

機関番号：32607

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790748

研究課題名 (和文) 低酸素暴露が肺動脈性高血圧症を誘導するメカニズムの解析

研究課題名 (英文) A mechanism for hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension

研究代表者

佐藤 隆司 (SATO TAKASHI)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：90407114

研究成果の概要 (和文)：

低酸素暴露が肺動脈性高血圧症 (PAH) を誘導するメカニズムを追究した。ヒト正常肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来内皮細胞を通常 (21%O₂) または低酸素 (1%O₂) 条件下で培養した。BMP 受容体である BMPR-IA と BMPR-II の遺伝子・蛋白発現は低酸素暴露肺動脈内皮細胞でのみ低下が見られ、血管内皮増殖を促進し、PAH を誘導する可能性が考えられた。また、シンバスタチンは低酸素による BMP 受容体の発現低下を抑制でき、PAH の発症予防に有用な可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

To examine mechanisms for hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension (PAH), we identified for hypoxia-responsive genes unique to human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC). Aorta and umbilical vein endothelial cells were used as controls. As a result, BMPR-IA and BMPR-II, a receptor for BMP, were identified as genes and proteins down-regulated in hypoxic HPAEC, but not in other endothelial cells. These findings suggest that hypoxia suppresses BMP signaling via down-regulation of BMP receptor in HPAEC, leading to development of PAH. Interestingly, simvastatin reversed the inhibitory effects of hypoxia and restored BMPR mRNA expression in HPAEC, might prevent PAH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学・分子血管病態学

キーワード：肺動脈性高血圧症、低酸素、血管内皮細胞、BMP 受容体、シンバスタチン

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension: PAH) は、肺動脈の叢状病変などの増殖性の変化に伴って肺動脈圧が上昇する病態であり、進行すると右心不全、低心拍出、突然死をきたす重篤な疾病である。

PAH の発症要因の一つとして低酸素暴露が知られている。生体が慢性的な低酸素状態に陥った場合、酸素の影響を直接受ける血管内皮細胞が障害を受ける。動脈の恒常性は血管内皮細胞と血管平滑筋細胞の相互作用により維持されているが、慢性的な低酸素や極度な

低酸素状態に陥ることで、そのバランスが保てなくなると、増殖性変化を引き起こし、動脈内腔が狭窄すると考えられているが、その分子メカニズムはいまだ明らかでない。

近年、特発性肺高血圧症患者の一部で、TGF- β /BMP 関連遺伝子である BMPR-II や ALK1 遺伝子の変異および BMPR-IA の発現低下が報告されている (Nat Genet 2000;26:81, N Engl J Med 2001;345:325)。それら分子の異常の多くは、シグナル伝達に影響を及ぼし、血管内皮細胞の分化、増殖、アポトーシス感受性を変化させ、PAH を誘導する可能性が指摘されており、今回の検索により標的遺伝子として抽出されることを予想している。

肺が慢性的な低酸素状態に暴露されると PAH が惹起されることは臨床・動物実験からも明らかである (JAMA 1990;263:2347, Am Rev Respir Dis 1992;145:793)。このことは、低酸素暴露が肺動脈内皮細胞に PAH の発症に関わる器質的变化をもたらす可能性が高い。マウスやラットを長期間低酸素に暴露すると PAH が見られる、慢性低酸素動物モデルにおいて、低酸素暴露 2 週間で肺動脈内皮細胞の BMPR-II mRNA 発現の低下が見られ、下流遺伝子 Id-1 に影響を及ぼしていることが示されている (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;290:L450, Pediatr Res 2007;61:392)。また、2 型 VEGF 受容体の阻害薬である SU5416 の皮下投与と慢性低酸素暴露を組み合わせた動物モデルで、重度の PAH 病態が再現された (FASEB J 2001 ;15:427)。このモデルでは通常の慢性低酸素動物モデルでは認められなかった、中・小の肺動脈で血管閉塞を伴う血管内皮細胞の増殖が見られ、血管新生関連分子の変化が血管内皮細胞の機能に影響を及ぼしていることが示されている。

低酸素性 PAH 動物モデルを用いた PAH の治療法として、エンドセリン受容体拮抗薬 (ボセンタン) や HMG-CoA 還元酵素阻害薬 (スタチン系薬剤) の投与が検討され、筋性血管の中膜肥厚の抑制、右室収縮期圧の低下を認めることなど、これら薬剤が PAH に有効であることが示されている。(J Appl Physiol 1995;79:2122, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:2335)。In vitro の系において、血管内皮細胞培養液にスタチン系薬剤を添加することで BMPR-II mRNA の発現増加が報告されていることから (Biochem Biophys Res Commun 2006;339:59)、本研究により得られた標的分子とそれら薬剤との関連を見出すことにより、PAH の病態解明、および PAH の発症予防や治療法に繋がる可能性が考えられる。

本研究結果により、PAH を誘導する標的分子が同定できれば、それを標的とした新たな治療法の開発に繋がる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では異なる組織由来の培養血管内皮細胞を低酸素暴露し、肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す遺伝子 (標的遺伝子) を同定し、PAH の病態との関連を追及する。特に血管新生関連、および TGF- β /BMP 関連遺伝子に注目し、それらの遺伝子アレイを用いて網羅的な発現スクリーニングを行なう。得られた結果をもとに、標的分子の遺伝子・蛋白発現解析、機能解析を行い、最終的に標的分子を人為的に制御することで PAH の発症・進展を予防する治療法の開発をめざすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低酸素暴露により誘導される培養血管内皮細胞の遺伝子発現変化の検討

① DNA アレイによる遺伝子発現変化の解析

培養ヒト正常肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来内皮細胞を通常 (21%O₂) および低酸素 (1%O₂) に 24 時間暴露し、total RNA を抽出し、DNA アレイ (SuperArray 社) を用いて、血管新生関連および TGF- β /BMP 関連の計 179 遺伝子の発現変化をスクリーニングした。低酸素と通常培養の遺伝子発現が 1.5 倍以上異なるものを有意な発現変化と定義した。低酸素暴露により肺動脈内皮細胞での発現が変化し、その発現変化が大動脈および臍帯静脈内皮細胞と異なる、2 つの条件を満たした遺伝子を肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す候補遺伝子として抽出した。

② 半定量的 PCR による遺伝子発現変化の解析

DNA アレイの結果の確認および再現性を検討するため、さらに異なるロットの各種血管内皮細胞 (肺動脈:3, 大動脈:2, 臍帯静脈:2) を用いた。DNA アレイの結果から抽出された遺伝子群に特異的なプライマーを用いて PCR を行ない、PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、GelDoc XR (BIO-RAD Laboratories) で可視化した。個々のバンドの発現強度を NIH Image を用いたデンシトメトリーにより半定量的に解析した。

③ 定量的 PCR による遺伝子発現変化の解析

複数のロットで再現性の得られた遺伝子については、さらに TaqMan PCR による定量的解析を行った。通常酸素条件で培養した肺動脈内皮細胞由来の cDNA の希釈系列を用いて各遺伝子の発現強度を標準化し、さらに

β -actin の発現レベルにより補正した。最終的に、統計学的な検討を行い、肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す遺伝子を同定した。

(2) 培養血管内皮細胞における蛋白発現解析

遺伝子発現解析により同定された肺動脈内皮細胞に固有の発現変化を示す分子について、肺動脈、大動脈、臍帯静脈血管内皮細胞を 12、24、48、72 時間低酸素に暴露し、それらの蛋白発現変化を検討した。各種細胞は RIPA lysis buffer で溶解し、8.5%ポリアクリルアミド-SDS ゲル電気泳動で分画し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。免疫ブロット法は、ヤギポリクローナル抗 BMPR-IA 抗体 (R&D Systems)、マウスモノクローナル抗 BMPR-II 抗体 (Becton Dickinson) またはウサギポリクローナル抗 β -actin 抗体 (Sigma) を用い、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応後、化学的に発色することで検出した。分子量をもとに目的分子バンドを同定し、その強度をデンシトメトリーにより半定量的に求め、 β -actin 発現量との比を計算することで標準化した。

(3) BMP 下流遺伝子の発現変化の検討

BMP/TGF- β シグナルにより特異的に誘導される下流遺伝子として ID3、PAI-1 が知られている。低酸素に 24 時間暴露後の肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来血管内皮細胞における ID3、PAI-1 遺伝子の発現変化をデンシトメトリーによる半定量 PCR、TaqMan PCR による定量 PCR を用いて検討した。

(4) シンバスタチンが BMPR-IA、BMPR-II 遺伝子発現変化に及ぼす影響の検討

低酸素培養開始時にシンバスタチン (CALBIOCHEM) もしくは溶解液を添加し (最終濃度: $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$)、BMPR-IA、BMPR-II 遺伝子発現の変化を TaqMan PCR による定量 PCR を用いて検討した。

(5) 統計学的検討

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。

4. 研究成果

(1) 低酸素暴露により肺動脈血管内皮細胞で特異的な発現変化を示す遺伝子の同定

DNA アレイによるスクリーニングの結果、低酸素暴露後に発現が低下した遺伝子は、肺動脈内皮細胞で 20、大動脈内皮細胞で 14、臍帯静脈内皮細胞で 10 検出された。一方、低酸

素暴露後に発現が増加した遺伝子は、肺動脈内皮細胞で 10、大動脈内皮細胞で 10、臍帯静脈内皮細胞で 17 検出された。そのうち、27 遺伝子が肺動脈血管内皮細胞に固有の発現変化を示した。これら候補遺伝子について半定量的 PCR で再現性を確認したところ、5 遺伝子 (BMPR-IA、BMPR-II、Flt-1、Tie-1、CD31) に絞られた。さらに、定量的 PCR により、BMP 受容体である BMPR-IA、BMPR-II の 2 つが同定された。BMPR-IA 遺伝子発現は低酸素培養により肺動脈内皮細胞で 0.5 倍と有意に低下し、大動脈内皮細胞では 1.0 倍と変化せず、臍帯静脈内皮細胞では 1.7 倍に増加した (図 1A)。一方、BMPR-II 遺伝子発現は低酸素培養により、肺動脈内皮細胞で 0.6 倍と有意に低下し、大動脈内皮細胞では 0.8 倍、臍帯静脈内皮細胞では 1.4 倍と変化した (図 1B)。

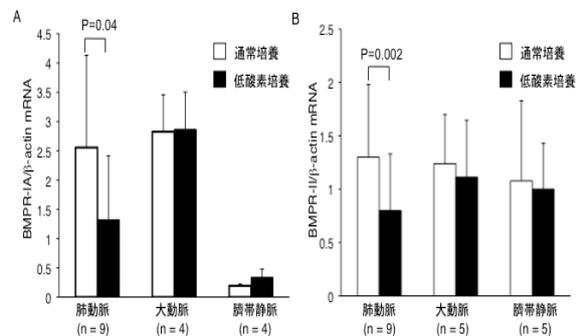


図 1. 通常培養および低酸素培養における肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来の培養血管内皮細胞の BMPR-IA (A) と BMPR-II (B) 遺伝子発現の TaqMan PCR による定量的解析

(2) 低酸素暴露による BMPR-IA、BMPR-II の蛋白レベルでの発現変化

デンシトメトリーによる半定量的検討では、BMPR-IA 蛋白発現は肺動脈内皮細胞では低酸素暴露 48 時間より経時的に低下し、72 時間後では通常培養と比べ 0.5 倍となった。一方、72 時間後の発現は大動脈内皮細胞では 1.8 倍、臍帯静脈内皮細胞は 0.7 倍であった。BMPR-II 蛋白発現は肺動脈内皮細胞では低酸素暴露 48 時間より経時的に低下し、72 時間後では通常培養と比べ 0.5 倍となった。大動脈内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞はそれぞれ 1.0 倍と変化しなかった。

(3) 低酸素暴露による BMP 下流遺伝子の発現変化

低酸素暴露による BMP 受容体の発現変化が ID3 発現に及ぼす影響を検討した。低酸素暴

露 24 時間後に肺動脈内皮細胞における ID3 遺伝子発現は通常培養の 0.6 倍と減少した。一方、大動脈内皮細胞では 0.9 倍、臍帯静脈内皮細胞では 0.9 倍と変化した (図 2)。また、肺動脈内皮細胞は低酸素暴露に TGF- β 受容体の下流遺伝子 PAI-1 の発現変化を認めなかった (肺動脈 0.7 倍、大動脈 2.0 倍、臍帯静脈、1.4 倍)。

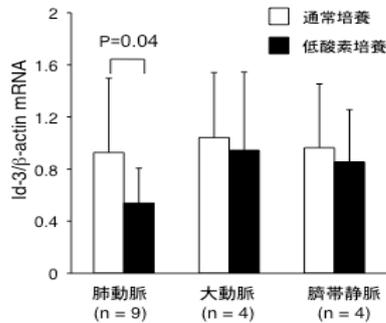


図 2. 通常培養および低酸素培養における肺動脈、大動脈、臍帯静脈由来の培養血管内皮細胞の ID-3 遺伝子発現の TaqMan PCR による定量的解析

上記の結果から、低酸素暴露により肺動脈内皮細胞において BMPR-IA および BMPR-II の発現が低下し、その変化は肺動脈血管内皮に固有であることが示された。さらに、肺動脈内皮細胞を低酸素に暴露すると BMP 下流遺伝子 ID3 発現が抑制されたことから、BMP 受容体発現低下が BMP シグナル不全を誘導すると考えられた。BMP は血管内皮細胞の増殖を強力に抑制することから、低酸素暴露による BMP シグナル不全が肺動脈血管内皮細胞の増殖を介して PAH 病態を誘導する可能性が考えられた。

(4) シンバスタチンの BMP 受容体発現に及ぼす影響

シンバスタチン存在下で肺動脈内皮細胞を低酸素に暴露し、BMPR-IA、BMPR-II 遺伝子の発現を定量的 PCR で検討した (図 3)。低酸素培養開始時にシンバスタチン添加によって、肺動脈内皮細胞の BMPR-IA 遺伝子発現は無添加のコントロールと比べ、1 μ M のシンバスタチン添加で 2.2 倍に増加、10 μ M のシンバスタチン添加で 2.3 倍に増加した。また、BMPR-II 遺伝子発現は無添加のコントロールと比べ、1 μ M のシンバスタチン添加で 2.5 倍に増加、10 μ M のシンバスタチン添加で 2.9 倍に増加した。シンバスタチンは低酸素暴露による肺動脈内皮細胞における BMP 受容体遺

伝子の発現低下を容量依存的に抑制した。

したがって、スタチン系薬剤が低酸素暴露による BMP シグナル不全を是正することで PAH の進展予防に有効な可能性が示された。

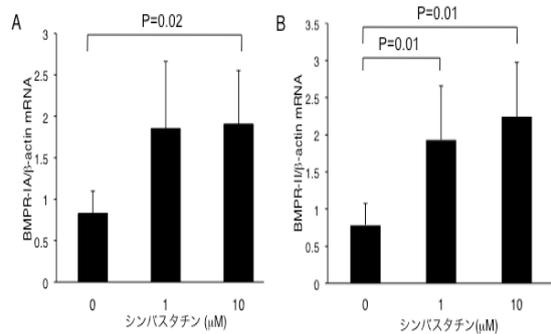


図 3. シンバスタチン存在下の低酸素暴露が肺動脈内皮細胞における BMPR-IA (A) と BMPR-II (B) 遺伝子発現に与える影響の検討

(5) 結語

低酸素暴露が PAH の病態を誘導する機序のひとつとして、肺動脈内皮細胞における BMPR-IA、BMPR-II の発現低下が明らかとなった。また、スタチン系薬剤が PAH の進展を抑制しえる可能性が示された。

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 0 件)
なし

〔学会発表〕 (計 0 件)
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆司 (SATO TAKASHI)
北里大学・医療衛生学部・助教
研究者番号: 90407114

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

桑名 正隆 (KUWANA MASATAKA)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 50245479