

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15627

研究課題名(和文)先天性心疾患関連肺高血圧症の肺生検標本を用いた発症機序解明と新たな治療法の探求

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of pulmonary arteriopathy associated with congenital heart diseases and development of new treatment using lung biopsy specimens

研究代表者

齋木 佳克 (Saiki, Yoshikatsu)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50372298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性心疾患(CHD)に伴う肺動脈性肺高血圧(PAH)の組織形態学的な変化の特徴として、肺動脈絞扼術により肺動脈病変のreverse remodelingが認められること、21トリソミー患者と非21トリソミー患者で閉塞性肺血管病変の進行度に差がないこと、CHDに伴うPAHのメカニズムに微小血栓性病変が関与している可能性があることが示された。分子生物学的メカニズムの検証のためレーザーマイクロダイセクション法を用いたRNA抽出を試みたが、パラフィン切片から安定した十分量のRNA抽出は困難であった。今後、免疫組織化学的検証等を用いCHDに伴うPAH発症のさらなるメカニズム解明に努めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性心疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症における肺血管病変の組織学的特徴が示されたことにより、各症例に応じより良い治療選択が可能になる可能性が示された。加えて肺血管拡張薬のみならず、呼吸器やその他に対するアプローチの必要性や、これまでにそれほど重要視されていなかった血栓性病変に対する新たなアプローチの可能性が示唆された。今後、免疫組織化学的手法等より肺血管病変進行のさらなるメカニズム解明が進めば、新たな治療標的として新薬開発にもつながることが期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the following histopathological findings in the patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) associated with congenital heart diseases (CHD) using lung biopsy specimens. Pulmonary artery banding can induce pulmonary vascular reverse remodeling as demonstrated by significant pulmonary artery medial thinning and improvement in intimal lesions. In addition, early progression of pulmonary arteriopathy in patients with trisomy 21 was not proved compared with patients without trisomy 21. Moreover, microthrombotic lesions were detected in 7% of patients with CHD and these lesions would be associated with the progression of PAH. We could not demonstrate the mechanisms of the PAH progression by the molecular biological methods using laser microdissection method and DNA microarray. We will perform further investigation and clarify novel mechanisms of the progression of PAH with CHD.

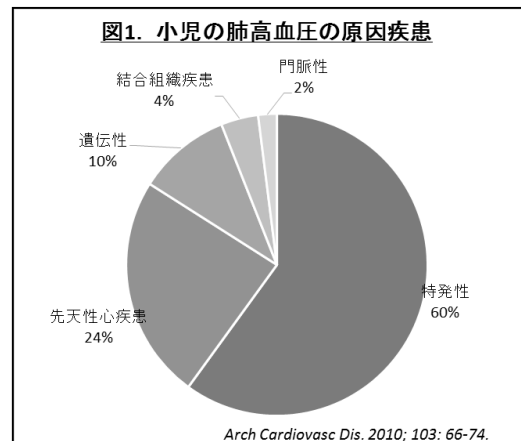
研究分野：心臓血管外科学分野

キーワード：先天性心疾患 肺動脈性肺高血圧症 肺生検

## 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧(PAH)の原因として特発性(IPAH)、遺伝性、結合組織病に伴うものなどのほかに、先天性心疾患(CHD)に伴うものがあげられる。とりわけ小児においては図1のごとく肺高血圧症におけるCHDの割合が多い。治療面では、これまでプロスタノイド系、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ阻害薬の3系統の薬剤が使用可能となり、その治療成績の改善が目覚ましい。しかし小児PAHに関しては必ずしも血管拡張剤の有用性の検証が十分とはいえず、成人を対象とした治療アルゴリズムを改変して応用するなど現段階においても定まっていない。また、患者個々に応じ有効な治療薬が異なることも多く経験し、治療薬選択は手探りの状態である。さらに、治療成績が改善している現在においても治療薬が功を奏さず、肺移植を要する例や不良な転帰をたどる症例も多い。このため、肺高血圧治療薬の適切な選択法の指針の作成、新たな治療標的の模索、さらには、新たな治療薬の開発が小児PH治療の現場においては急務であるといえる。東北大学心臓血管外科では、これまでに約1900例の全国のPAHの肺生検診断を行ってきた。本研究では、これらの肺生検標本を使用し、先天性心疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症における肺血管病変の組織形態学的な変化を検索するとともに、免疫組織化学的解析、分子生物学的解析を加え、未だ解明されていない病変進行の機序解析を行う。

また近年IPAHの血管病変進行の機序に血管内皮細胞の抗アポトーシス能獲得と、それに伴う細胞のモノクローナルな異常増殖の関与が示唆されている。また、血管病変部において核内受容体であるPeroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) の発現低下がみられることも報告されている。しかし、CHDに伴うPAHにおいては内皮の抗アポトーシス能の獲得やPPARの発現低下が病変の進展に寄与しているかどうかは未だ解明されていない。我々はこれらに着目し、CHDにおける高肺血流、高肺動脈圧による肺動脈内皮細胞の障害、それに続くPPARの発現抑制が、内皮細胞のアポトーシス抑制、さらには、PAHをもたらす重要な経路であるという仮説をたて検証することとした。



## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに蓄積された肺生検標本を用い、先天性心疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症の組織学的な特徴をまとめるとともに、レーザーマイクロダイセクション法、DNA microarray法を応用して肺血管病変進展の分子機序解明をする。また近年肺血管病変の進展に血管内皮のアポトーシス制御機構の破綻が示唆されている。本研究ではこのカスケードの上流にあるPPAR- signalingに着目し、先天性心疾患における肺血管病変進展への関与の解明を行う。さらに動物モデルにおけるPPAR- アゴニストによる肺血管病変進行の抑制効果を検証し、新たな治療標的としての意義を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)CHDに伴う肺血管病変の病理組織形態学的特徴に関する検討

これまでの報告で、CHD患者ではより早期に複雑病変(plexiform lesionやmedial necrosisなど)が出現することが分かっているが疾患別の組織学的変化や特徴はまだ十分には明らかになっていない。本研究ではより多くの標本をまとめることで、その組織学的な特徴を明らかにし、その進展の機序や治療介入に関する足掛かりとする。

これまでである約1900例の標本を後方視的に検討し、従来より我々が使用している肺高血圧症の組織評価項目を中心に両群における病理組織学的な差異を抽出し、まとめる。具体的には、患者情報の収集 - 術前診断、罹患期間、肺動脈圧、肺血管抵抗値を収集する。

病理組織学的特徴の抽出 - a)中膜の肥厚度(DR=100 $\mu$ m)、b)IPVD、c)複雑病変の有無、d)肺小静脈病変の有無、e)中膜萎縮の有無

### (2)分子生物学的解析による肺血管病変進展の機序解明

LMD法、DNA microarray法を用いた肺血管病変進展の分子機序解明  
 パラフィンブロックを通常(3 $\mu$ m)よりも厚く(10 $\mu$ m)薄切し、RNAが十分に採取できるようスライドガラスのサンプルを作成する。LMDにより標的となる血管部分を選択的に抽出する。PureLink™ FFPE RNA Isolation Kitを用い、ホルマリン固定したパラフィンブロックよりRNAを抽出する。RNA Amino-allyl MessageAmp aRNA kitでRNAを増幅し、Fluorolink Cy3/Cy5 monofunctional Dye 5-PacksでCy3/Cy5を標識後、gene chip systemに適用する。正常部内膜とのCy3/Cy5の

蛍光強度比が GAPDH-DNA における蛍光強度比に比し有意に高いとき、その遺伝子発現の亢進ありと判定する。病変部内膜のみに発現が亢進している分子を大規模にスクリーニングする。

PPAR- signaling の先天性心疾患における肺血管病変進展への関与の検証  
 上記と平行して、シアストレスなどによる内皮細胞の障害、それに続く肺動脈系における PPAR- の発現低下が、血管内皮細胞のアポトーシス抑制や MEK-ERK signaling 抑制系の破たんに伴う細胞浸潤、細胞増殖につながり、肺血管病変の進展に寄与していることを証明する。上記同様にレーザーマイクロダイセクション法を用い、ホルマリン固定されたパラフィンブロックの肺動脈組織から選択的に RNA を抽出する。正常肺動脈壁と病変を有する肺動脈壁において上記 PPAR-、caspase3、MEK、ERK の遺伝子発現量を Quantitative real time PCR を用い解析し、その経路の関与を証明する。

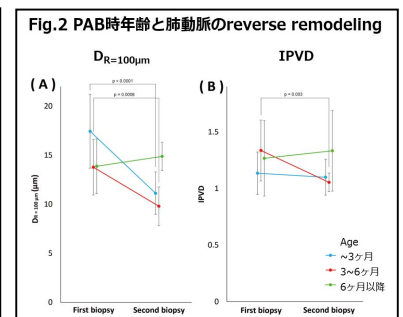
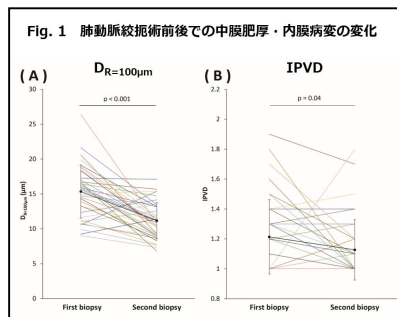
### (3) 動物実験による PPAR- アゴニストによる肺血管病変進行の抑制効果の検討

上記の分子生物学的機序解明の検討を行いつつ、動物実験も併行して行い、PPAR- アゴニストの肺血管病変進行の抑制効果を検討する。これまでもモノクロタリンを用いたラット肺高血圧モデルを用い、虚血再灌流障害に対するロスバスタチンの有効性を示してきた。本研究ではこのラットモデルに加え、腹部大動脈-下大静脈シャントによる高肺血流性肺高血圧ラットモデルも併用し、モデル間での肺高血圧進展に対する PPAR 経路の関与の差異と、それに対する PPAR アゴニストの有効性を検討する。

## 4. 研究成果

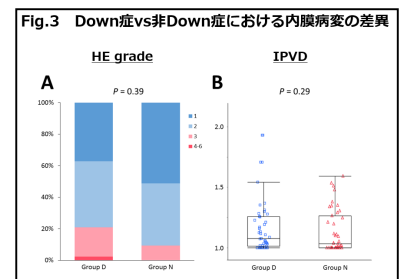
### (1) CHD に伴う肺血管病変の病理組織形態学的特徴に関する検討

肺動脈絞扼術による肺動脈の reverse remodeling に関して  
 肺動脈絞扼術は現在の臨床でも標準的に行われている姑息術の一つであるがそれに伴う肺血管の変化自体は十分に検証がなされていなかった。肺動脈絞扼術前後で肺生検が施行されている 34 症例の肺動脈形態を検証した結果、肺動脈の内膜病変、中膜肥厚の程度が肺動脈絞扼術により有意に改善する傾向がみられた (Fig.1)。年齢を階層化してみるとその reverse remodeling は肺動脈絞扼術の時期が遅くなるほど見られにくいことが示された (Fig.2)。



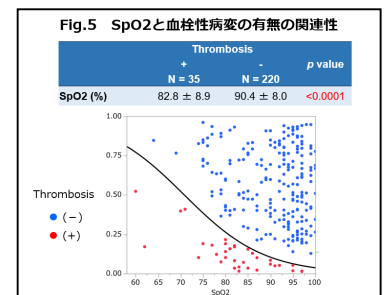
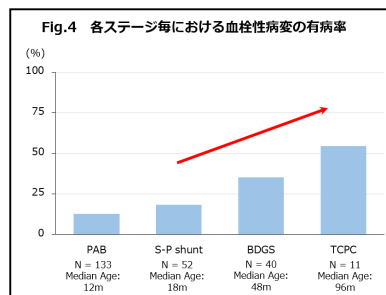
### Down 症患者における肺血管病変の実態

Down 症は通常に比べ肺血管病変の進行が早くそれに伴い肺高血圧症が進行しやすいことが言われているが、VSD/AVSD 症例 272 例を Down、non-Down に分けて後方視的に検証した結果、内膜病変自体に両群間に差を認めなかった (Fig.3)。閉塞性肺血管病変の進行以外の呼吸器系の要素などが臨床的肺高血圧進行に大きく寄与している可能性が示唆された。



### 先天性心疾患症例における肺小動脈内の血栓性病変のリスク解析

先天性心疾患症例における血栓性病変の頻度、リスクに関しては報告されていない。先天性心疾患症例 1168 例を検証した結果、81 例(6.9%)に血栓性病変を認めた。年齢が高く、チアノーゼ性心疾患症例に多いことが分かった。また単心室症例を見ていくと、PAB/BTS(13-31%)、BDG(36%)、Fontan(55%)と各 stage を経る毎に血栓性病変を有する症例の頻度が増加し、SpO2 低下、Hb 上昇と有意な相関関係を認めた (Fig.4, 5)。単心室症例ではより良い Fontan 循環確立のために肺血管床をいかに良い状態に維持するかが重要であり、抗凝固療法や抗血小板薬などの重要性が示唆された。



### (2) 分子生物学的解析による肺血管病変進展の機序解明

分子生物学的メカニズムの解明に向けて、レーザーマイクロダイセクション法を用いた RNA 抽

出を試みた。病変を有する肺動脈自体をレーザーマイクロダイセクション法を用いて選択的に抽出することは可能であったが、病変が非常に小さいことに加え、長期にわたり保管された組織サンプルであり、ホルマリン固定された非常に小さなパラフィン切片から安定した十分量のRNA抽出は困難であった。それに伴いマイクロアレイを実施することが困難であった。

(3) 動物実験による PPAR- アゴニストによる肺血管病変進行の抑制効果の検討  
モノクロータリンを用いた肺高血圧ラットモデルは作製可能であった。モデルにおいてコントロールに比べ安定して肺動脈の中膜肥厚が観察された。動物モデルは作製し肺組織は摘出したが、本研究においては前段階であるヒトにおける CHD に伴う肺動脈性肺高血圧症に PPAR-signaling が関与しているかが十分に明らかにできずそこまでの実験を進めるに至らなかった。

今後も免疫組織化学的手法や in situ hybridization 法などを用いて CHD に伴う肺動脈性肺高血圧症の新たな発症メカニズムの解明を進め、新たな治療法の確立などに役立てていければと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Masaki Naoki, Saiki Yuriko, Endo Masato, Maeda Kay, Adachi Osamu, Akiyama Masatoshi, Kawamoto Shunsuke, Saiki Yoshikatsu. Is Trisomy 21 a Risk Factor for Rapid Progression of Pulmonary Arteriopathy? - Revisiting Histopathological Characteristics Using 282 Lung Biopsy Specimens. *Circ J.* 2018 May 25;82(6):1682-1687. doi: 10.1253/circj.CJ-17-0754. (査読有)

2. Masaki Naoki, Saiki Yuriko, Endo Masato, Maeda Kay, Adachi Osamu, Akiyama Masatoshi, Kawamoto Shunsuke, Saiki Yoshikatsu. Evidence of Pulmonary Vascular Reverse Remodeling After Pulmonary Artery Banding Performed in Early Infancy in Patients With Congenital Heart Defects. *Circ J.* 2018 Feb 23;82(3):684-690. doi: 10.1253/circj.CJ-17-0379. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 第 25 回小児肺循環研究会(2019/2/9, 東京), 肺生検病理診断から得られる新たな知見  
正木直樹, 齋木由利子, 遠藤雅人, 前田恵, 齋木佳克

2. AHA Scientific Sessions 2017 (2017/11/11-15, Anaheim), Progression of Vascular Remodeling in Pulmonary Vein Obstruction: Role of mTOR Pathway Activation and Smooth Muscle Cell Dedifferentiation  
Naoki Masaki, Osamu Adachi, Shintaro Katahira, Katsuhiro Hosoyama, Shingo Takahara, Satoshi Kawatsu, Yuriko Saiki, Akira Horii, Shunsuke Kawamoto, Yoshikatsu Saiki

3. AHA Scientific Sessions 2016 (2016/11/12-16, New Orleans), Is trisomy 21 a risk factor for rapid progression of pulmonary arteriopathy? - revisit of histopathological characteristics based on 272 lung biopsy specimens  
Naoki Masaki, Yuriko Saiki, Masato Endo, Kay Maeda, Osamu Adachi, Masatoshi Akiyama, Shunsuke Kawamoto, Yoshikatsu Saiki

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川本 俊輔

ローマ字氏名：Kawamoto Shunsuke

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20400244

研究分担者氏名：堀井 明

ローマ字氏名：Horii Akira

所属研究機関名：東北大学  
部局名：医学系研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：40249983

研究分担者氏名：遠藤 雅人  
ローマ字氏名：Endo Masato  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：医学系研究科  
職名：非常勤講師  
研究者番号（8桁）：90282128

研究分担者氏名：齋木 由利子  
ローマ字氏名：Saiki Yuriko  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：医学系研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：80311223

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。