

## 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：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791057

研究課題名(和文)肺高血圧血管病変形成におけるエピジェネティクス制御

研究課題名(英文)The epigenetic control in the vascular lesion formation of pulmonary hypertension.

## 研究代表者

淀谷 典子(YODOYA, Noriko)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40525367

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)：最近開発されたヒト類似の病変を呈するラット肺高血圧モデルを用い、肺高血圧の病態に関与し、また、種々エピジェネティック制御にも関わる、エストロゲンの影響を検討した。エストロゲン投与下での肺高血圧病変形成について検討した。肺高血圧発症前からエストロゲンを投与した群は、肺高血圧病変が抑制され、肺高血圧発症後にエストロゲンを投与した群は、病変の抑制を認めなかった。これより、肺高血圧の病変形成にエストロゲンが関与し、その投与時期が重要であるという知見を得た。病変部位から平滑筋細胞の分離培養を試み、各レベルの血管からの培養法を確立した。これにより、病変形成機序解明のため、細胞レベルの研究が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Recently, a new human pulmonary arterial hypertension (PAH)-like rat model, which mimics pulmonary vasculopathy in human PAH, was reported. Since estrogen has been implicated in the pathogenesis of PAH and epigenetic modification of gene expression, we examined the vascular lesion formation of PAH under the estrogen administration with the rats. In the group received the estrogen before exhibiting PAH, vascular lesions were suppressed, but not in the group received estrogen after exhibiting PAH. We found that estrogen was involved in the pathogenesis of PAH and the timing of administration of estrogen was important. We attempted to separate cultures of smooth muscle cells from each level of the lung vessel and established culture method. This enables the study of cell level to elucidate the pathogenesis mechanisms.

研究分野：小児科学

キーワード：肺高血圧 エストロゲン エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

従来、肺動脈性肺高血圧研究に用いられる動物モデルの血管病変は、中膜肥厚が主体であり、内膜肥厚を来す動物モデルの報告は非常に限られている。最近、血管内皮増殖因子受容体阻害剤 Sugen5416 投与と低酸素環境に暴露されたラットは、内膜肥厚や叢状病変などヒト肺動脈性肺高血圧と類似の病変を形成することが示され、血管内皮の生存が病変形成に重要であることが示唆された。

肺動脈性肺高血圧は bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2) 遺伝子異常や先天性心疾患に伴い発症する難治性の疾患である。病変部位ではフェノタイプの転換した細胞の増殖が認められるが、これらは各細胞機能を担う遺伝子発現プロファイルの変化に基づくものと考えられる。

エピジェネティックな遺伝子発現制御機構が、発ガンをはじめ、種々の疾患モデルにおいて、遺伝子異常と環境因子の間の連関となりうると思われるが、肺高血圧病変形成において関与は不明である。また、エピジェネティクス制御は平滑筋において、増殖、遊走、炎症、マトリックス蛋白合成にかかわる遺伝子発現を制御しうるということが近年示されている。

このようなことから、エピジェネティック制御の変化により、内膜肥厚を伴うラット肺高血圧モデルの病変が形成されるという仮説をたてた。

### 2. 研究の目的

最近開発されたヒト類似の病変を呈するラット肺高血圧モデルを用い、病変形成細胞の遺伝子発現制御機構として、エピジェネティクスと表現形変化の関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)ラット肺高血圧モデルの作成  
血管内皮増殖因子受容体阻害剤 Sugen5416 (20mg/kg) を皮下投与し、続いて低気圧性低酸素 (1/2 気圧、10%酸素相当) に3週間暴露した。その後正常酸素圧に戻し、2週間、5週間、10週間後に評価した。その後、実験的肺高血圧の評価、組織学的評価を行った。心エコーで心拍出量や左室機能の測定、肺高血圧の評価を行い、圧モニター下で右室圧と大動脈圧を測定した。その後、ラットの気管を切開し、人工呼吸器下で開胸した。右室切開により生理食塩水で脱血還流し、一定圧でバリウムゼラチンを注入した後、経気道的に10%ホルムアルデヒドを用いて還流固定を行い、心肺組織を摘出した。心臓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した。肺組織片では、Elastic Van Gieson 法による染色で血管閉塞程度や血管内腔の細胞性増殖程度を評価した。また、細胞腫の同定は、各種抗体 (抗 von Willebrand factor 抗体、抗  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体、抗 proliferating cell nuclear antigen 抗体等)

を用いて行った。

#### (2) 肺動脈平滑筋細胞の分離培養

中枢・分岐部の分離: ラット肺動脈を摘出し、内膜、外膜組織を除去後、1 mm<sup>2</sup> の小切片とし、explant 法にて分離した。  
末梢部の分離: 肺動脈に酸化鉄とアガロース、気管にアガロースを注入した。その後、肺外側を分離して1 mm<sup>2</sup> の小切片とし、collagenase とマグネットを用いて分離した。培養は、D-MEM/F-12 / 10%ウシ血清にて行い、2-5代の細胞を用いた。  
平滑筋細胞の同定は、抗  $\alpha$ -smooth muscle actin 抗体と抗カルポニン抗体を用いて行った。

#### (3) ラット肺高血圧モデルのエストロゲン投与下での肺高血圧病変形成の評価

エストロゲン暴露により、種々の細胞腫において、エピジェネティックな遺伝子発現変化がもたらされる事に着目し、エストロゲン投与の影響を検討した。

エストロゲン早期投与群として、肺高血圧を呈する2群と呈さない2群 (合計4群) を作成した。肺高血圧を呈する2群は、卵巣を摘出し、その1週間後に肺高血圧モデルを作成し、それを卵巣摘出と同時に浸透圧ポンプを皮下に留置し、75  $\mu$ g/kg/day の 17  $\beta$ -estradiol を4週間持続投与した群、17  $\beta$ -estradiol の溶解液である 1,2 propandiol を4週間持続投与した群とした。肺高血圧モデルは、血管内皮増殖因子受容体阻害剤 Sugen5416 (20mg/kg) を皮下投与し、続いて低気圧性低酸素 (1/2 気圧、10%酸素相当) に3週間暴露することにより作成した。また、肺高血圧を呈さない群は、卵巣摘出1週間後、Sugen5416 の溶解液を皮下投与し、大気下で3週間飼育し、卵巣摘出と同時に浸透圧ポンプを皮下に留置し、75  $\mu$ g/kg/day の 17  $\beta$ -estradiol を4週間持続投与した群、1,2 propandiol を4週間持続投与した群とした。エストロゲン後期投与群も4群作成した。ラットの卵巣を摘出し、1週間後に肺高血圧モデルを上記と同様の方法で作成した。その後、浸透圧ポンプを皮下に留置し、75  $\mu$ g/kg/day の 17  $\beta$ -estradiol を5週間持続投与した群、1,2 propandiol を5週間持続投与した群を作成した。また、卵巣摘出1週間後、Sugen5416 の溶解液を皮下投与し、大気下で3週間飼育し、その後に浸透圧ポンプを皮下に留置し、75  $\mu$ g/kg/day の 17  $\beta$ -estradiol を5週間持続投与した群、1,2 propandiol を5週間持続投与した群を作成した。

実験的肺高血圧の評価と組織学的評価は、

(1)と同様の方法で行った。

### 4. 研究成果

ラット肺高血圧モデルから、叢状病変や内膜肥厚を伴う病変形成が確認され、さらに病変形成に炎症細胞や平滑筋細胞の表現型の変

化を伴うという知見を得た。  
次に、これらの変化の分子基盤として、エピジェネティクス制御の関与を検討するため、病変部位から平滑筋細胞の分離培養を試み、各レベルの血管からの培養法を確立した。培養平滑筋細胞で、炎症関連分子、細胞増殖分子の発現を検討したが、大きな発現量の差異は認めなかった。  
エストロゲン投与下での研究においては、早期投与群では肺高血圧病変は抑制され、後期投与群では抑制されないという知見を得た。肺高血圧の病変形成にはエストロゲンが関与していることが示唆され、その投与時期が肺高血圧の病変形成に大きく関与しているという知見を得、今後さらにその機序を検討する予定である。

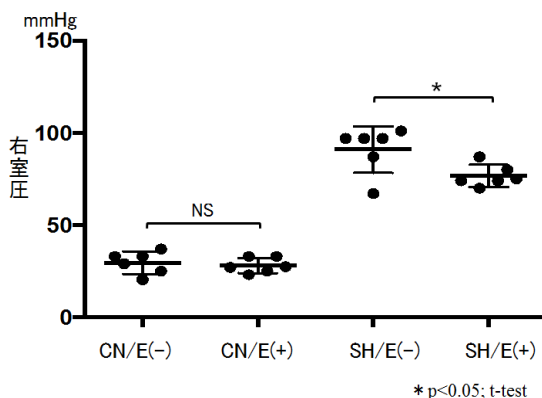


図1. エストゲン早期投与群の右室圧  
CN/E(-): 溶媒 + 大気下, 1, 2propandiol 投与群、CN/E(+): 溶媒 + 大気下, estradiol 投与群、SH/E(-): Sugen+低酸素暴露, 1, 2propandiol 投与群、SH/E(+): Sugen+低酸素暴露, estradiol 投与群

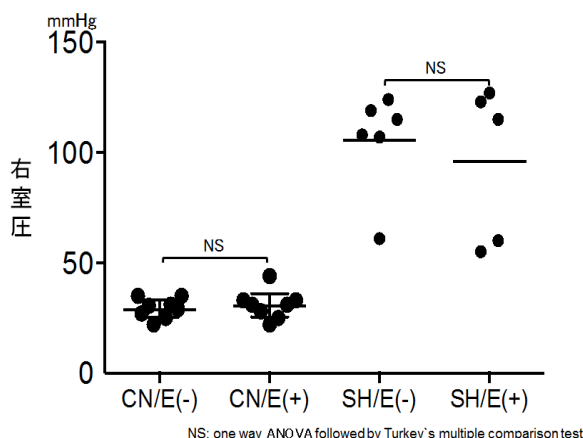


図2. エストゲン後期投与群の右室圧  
CN/E(-): 溶媒 + 大気下, 1, 2propandiol 投与群、CN/E(+): 溶媒 + 大気下, estradiol 投与群、SH/E(-): Sugen+低酸素暴露, 1, 2propandiol 投与群、SHE(+): Sugen+低酸素暴露, estradiol 投与群

## 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 2 件)

篠原 勉、澤田 博文、大槻 祥一郎、淀谷 典子、加藤 太一、大橋 啓之、Zhang Erquan、齋藤 伸治、新保 秀人、丸山 一男、駒田 美弘、三谷 義英. 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*. 査読有、2015 Mar 15; 308(6): L523-38  
DOI: 10.1152/ajplung.00129.2014.Epub 2014 Dec 24.

大槻 祥一郎、澤田 博文、淀谷 典子、篠原 務、加藤 太一、大橋 啓之、Erquan Zhang、今中-吉田 恭子、新保 秀人、丸山 一男、駒田 美弘、三谷 義英. Potential contribution of phenotypically modulated smooth muscle cells and related inflammation in the development of experimental obstructive pulmonary vasculopathy in rats. *PLoS One*. 査読有、2015 Feb 25; 10(2):e0118655.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0118655. eCollection 2015.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

淀谷 典子 (YODOYA Noriko)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40525367

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：