

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591574

研究課題名(和文)肺高血圧における癌類似の病変形成と退縮の分子細胞機序の解明：新規動物モデルの検討

研究課題名(英文)Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of occlusive pulmonary vasculopathy

研究代表者

三谷 義英 (MITANI, Yoshihide)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60273380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究1：ヒト肺動脈性肺高血圧(PAH)類似ラットモデルの肺血管病変の進展に血管平滑筋細胞の形質転換と炎症が関連するとの仮説を検証した。PAHラットモデルの病変進行過程において血管平滑筋細胞の形質転換と炎症の関与が示唆された。

研究2：新規エンドセリン受容体拮抗薬マシテンタンによる、ヒトPAH類似肺高血圧ラットの早期ないし後期閉塞肺血管病変の抗リモデリング作用とその分子機序を検討した。マシテンタンは閉塞性肺血管病変を早期治療のみでreverseし、細胞増殖とsurvivinを介する細胞死抵抗性を抑制した。この結果は、有効な治療薬による早期治療の意義を抗リモデリング作用と分子機序の面から支持する。

研究成果の概要(英文)：Project 1-Phenotypically Modulated Smooth Muscle Cells and Related Inflammation in the Development of Experimental Obstructive Pulmonary Vasculopathy in Rats -: We tested the hypothesis that phenotypically modulated smooth muscle cells (SMCs) and related inflammation are associated with the progression of experimental occlusive pulmonary vascular disease (PVD). We concluded that phenotypically modulated SMCs and related inflammation are associated with the progression of experimental obstructive PVD.

Project 2-Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats- We test the hypothesis that a novel endothelin receptor antagonist macitentan reverses the early and/or late stages of occlusive pulmonary vascular disease (PVD) in rats. In conclusion, macitentan reversed early but not late obstructive PVD in rats. This reversal was associated with the suppression of survivin-related resistance to apoptosis and proliferation of cells in PVD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児科学 小児循環器学 肺高血圧 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧 (PAH) は、原発性ないし先天性心疾患、膠原病などに関連して二次性に発症する難治性疾患で、新たな治療法開発には更なる病態解明が重要である。近年、PAH は癌類似の組織病変を特徴とする事が明らかとなったが、その分子細胞機序は不明であり、それらを標的とした治療法の開発は新たなアプローチとして期待される。最近、ヒト PAH 病変に類似する動物モデルが新たに開発され注目される。そこで、本症における癌類似の組織病変の進展・退縮過程の分子細胞機序を解明し、肺高血圧の新たな治療標的を同定する事が本研究の全体構想である。

肺動脈性肺高血圧は、発症時に進行した例が多く、組織学的検討がなされる病変は、移植ないし剖検時であり終末像を呈する為に、**病変の進展過程**の解析に限界があった。最近、endothelin 受容体拮抗薬など選択的肺血管拡張剤の臨床的有効性が確認されるが、血管拡張作用に加え、PAH の**病変を退縮させるか否か、さらに退縮過程**の機序は不明である。最近、ヒト PAH において内膜肥厚、叢状病変において無秩序な増殖性を示す癌組織類似の組織像、遺伝子発現異常を呈する事が報告され、その分子細胞機

序、治療標的の可能性から注目される。さらに、endothelin(ET)受容体は、近年は癌遺伝子として注目され、その拮抗薬は抗癌剤として検討されている。我々はこれまで、内皮機能低下、下流の cGMP、内皮活性化と macrophage の浸潤、血管収縮亢進、プロテアーゼ、平滑筋の形質転換の PAH への関与を動物モデル (Mitani Y. Circulation 1997, Mitani Y. FASEB J 2000, Mitani Y. Eur Respir J. 2000, Mitani Y. J Appl Physiol 2002, Sawada H, Mitani Y. Chest 2007, Mitani Y. J Thorac Cardiovasc Surg 2008)、患者検体 (Mitani Y. Thorax 1999, Mitani Y. Eur Respir J 2001, Mitani Y. Int J Cardiol 2011)を用いて報告した。しかし、従来の動物モデルでは、図の Grade1 の中膜肥厚を認めるが、ヒト PAH に見られる内膜肥厚、叢状病変 (plexiform lesion)は再現されず、無秩序な増殖性を示す癌組織類似の組織像を検討するには新たな動物モデルが必要と考えた。

2. 研究の目的

(1) 組織病変の細胞構成、平滑筋の形質転換、macrophage・T リンパ球浸潤、内皮機能関連遺伝子、癌遺伝子、癌抑制遺伝子発現、endothelin・受容体遺伝子、癌関連遺伝子の発現解析を行う事により治療標的遺伝子を探索し、薬剤により標的遺伝子の同定を行

う。

(2) ヒト PAH で臨床効果が確立し、かつ抗癌剤としても注目される endothelin 受容体拮抗薬投与(Macitentan)により、ヒト類似 PAH 病変における退縮過程の有無と、その分子細胞機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺動脈性肺高血圧類似新規ラットモデルの作成

ラットに血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体チロシンリン酸化酵素阻害剤(Sugen 5416、20mg/kg、1回皮下注)(Sigma)を投与後、1/2 気圧(380 mmHg、10%酸素、標高 5,500m の高山に相当) 2 1 日間の慢性低酸素暴露刺激を加える。Sugen 投与後、3、5、8、13 週後、評価を行い、屠殺、組織採取を行う。低酸素暴露には既報の備品の低酸素チャンバーを用いる(Mitani Y, Maruyama K et al. Circulation 1997)。

(2) **肺高血圧の評価** 心エコー検査、心臓カテーテル検査と右室肥大評価、組織採取 上記肺高血圧モデルを作成した後に、上記病日にラット/マウス用心エコー検査装置(TOSHIBA, NEMIO 35, 12.0 MHz)を用いて左室変形を評価し、静脈麻酔下で内頸

静脈より肺動脈カテーテルないし経胸壁右室穿刺により肺動脈圧、大動脈圧を測定した後、心肺組織を摘出する。心は右心室を左心室より切離し、その重量比から右室肥大を評価する。マウスを気管切開下の人工呼吸下で開胸し、蛋白・RNA サンプル用に右肺動脈・右気管支右を一塊として結紮した後、右室切開によりヘパリン化緩衝液で左肺を脱血還流し、メタノールカルノア(100%メタノール 60ml + クロロホルム 30ml + 酢酸 10ml)で還流固定を行い、パラフィン切片、凍結切片を作成する。(Mitani Y, Maruyama K et al. Circulation 1997)。

(3) 組織の免疫染色

切片の免疫染色は、平滑筋抗体抗 SMA 抗体 1A4(Dako)、平滑筋形質特異的抗体 SM1(Yamasa), SM2(Yamasa), SMemb(Yamasa), HHF35(Enzo), CGA7(Enzo)、マクロファージ抗体 ED1 (Millipore), 抗 PCNA 抗体 PC10(Dako), 抗内皮細胞 vWF 抗体(Millipore), 抗 endothelin 1(Phoenix), ETA 受容体(Almone), ETB 受容体(Almone), MMP2・MMP9 抗体(Santa Cruz), p53 抗体(Dako)、他の癌関連の Wnt/ catenin 系の抗体を

用い、Iso-IHC DAB kit (InnoGenex) により ABC 法並びに共焦点顕微鏡により、既報の方法に準じて行う(Mitani Y, Maruyama K. Eur Respir J. 2001)(Mitani Y, Maruyama K, et al Thorax 1999.)。

(4) mRNA、蛋白発現解析

上記の処置後に肺を摘出し、直ちに液体窒素中で凍結保存する。total RNA を TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて抽出し、逆転写酵素により cDNA を作成し、の発現を既報により PCR 法で評価する。また学内の設備を用いて、Laser microdissection (ARCTURUS, AB applied biosystems) により内膜肥厚、叢状病変の組織を採取し、mRNA の網羅的解析 (pathway-specific TaqMan Array) を行う。ET1, ETA, ETB, MMP mRNA レベルも評価する。

(5) endothelin 受容体拮抗薬の肺高血圧モデルへの影響 (澤田博文、篠原務)

新規 ET A, B 受容体非選択型阻害剤 Macitentan の効果を見る為に、4 群 (sham 処置対照群、Sugen/hypoxia 無治療 PAH 群、Sugen/hypoxia Macitentan 群) を作成する。治療開始は、早期治療群 3 週と後期

治療群 8 週とし、治療開始病日による病変退縮効果の差を各々早期治療群 3-5 週、後期治療群 5-8 週に評価する。

4 . 研究成果

(1) Sugén/hypoxia 肺高血圧モデルにおける、平滑筋のフェノタイプ転換と炎症細胞の関連

【結果】PAH モデルにおいて、右室収縮期圧(RVSP)(86mmHg in 3 週 vs. 135 in 8 週, $p=0.0004$)、細胞性内膜病変(14% in 3 週 vs. 30 in 13 週, $p=0.02$)、線維性内膜病変(0% in 3 週 vs. 6 in 13 週, $p=0.03$)、叢状病変(6.3/切片 in 3 週 vs. 22.5 in 8 週, $p=0.009$)、血管周囲 macrophage 数(0.5 in 3 週 vs. 2.6 in 13 週, $p=0.04$)、macrophage 浸潤内膜割合(0% in 3 週 vs. 22.6 in 13 週, $p=0.02$)は進行性に増加した。内膜病変、叢状病変の内腔面に単層内皮細胞、支持組織に SM actin 陽性細胞を認め、内外弾性版の断裂を認めた。細胞性内膜病変は脱分化平滑筋細胞 (SM1+, SM2 ±, HHHF35+, CGA7 ±)、線維性内膜病変は再分化した平滑筋細胞 (SM1+, SM2+, HHHF35+, CGA7+)、叢状病変は筋芽細胞(SM1 , SM2 , HHHF35 , CGA7 , vimentin+)から構成され、細胞性内膜病変、叢状病変には、増殖性核蛋白(PCNA)陽性細胞、macrophage、vimentin

の発現を認めた。肺組織での炎症性遺伝子 (IL6, $p < .0001$) (MCP1, $p < .0001$)、プロテアーゼ(MMP9, $p < .0001$) (cathepsin S, $p < .0001$)の発現は、初期(3 週)から亢進し、持続ないし進行した。一方、低酸素群の RVSP と炎症性遺伝子発現亢進は限定的で、5 週では対照レベルに低下した。【結語】 PAH ラットモデルの病変進行過程において血管平滑筋細胞の形質転換と炎症の関与が示唆された。

(2) 新規 ET A, B 受容体非選択型阻害剤 Macitentan の早期・後期治療効果とその作用機序の解明

【結果】早期治療研究でマシテンタン治療群は、収縮期右室圧、右室/左室重量比、肺血管閉塞病変の割合、中膜肥厚の割合を、溶媒投与 PH 群と治療前 PH 群の両群より有意に低下(reverse)させた($p < .05$)。一方、後期治療研究ではマシテンタン治療群の肺血管閉塞病変の割合は溶媒群より低下したが($p < .05$)、治療前 PH 群とは有意差なく reverse しなかった。分子機序では、マシテンタン治療は早期・後期治療研究共に閉塞性肺血管病変における細胞増殖マーカー Ki67 発現細胞の割合を低下させたが($p < .05$ vs 溶媒投与群)、早期治療研究のみで

細胞死マーカー-cleaved caspase3 発現細胞の割合を増加させ($p < .05$)、抗細胞死因子 survivin の遺伝子・蛋白発現を抑制した($p < .05$)。薬物の細胞死と細胞増殖への影響は α SMA 陽性細胞で認めた。【結語】マシテンタンは閉塞性肺血管病変を早期治療のみで reverse し、細胞増殖と survivin を介する細胞死抵抗性を抑制した。この結果は、有効な治療薬による早期治療の意義を抗リモデリング作用と分子機序の面から支持する。

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 10 件)

1: 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):L523-538. (査読あり)

2: 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)

3: Sawada H, Saito T, Nickel NP, Alastalo TP, Glotzbach JP, Chan R, Haghghat L, Fuchs G, Januszyk M, Cao A, Lai YJ, Perez VDJ, Kim YM, Wang L, Chen PI, Spiekerkoetter E, Mitani Y, Gurtner GG, Sarnow P, Rabonivitch M.

Reduced BMP2R expression induces GM-CSF translation and macrophage recruitment in human and mice to exacerbate pulmonary hypertension.

J Exp Med 2014 Feb 10;211(2):263-280.

(査読あり)

[学会発表](計 3件)

1: Ask the Experts: What is the Cellular Target in Occlusive Pulmonary Vasculopathy?: New Insights Immature Smooth Muscle Cells Mitani Y.

American Heart Association, Orange county convention center, Orland, USA, 2015. Nov.10)(scheduled)

2: Macitentan Reverses Early Obstructive Pulmonary Vasculopathy in Rats: Early Intervention in Overcoming the Survivin-mediated Resistance to Apoptosis

Shinohara T., Sawada H., Otsuki S., Yodoya N., Kato T., Ohashi H., Zhang E., Saitoh S., Shimpo H., Maruyama K., Komada Y., Mitani Y.

Association for European Pediatric and Congenital Cardiology , Prague convention center, Prague, Czech Republic, 2015.May.22

3: Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells and Related Inflammation in the

Development of Experimental Obstructive Pulmonary Vasculopathy in Rats.

Otsuki S, Sawada H, Yodoya N, Shinohara T, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Yoshida-Imanaka K, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y.

American Heart Association, Dallas convention center, Dallas, USA, 2013.Nov.19.

[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:
出願年月日:
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

三谷義英 (MITANI Yoshihide)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 60273380

(2)研究分担者

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
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