

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15318

研究課題名(和文)肺高血圧症におけるポリアミン系活性化の意義解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)The importance of polyamine activation in pulmonary hypertension

研究代表者

酒井 俊(SAKAI, Satoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30282362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症では、肺動脈血管平滑筋細胞の増殖が認められる。メタボローム解析から、低酸素誘発性肺高血圧マウス肺のポリアミン濃度が有意に増加していた。マイクロアレイ解析により、代謝酵素S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ遺伝子の著明な発現亢進が生じていること認められた。以上より、ポリアミン濃度増加は基質である脱炭酸化S-アデノシルメチオニンの合成亢進に起因し、そこにS-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼの活性亢進が関与していると考えられた。ポリアミンはガン細胞の増殖に関与している。よってPAHでの肺動脈血管平滑筋細胞増殖にも上記機序を介したポリアミン増加が関係していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It occurs that marked increase of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) in pulmonary arterial hypertension (PAH). By metabolomics analysis, the concentration of polyamine was significantly elevated in the lungs of hypoxia-induced PAH mice. By microarray analysis, the gene expression of S-adenosyl methionine decarboxylase in the lungs was markedly increased in PAH mice. Taken together, the augmentation of polyamine concentration would be due to the increased synthesis of decarboxylated S-adenosyl methionine, which was induced by the enhanced activity of S-adenosyl methionine decarboxylase. Because polyamine contributes to the proliferation of cancer cells, the increase of polyamine production in the lungs would also be involved in the enhanced proliferation of PASMCs in PAH, probably in a similar fashion.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧症 ポリアミン メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は肺動脈血管内皮細胞 (PAEC)・血管平滑筋細胞 (PASMC) の著明な増殖による肺動脈壁肥厚・血管閉塞を本態とし、それにより肺血管抵抗・肺動脈圧上昇を呈する難治性疾患である。

(2) 細胞増殖を主とする病態には「ガン」があるが、ガン組織の代謝経路では Warburg 効果と称される嫌気性代謝の亢進が認められる。このために細胞増殖に必須の核酸合成促進に関与する代謝経路の亢進が生じると共に、ミトコンドリアの TCA 回路での酸化的リン酸化抑制による活性酸素種産生の減少に伴い細胞死は抑制され、そのために細胞増殖活性が増加する。

(3) 上述の通り、PAH では肺動脈における細胞成分の著明な増殖が認められるが、これらの増殖細胞における代謝変動の詳細は、不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) PAH モデル肺における代謝変動を網羅的に解析し、どのような経路が有意に変動しているか明らかにすること。

(2) 代謝産物の変動から、どの代謝酵素が変化し PAH の病態形成に関与しているかを明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 低酸素誘発性肺高血圧モデルの作製と評価 低酸素チャンバーを用い、酸素濃度 10%となるようにして、その中で 8 週齢の雄 C57BL6J マウスを 3 週間飼育した。対照マウスは室内気で同期飼育した (各群 n=8)。

(2) 肺高血圧の評価は、右室圧測定と左室・右室重量の測定により行った。

(3) 肺高血圧の評価後、肺組織・右心室を液

体窒素にて凍結後冷凍保存し、後のメタボローム解析・マイクロアレイ解析に供した。

(4) 網羅的代謝産物測定 (メタボローム解析) は、凍結肺組織 100mg を用いて、キャピラリー電気泳動法と質量分析計を用いて測定した (HMT 社によるメタボローム解析を利用)。

(5) 網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ解析) は、肺から total RNA を抽出した後、その RNA を用いて行った (東レ社による 3D-Gene を利用)。

4. 研究成果

(1) 低酸素誘発性肺高血圧モデルの作製と評価 酸素濃度 10%の条件で 3 週間飼育すると、低酸素マウスの右室収縮期圧は対照マウスに比べ有意に高値であった (32 ± 4 [mmHg] vs 19 ± 3 , $P < 0.01$)。また低酸素マウスの右室重量-脛骨長比も有意に高値であった (14 ± 2 [mg/cm] vs 9 ± 2 , $P < 0.01$)。以上より、低酸素負荷によりマウスは肺高血圧を呈し、それに伴い右室肥大を呈することが明らかになった。

(2) メタボローム解析 メタボローム解析により、ポリアミン類が肺高血圧マウス肺において有意に増加していた (プロレシン 24 ± 4 [AU] vs 14 ± 3 ・スペルミジン 58 ± 3 [AU] vs 47 ± 4 ・スペルミン 30 ± 4 [AU] vs 21 ± 4 , $P < 0.05$, 各群 n=3)。一方、この実験条件下では、低酸素誘発性肺高血圧マウス肺において、嫌気性代謝の亢進、および TCA 回路内の代謝産物の低下は明らかではなかった。

(3) マイクロアレイ解析 ポリアミンの代謝は、オルニチンから始まりプロレシン・スペルミジン・スペルミンへと、それぞれの合成酵素により合成されていく。その際、脱

炭酸化 S-アデノシルメチオニンが基質として必要となるが、これは代謝酵素 S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼにより S-アデノシルメチオニンを基質として合成される。これら一連のポリアミン経路において、S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼの発現が著しく亢進していたことが、マイクロアレイ解析により明らかとなった。この酵素遺伝子の発現亢進は、リアルタイム PCR でも確認された。

(4) 以上より、肺高血圧マウス肺では代謝産物としてポリアミンの組織濃度が上昇しており、そこには、S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼの発現亢進によりポリアミン合成の基質となる脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンの産生が増加していると考えられる。

(5) ポリアミンは、ガン細胞の増殖に関与すると考えられている。よって、肺動脈血管平滑筋・新生内膜増殖が認められる肺動脈性肺高血圧の病態では、ポリアミンの産生増加がこれらの細胞増殖に関与していると推察された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Tanabe N, Ikeda S, Tahara N, Fukuda K, Hatano M, Ito H, Nakayama T, Anzai T, Hashimoto A, Inoue T, Kajinami K, Kihara Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Murohara T, Okazaki O, Sakai S, Satoh T, Takeda Y, Takeishi Y, Taniguchi M, Watanabe H, Yamamoto T, Yamauchi-Takahara K, Yoshioka K, Sasayama S. Efficacy and Safety of an Orally Administered Selective Prostacyclin Receptor Agonist, Selexipag, in Japanese Patients With

Pulmonary Arterial Hypertension, *Circ J* 2017 (in press). 査読有 DOI:

10.1253/circj.CJ-16-1348

Tahara N, Dobashi H, Fukuda K, Funauchi M, Hatano M, Ikeda S, Joho S, Kihara Y, Kimura T, Kondo T, Matsushita M, Minamino T, Nakanishi N, Ozaki Y, Saji T, Sakai S, Tanabe N, Watanabe H, Yamada H, Yoshioka K, Sasayama S. Efficacy and Safety of a Novel Endothelin Receptor Antagonist, Macitentan, in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension, *Circ J* 2016; 80: 1478-83. 査読有 DOI: 10.1253/circj.CJ-15-1305

Sakai S, Maruyama H, Kimura T, Tajiri K, Honda J, Homma S, Aonuma K, Miyauchi T. Antagonists to endothelin receptor type B promote apoptosis in human pulmonary arterial smooth muscle cells, *Life Sci* 2016; 159: 116-20. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2016.03.044

Maruyama H, Dewachter C, Sakai S, Belhaj A, Rondelet B, Rimmelink M, Vachier JL, Naeije R, Dewachter L. Bosentan reverses the hypoxia-induced downregulation of the bone

morphogenetic protein signaling in pulmonary artery smooth muscle cells, *Life Sci* 2016; 159: 111-5. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2016.05.018

Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T. p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis, *J Dermatol Sci* 2016; 83: 226-33. 査読有 DOI:

10.1016/j.jdermsci.2016.05.005

Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno NI, Yamagata K, Sakai S, Yanagawa T, Bukawa H.

MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis, J Oral Pathol Med 2016; 45: 248-55. 査読有 DOI: 10.1111/jop.12351

Maruyama H, Dewachter C, Belhaj A, Rondelet B, Sakai S, Remmelink M, Vachery JL, Naeije R, Dewachter L. Endothelin-Bone morphogenetic protein type 2 receptor interaction induces pulmonary artery smooth muscle cell hyperplasia in pulmonary arterial hypertension, J Heart Lung Transplant 2015; 34: 468-78. 査読有 DOI: 10.1016/j.healun.2014.09.011

[学会発表](計7件)

Otsu K, Sakai S, Kimura T, Miyauchi T, Homma S, Aonuma K. The decrease of S-wave amplitude in V5 lead of electrocardiography positively reflects effectual treatment in patients with pulmonary hypertension. 第81回日本循環器学会学術集会 2017.3.19. 石川県立音楽堂・石川県・金沢市

Sakai S, Kimura T, Honda J, Tajiri K, Homma S, Aonuma K, Miyauchi T. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates pulmonary hypertension partly via eNOS activation. 12th International Symposium of Vasodilation 2016.11.7. Rochester, MN, USA

Maruyama H, Sakai S, Naeije R, Dewachter L, Aonuma K. Lysyl oxidase was increased by endothelin-1 and

restored by PGI2 in pulmonary artery smooth muscle cells. Congress of European Society of Cardiology. 2016.8.30. Rome Italy

Maruyama H, Sakai S, Naeije R, Dewachter L, Aonuma K. Hypoxia induces the downregulation of the BMP signaling in pulmonary artery smooth muscle cells through the endothelin system. Congress of European Society of Cardiology. 2016.8.30. Rome Italy
酒井俊、本田洵也、丸山秀和、木村泰三、田尻和子、本間覚、青沼和隆、宮内卓 肺高血圧進展における Pin1 (Peptidyl isomerase)の役割 第4回日本肺循環学会・第3回日本肺高血圧学会合同学術集会 2015.10.3 東京ステーションコンファレンス・千代田区・東京

Sakai S, Maruyama H, Honda J, Kimura T, Tajiri K, Miyauchi Y, Homma S, Aonuma K, Miyauchi T. Effects of endothelin receptor antagonists on doxorubicin-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells derived from human pulmonary artery. 14th International Conference on Endothelin. 2015.9.2. Savannah, GA, USA

Maruyama H, Dewachter C, Sakai S, Naeije R, Dewachter L. Bosentan reverses the hypoxia-induced downregulation of the bone morphogenetic protein signaling in pulmonary smooth muscle cells. 14th International Conference on Endothelin. 2015.9.2. Savannah, GA, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 俊 (SAKAI, Satoshi)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30282362