギス共和国の高地性肺高血圧症患者群よりキルギス国立心臓病内科センターとの共同研究で、キルギス共和国より搬送した血液サンプルの解析を行った。高地肺高血圧患者群では酸化ストレスによると考えられるd-ROM、BAPの上昇が認められた。p53 codon 72C/G遺伝子多型に差を認めたことから、肺高血圧患者群では酸化ストレス応答の違いにより低酸素性肺高血圧の発症が惹起される可能性が示唆され、低酸素由来の酸化ストレスが肺血管リモデリングの誘因である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高地居住者における低酸素性肺高血圧の発症にp53遺伝子多型が関与していることが示唆された。d-ROM検査を用いた検討では、肺高血圧を発症していない高地居住者においても血中酸化ストレスの上昇を認めており、p53遺伝子多型によるストレス応答の反応の違いにより、肺血管のリモデリングの発症に違いが生じている可能性がある。低酸素以外の喫煙などによる酸化ストレスに関しても、同様にp53遺伝子が肺循環に関与する可能性がある。今後の臨床研究が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed blood samples from Kyrgyz Republic from a group of patients with high altitude pulmonary hypertension in Kyrgyz Republic in collaboration with Kyrgyz National Heart Disease Center. In the high altitude pulmonary hypertension patient group, d-ROM and BAP, which are considered to be caused by oxidative stress, were analyzed. The results from difference in p53 codon 72C / G gene polymorphism suggests that the oxidative stress response may cause the onset of hypoxic pulmonary hypertension in the pulmonary hypertensive patient group, and hypoxia-derived oxidative stress could be the trigger of vascular remodeling.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：低酸素性肺高血圧 酸化ストレス マイクロRNA

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

1. 研究開始当初の背景

低酸素性肺高血圧症、右心不全は在宅酸素療法が必要な慢性閉塞性肺疾患などの慢性呼吸不全患者に合併する予後不良の病態である。低酸素性肺高血圧症を認める患者肺の病理組織では末梢の肺動脈に血管平滑筋が遊走、同部位での平滑筋細胞の増殖、周囲の膠原線維の増殖を来し、肺血管リモデリングとよばれる不可逆的な肺血管内腔狭窄を引き起こす。低酸素性肺高血圧の代表的疾患として高所性肺高血圧症(High-altitude pulmonary hypertension: HAPH)があげられる。HAPHは標高2500m以上の住民の5~10%にリスクがあるとされ、高地居住者における重要な疾患の一つである。本研究の実施予定地であるキルギス共和国は国土の40%が標高3000mを超える高地にあることから、HAPHは同国において国民病の一つとされている。

我々はこれまで低酸素刺激や酸化ストレスにより誘導される癌抑制遺伝子であるp53に注目し、低酸素性肺血管細胞の増殖や肺血管リモデリングの病態解析を行ってきた。p53の発現を抑制した培養肺細胞では低酸素下での細胞増殖能が亢進しており¹、p53遺伝子変異マウスにおいては慢性低酸素暴露により肺血管抵抗の上昇と右心負荷の上昇、肺血管リモデリングの増悪を認めた²。また、肺高血圧の成因に関与する血管内皮細胞から産生されるNOはcGMPを介して肺血管平滑筋の拡張を来すが、申請者は外因性NOが培養肺血管平滑筋細胞の増殖をp53の発現を介して抑制し³、その増殖抑制効果は低酸素性環境下の培養における肺血管細胞増殖にも発現されることを報告している¹。加えて最近、血管内皮型NO合成酵素(eNOS)を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞(EPC)の全身投与が肺高血圧症患者に対して有用であったとする臨床応用研究が報告されている⁴。HAPH患者においても同様に、肺血管リモデリングに関与すると想定されている血中EPCの発現、血管内皮由来のNO活性の重要性が示唆される。

さらにHAPHのNO活性に関して、我々はキルギス共和国の高地適応動物であるヤクにおいて、肺組織でのeNOSの発現亢進と血液中の内因性NO阻害物質であるAsymmetric dimethylarginines(ADMA)値が低下していることを見出した⁵。ヤクの対照動物であるウシでは高地環境暴露による肺動脈分圧低下、慢性低酸素血症により引き起こされる低酸素性肺高血圧症から著明な肺血管リモデリングを来す⁶。高地適応動物であるヤクでは肺血管のeNOSの発現亢進とADMAの低下によるNO産生亢進により低酸素性肺高血圧に対する耐性獲得が得られているものと我々は推定している。一方、ヒトにおける低酸素暴露による血中ADMAに関しては、高地登山により肺動脈圧の上昇と高山病を発症した患者群の血中ADMA値が有意に低下していたとの報告がある⁷。血清中のADMA値は原発性肺高血圧症や慢性肺血栓塞栓症、強皮症に合併した肺高血圧症においても上昇し、予後や重症度と相関すると報告されていることから^{8,9}、ADMAは肺高血圧症における血中のバイオマーカーとして有用であるだけでなく、NO産生やp53、EPCが関与する肺血管リモデリングにおける循環機能因子としての役割を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は国土の多くが海拔3000m以上の高地にあるキルギス共和国の高所性肺高血圧患者を対象として、低酸素性肺高血圧患者における循環血液中の一酸化窒素(NO)活性、疾患遺伝子特性を明らかにし、慢性呼吸器疾患の進行とともに生ずる慢性低酸素性肺高血圧の診断、治療応用へと展開するための研究基盤を確立することを目的とする。具体的には(1)血中内因性NO阻害物質であるADMAの測定、(2)血液中のp53、血管内皮前駆細胞関連遺伝子の解析、(3)肺高血圧患者のp53、ADMA関連遺伝子多型の解析を行った。

3. 研究の方法

本研究はキルギス共和国の患者群から血液を採取し、血中のNO活性、血球細胞中の遺伝子、p53、ADMA関連遺伝子多型を測定し、低酸素性肺高血圧の原因遺伝子、病態解析、新規バイオマーカーの検索を行った。

具体的にはキルギス国立心臓病・内科センター、または同国の共同研究施設において低地居住コントロール群、高地居住非肺高血圧患者群、高地居住肺高血圧患者群を選択、同患者群から血液サンプルを採取し血清ADMAやNO₂/NO₃値、血液細胞/エクソソーム中のp53、EPC関連遺伝子の発現、p53、ADMA関連遺伝子多型の解析を行い、高地居住者の低酸素刺激による肺循環遺伝子発現の影響や病態を明らかにすることを試みた。キルギス共和国で採取した血液検体は当地で液体窒素で凍結し、ドライアイスにパッキングされた検体を国際航空便にて当該施設まで輸送し、検体の測定時まで-80℃の冷凍庫で保存した。

[患者選択]

- (1) 低地居住コントロール群：首都ビシュケク(海拔800m)居住の非肺高血圧患者
- (2) 高地居住の非肺高血圧患者群：海拔2500m以上に居住の非肺高血圧患者
- (3) 高地居住の肺高血圧患者群：海拔2500m以上に居住のHAPH患者

上記患者群を対象に、キルギス国立心臓病・内科センター、または同国の共同研究施設において呼吸機能検査と胸部画像・心臓超音波検査を施行した患者より、研究協力に自由意志で参加に同意を得られた患者を被験者として選択した。

高地居住の肺高血圧患者に関しては胸部画像もしくは心臓超音波検査により肺高血圧症の存在が疑われた群より、心臓超音波検査にて予測平均肺動脈圧が 30mmHg 以上と判明した群を選択した。

ただし 間質性肺炎、重症 COPD 合併などの慢性肺疾患を有する患者、炎症反応高値の患者、過度の多血症 (Hb 値; 男性 21g/dl、女性 19g/dl 以上)、膠原病合併患者、互明らかな慢性心疾患、肺血栓塞栓症による肺高血圧症患者は除外項目として上記解析群より除いた。

[検体処理]

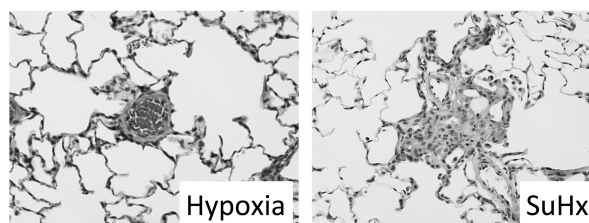
- (1) 通常の血清採血管に加え、Paxgene DNA・RNA 採血管を用いて患者より血液を採取し、DNA・RNA 抽出時まで-20 で保存する。通常の採血管で採取した血液は遠心分離による血清分離後、測定時まで-80 で冷凍保存した。Paxgene DNA・RNA 採血管は採血後ただちに管内に存在する DNA もしくは RNA 安定剤により安定化し、約 72 時間は常温で安定とされる。血球成分抽出に必要な遠心分離などの特別な処置を必要とせず、採血後-20 の冷凍保存により検体処理に伴う核酸の劣化変性が生じないため、海外を含む多施設での解析に有用であった。
- (2) 血中 NO マーカーの測定
上記患者群の保存血清より、内因性 NO 阻害物質である ADMA 値を ELISA 法を用いて測定、また血清中の NO₂/NO₃ を Griess 法により測定した。
- (3) 血液細胞、エクソソーム中の遺伝子発現の解析
上記患者群より採取した Paxgene RNA 採血管より RNA を抽出、同様に患者保存血清より、miRUCURYTM Exosome Isolation Kit (EXIQON)を用いてエクソソームを単離し RNA を抽出、逆転写酵素を用いて cDNA を作成し p53 関連遺伝子である p21, Sirt1, miR34a, EPC のマーカーである CD31, CD34, miR126 などの mRNA/miRNA の発現を real-time RT-PCR にて測定する。

予備実験として VEGFR 阻害剤(SU5416)投与低酸素暴露(SuHx)肺高血圧ラット、慢性低酸素暴露肺高血圧ラットモデルを用いて血清中の分泌型 RNA、血液細胞中の miRNA をマイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、肺高血圧に特異的に変動する血液バイオマーカーとしてのエクソソーム中の miRNA の特定を試みた。また、同様に肺組織中の同標的遺伝子の発現についても検討した。低酸素性肺高血圧ラットモデルは 7 週齢の SD ラットを 10%酸素濃度の低酸素環境下に 4 週間暴露し実験に使用した。また SuHx ラットモデルは SU5416 を投与 (20mg/kg, 皮下注)後に 10%酸素濃度の低酸素環境下に 3 週間暴露し、その後 2 週間通常酸素濃度下で飼育した後実験に使用した。ラットはペントバルビタールによる麻酔後に人工呼吸管理下で開胸し右心室より圧カテーテルを挿入し肺動脈圧を測定、左肺は 10cmH₂O 圧で 10%ホルマリンを気管より注入固定し肺血管組織診断に使用、右肺は RNA later で固定後に組織中の RNA 抽出に使用した。右心室より血液を採取、遠心分離により血清を-80 度で保存、血清中のエクソソームは exoRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen)を用いて抽出し、RT-PCR による miRNA マイクロアレイによる検討(Kurabo. Co. LTD.)を行った。

- (4) p53, ADMA 関連遺伝子多型と低酸素性肺高血圧との関連の検討
上記の様に選択した被験者より採取した DNA 採血管より DNA を抽出し、PCR 法にて遺伝子多型を含む DNA 断片を増幅し、制限酵素断片長多型性 (PCR-RFLP) により判定した。解析を行った遺伝子は p53 codon72 C/G 多型 (Rs1042522)、p53 の主たる調節因子である MDM2 の P2 プロモーターの多型である MDM2 SNP309 G/T 多型 (Rs2279744) である。

4. 研究成果

予備実験として行った肺高血圧ラットモデルでの検討では、低酸素暴露ラットモデルでは肺小動脈の中膜の飛行を主体とする Heath-Edwards 分類 2 度の血管リモデリング、SuHx モデルでは Heath-Edwards 分類 4 度相当の瘤状の血管腫様病変である蔓状変化の出現を認めた。(右図)

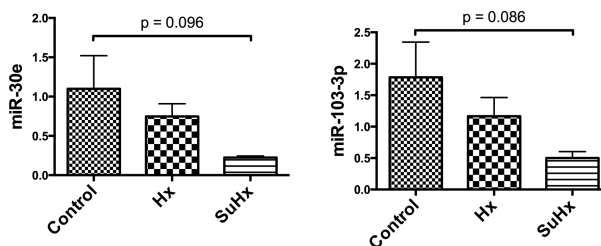


平均肺動脈圧はコントロール群 (14.6 ± 3.2 mmHg) に比して有意に低酸素群 (23.5 ± 5.1 mmHg)、SuHx 群 (33.1 ± 10.8 mmHg) で上昇していた。右心室 (RV) と左心室 (LV)・中隔 (S) 重量比 (RV/LV+S) もコントロール群 (0.19 ± 0.05 mmHg) に比して有意に低酸素群 (0.32 ± 0.08 mmHg)、SuHx 群 (0.40 ± 0.10 mmHg) で上昇していた。

エクソソーム中の miRNA 発現は miRNA アレイのクラスター解析の結果より、コントロールに比して有意に変動を認めた群から 9 個の遺伝子群 (miR-30e, miR-664-1-5p, miR-874,

miR-202-5p, miR-494-3p, miR-326-5p, miR-25-5p, miR-652-5p, miR-103-3p)をRT-PCRによる遺伝子発現の検討に選択した。またリファレンスジーンとしてmiR-191を選択した。

LightCycler™システムによるmiRNA遺伝子発現の半定量を行い、肺組織中の同遺伝子群の発現や肺動脈圧、右心肥大の程度との相関を検討した。コントロール、低酸素群、SuHx群間で上記miRNA発現ではmiR-30eとmiR-103-3pで肺高血圧モデル群の発現が低下する傾向にあったが、三群間で統計学的に有意な変化は認められなかった(右図)。またmiR-664-1-5pが血清エクソソーム中と組織中の発現で有意な正の相関を示した。また、miR-30eとmiR-103-3pが平均肺動脈圧と負の相関を認める傾向にあった。



ラットモデルでの結果をもとに、キルギス共和国の高地性肺高血圧症患者群よりキルギス国立心臓病内科センターとの共同研究で、キルギス共和国より搬送した血液サンプルの解析を主に行った。得られた患者群より、検体の破損などを除いた遺伝子解析が可能であったコントロール群36名、高地コントロール群41名、高地肺高血圧群33名からDNA遺伝子を抽出し、p53遺伝子多型とMDM2遺伝子多型の検討を行った。高地肺高血圧群で有意にp53 codon72 C alleleが多い結果となったが、p53遺伝子の制御因子であるMDM2 SNP309遺伝子多型には有意な差は認められなかった(下表)。

p53 and MDM2 genotype frequencies in Kyrgyz patients

p53 codon 72 genotype

	CC	CG	GG	p value	
Bishkek Control	3 (8.3%)	8 (22.2%)	25 (69.4%)	Reference	-
Highlander	3 (7.3%)	14 (34.2%)	24 (58.5%)	0.512	Reference
HAPH	4 (12.1%)	18 (54.5%)	11 (33.3%)	0.010	0.097

MDM2 SNP309 genotype

	GG	GT	TT	p value	
Bishkek Control	9 (25.0%)	17 (47.2%)	10 (27.8%)	Reference	-
Highlander	10 (24.4%)	22 (53.7%)	9 (22.0%)	0.423	Reference
HAPH	10 (30.3%)	16 (48.5%)	7 (21.2%)	0.483	0.336

p53 and MDM2 allele frequencies in Kyrgyz patients

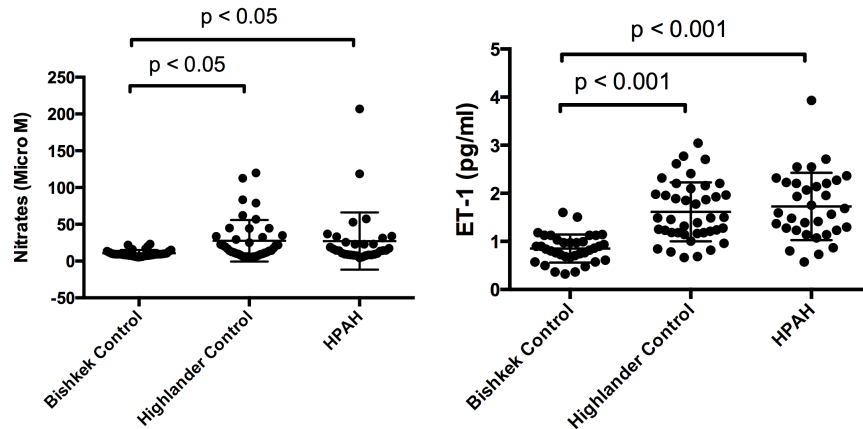
p53 codon 72 allele

	C	G	p value	
Bishkek Control	21.1%	78.9%	Reference	-
Highlander	23.2%	76.8%	0.738	Reference
HAPH	38.2%	61.8%	0.010	0.050

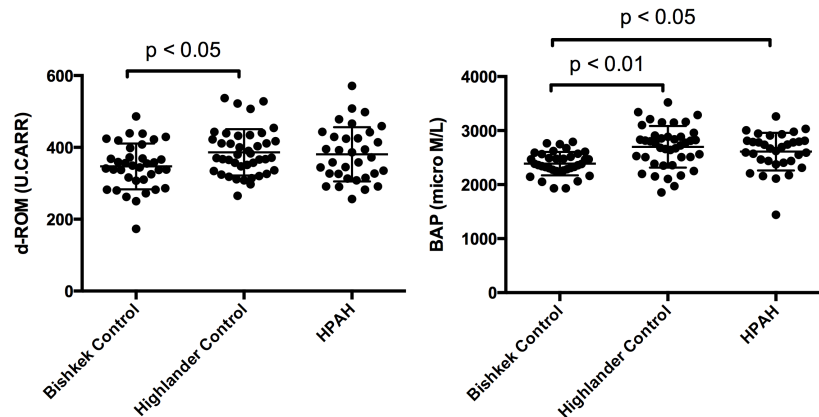
MDM2 SNP309 allele

	G	T	p value	
Bishkek Control	48.6%	51.4%	Reference	-
Highlander	51.2%	48.8%	0.747	Reference
HAPH	54.5%	45.4%	0.486	0.687

血清 NOx 値と ET-1 値は高地居住者群でコントロール群に比して有意に上昇していたが、肺高血圧の有無による差は認められなかった（右図）。



また ADMA 値には三群間で優位な差は認められなかった。d-ROMs テストを用いた抗酸化ストレスの測定を行ったところ、コントロール群に比して血清 d-ROM と BAP 値の有意な上昇が高地コントロール群に認められたが、肺高血圧の有無による差は認められなかった（右図）。



低酸素ラットを用いた研究では血清エクソソーム中の miR-30e と miR-103-3p が平均肺動脈圧と相関する傾向にあった。血清エクソソームの発現は miR-664-1-5p を除き、肺組織の発現と相関しなかった。肺動脈平滑筋細胞は低酸素下で増殖が亢進することが知られており、低酸素性肺血管リモデリング病態に関与していることが想定されている。本研究で標的遺伝子の一つとして検討された miR-103 に関して、Deng らは低酸素性肺高血圧ラットモデルの肺血管において miR-103 が有意に低下しており、miR-103 を導入した培養肺動脈細胞では低酸素による細胞増殖が抑制されたと報告している 7)。また同様に miR-30e の血管平滑筋での発現に関して、Liu らは miR-30e の培養血管平滑筋細胞の導入により、miR-103 と同様に細胞増殖が抑制されること、また miR-30c の over expression モデルでラット頸動脈の頸動脈バルーン傷害による内膜増生が抑制されることを報告しており 8)、肺高血圧モデルで同 miRNA の低下を認めた本研究の結果に矛盾しない。同遺伝子群の肺内での発現は血清中エクソソームの発現と相関しなかったが、肺血管細胞の肺内に占める割合は低く、肺胞上皮細胞などにおける遺伝子発現により影響を受けるためと考えられ、今後肺血管における同遺伝子発現の検討が必要である。

またキルギス共和国における、高地性肺高血圧患者検体を用いた検討では、高地居住により NOx、ET-1 の産生が亢進しており、気圧低下による低酸素の影響が示唆され、その酸化ストレスによると考えられる d-ROM、BAP の上昇が認められる。しかしながら、p53 codon 72C/G 遺伝子多型に差を認めたことから、肺高血圧患者群では酸化ストレス応答の違いにより低酸素性肺高血圧の発症が惹起される可能性が示唆され、低酸素由来の酸化ストレスがその誘因である可能性が示唆された。

引用文献

1. Mizuno, S. *et al.* Hypoxia regulates human lung fibroblast proliferation via p53-dependent and -independent pathways. *Respir. Res.* 10, 17 (2009).
2. Mizuno, S. *et al.* p53 Gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 300, L753-L761 (2011).
3. Mizuno, S. *et al.* p42/44 Mitogen-activated protein kinase regulated by p53 and nitric oxide in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 184-192 (2004).
4. Granton, J. *et al.* Endothelial NO-Synthase Gene-Enhanced Progenitor Cell Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: The PHACeT Trial. *Circ. Res.* 117, 645-654 (2015).

5. Mizuno, S. *et al.* Endogenous Asymmetric Dimethylarginine Pathway in High Altitude Adapted Yaks. *Biomed Res Int* 2015, 196904-6 (2015).
6. Ishizaki, T. *et al.* Blunted activation of Rho-kinase in yak pulmonary circulation. *Biomed Res Int* 2015, 720250-5 (2015).
7. Tannheimer, M. *et al.* Decrease of asymmetric dimethylarginine predicts acute mountain sickness. *J Travel Med* 19, 338-343 (2012).
8. Kielstein, J. T. *et al.* Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1414-1418 (2005).
9. Skoro-Sajer, N. *et al.* Asymmetric dimethylarginine is increased in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176, 1154-1160 (2007).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 低酸素性肺高血圧動物モデルにおける Riociguat の影響. 野尻正史、松浦早季、山村考一、佐久間貴士、西木一哲、中瀬啓介、加藤諒、四宮祥平、東野茉莉、高原豊、齋藤雅俊、小島好司、藤本由貴、中川研、及川卓、長内和弘、水野史朗. 第 59 回日本呼吸器学会総会. 2019.
2. Circulating micro-RNA profiling of animal model of pulmonary hypertension. Shiro Mizuno. 4th International Issyk-Kul Leh Symposium. 2017.
3. 肺高血圧ラットモデルを用いた血中遺伝子発現の検討. 四宮祥平、水野史朗、佐久間貴士、西木一哲、中瀬啓介、野尻正史、加藤 諒、高原 豊、齋藤雅俊、小島好司、及川 卓、中川 研、長内和弘、梅 博久. 第 57 回日本呼吸器学会総会. 2017.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安尾 将法

ローマ字氏名：(YASUO, Masanori)

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：20402117

研究分担者氏名：石崎 武志

ローマ字氏名：(ISHIZAKI, Takeshi)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80151364

(2)研究協力者

研究協力者氏名：四宮 祥平

ローマ字氏名：(SHINOMIYA, Shohei)

研究協力者氏名：芝本 利重

ローマ字氏名：(SHIBAMOTO, Toshishige)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。