

令和元年6月3日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19660

研究課題名(和文)肺動脈性肺高血圧症における線維性血管閉塞病変に対する治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic agent for fibrotic vascular occlusion in pulmonary arterial hypertension

研究代表者

篠原 務 (Shinohara, Tsutomu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50745932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧は、肺の血管の内腔が狭くなり血液が流れにくくなるために心臓に負担がかかり、最終的に心不全をきたす疾患である。具体的には生まれつきの心臓病がその原因の一つに挙げられる。病状が進行すると、肺の血管は細胞が線維に置き換わり不可逆的、つまり不治の病になる。そのメカニズムは不明であり、その機序を解明できれば新たな治療薬の開発が期待できる。我々はラットにこの肺高血圧を発症させ、その機序を調べたところ、ファイブロネクチンやコラーゲン1というタンパクの増加が線維化と関わっていることが分った。今後さらにその詳細について調べていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症は、病気の進行とともに肺の血管が線維化をきたす。一方で、現在の治療薬は病気がすでに進行している場合、その効果が低下するという限界がある。そこで、我々は肺血管を線維化させない、または線維化した肺血管を元に戻すような新たな治療薬を探索している。今回の研究結果により肺血管の線維化の原因の一つが示され、今後の治療薬の開発のヒントの一つとして提示できた。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary hypertension is a disease that the lumens of blood vessels in the lungs become narrow and ultimately causes heart failure. For example the congenital heart diseases for children lead to pulmonary hypertension. As the disease progresses, the vessels of lungs are replaced by fibers and become irreversible or incurable. But the mechanism is unknown. If we can elucidate the mechanisms, we might be able to develop new therapeutic drugs. We investigated the mechanism of fibrosis of lung vessel in pulmonary hypertension using rats. We found that the protein of fibronectin and collagen1 increase in lung vessels. I would like to investigate the details further in the future.

研究分野：肺動脈性肺高血圧

キーワード：肺血管 線維化

## 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症の病態は血管の収縮だけでなく、肺細動脈のリモデリングによる閉塞性血管病変を特徴とする。現在、肺高血圧治療薬にはエンドセリン系、一酸化窒素系、プロスタサイクリン系が存在し、全系統のメタ解析において、生存率を改善させることが示されているが、治療開始時点で進行した例では特に予後が悪いことが示されており、現治療薬に対する抵抗性が指摘され、新たな治療ターゲットが社会的に求められている。

本疾患の閉塞性血管病変に対する治療効果の証明は、肺高血圧を伴う先天性短絡心疾患に対して、肺動脈絞扼術と根治術の際に採取した肺生検病理組織を比較する、外科的な治療効果の検討が唯一存在するのみである。その結果は、肺動脈絞扼術により肺血流を制限することで“細胞性”血管閉塞病変はリバースリモデリングを起こすが、“線維性”血管閉塞病変はリバースされないと報告されている。つまり治療抵抗性の原因としての線維性血管閉塞病変の発現をいかに克服するかが問題となる。

線維性血管閉塞病変の病態に関する過去の論文報告はわずかに存在するが、病期進行例での肺病理組織を用いた検討であり、その時点での検体では病態の終末を見ている可能性があり、発現メカニズムの同定には限界がある。すなわち、ヒト病理組織を用いた線維性血管閉塞病変の発現に対する病態解明の限界は、その発現時期が同定できず、発現前後での経時的な解析ができない点にある。一方、肺高血圧動物モデルにおいてSugen/Hypoxia ラットモデルの登場は、これまでの肺高血圧モデルでは再現できなかった血管新生内膜における線維性増殖による閉塞病変の再現を可能とし、その発症時期も特定されやすいため、線維性血管閉塞病変の発症メカニズムの病態解明が期待できる。これまでに、Sugen/Hypoxia ラットモデルを用いた“細胞性”血管閉塞病変を主にした研究はいくつもなされているが、“線維性”血管閉塞病変に対する治療研究は、我々がエンドセリン受容体拮抗薬による発現予防効果を示したのみであり、その他に我々の知る限りでは世界的にまだなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞増殖性から線維性へと経時的に発現する閉塞性血管病変の線維化に関わる遺伝子群を新規に同定し、治療抵抗例に対する新たな治療ターゲットを解明したい。

本研究の独創性は、肺動脈性肺高血圧症患者の一連の肺生検が倫理的に不可能であるという制限の中で解明されにくかった線維性血管閉塞病変の発現メカニズムを、近年報告されたヒト類似動物モデルを用いることで解明し、最終目標は線維化に対する治療薬を創薬することにある。我々は世界に先駆けて生体内における線維性血管閉塞病変の予防効果を示したが、その際に行った“肺組織全体を用いた”遺伝子発現の検討においては、その発現・予防のメカニズムを解明することはできなかった。そこで本研究ではさらにその局在を絞って、顕微鏡下にマイクロダイセクション法を用いることで“閉塞血管病変のみ”を経時的に採取する。そして閉塞血管の線維化に関わる特有の遺伝子発現を同定し、血管の線維化を予防する治療薬を開発する。本研究結果により、線維性血管閉塞病変の発現に関する新たな治療ターゲットが同定されることで、病期進行例に対する治療抵抗性のメカニズムの解明にもつながり、本疾患の生存率をさらに改善させられる可能性を秘めており、社会貢献につながることを期待できる。

### 3 . 研究の方法

( ) Sugen/Hypoxia ラットモデルの作成と線維性肺血管閉塞病変の同定

7週雄Sprague-Dawley ラットに血管内皮成長因子阻害剤 ( Sugen5416 ) を単回皮下注射した後、3週間低酸素チャンバー内で飼育し、以後は大気中で管理してSugen/Hypoxiaラットモデルを作成する。線維性肺血管閉塞病変はSugen投与後5週から8週にかけて増加することが分かっているため、Sugen投与後5週と8週で、ラットを安楽死させ、肺組織を固定し、組織切片をマッソンエラスティカファンギゾン染色により細胞性血管閉塞病変と線維性血管閉塞病変を同定する。

( ) . 線維化に関わる遺伝子発現の同定

real-time PCR 法を用いて、遺伝子発現量の解析を行う。比較対象は、正常ラットの血管をコントロールとし、Sugen/Hypoxiaラットの細胞性閉塞血管、線維性閉塞血管における遺伝子発現を比較検討する。

### 4 . 研究成果

新生内膜線維性閉塞病変の発現率は、Sugen 投与後 5 週で  $0.5 \pm 0.3\%$ 、Sugen 投与後 8 週で  $5.5 \pm 2.1\%$  と有意に増加し ( $p < 0.05$  vs 5 週 PH 群) また閉塞血管面積に対する新生内膜の線維化面積率は、Sugen 投与後 5 週で  $6.1 \pm 0.9\%$ 、Sugen 投与後 8 週で  $14.9 \pm 0.5\%$  と有意に増加した ( $p < 0.05$  vs 5 週 PH 群)。一方、肺組織の線維化に関わる fibronectin1 遺伝子発現は Sugen 投与後 8 週で  $1.48 \pm 0.08$  倍 ( $p < 0.05$  vs 正常対照群) collagen1 の遺伝子発現は  $1.50 \pm 1.0$  倍 ( $p < 0.05$  vs 正常対照群) に有意に増加し、血管線維化と関連を示した。今後は fibronectin1 や collagen1 の発現メカニズムを解明していきたい。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

The 8th TAKAO International Symposium 2017  
Macitentan prevents intimal fibrosis of obstructive pulmonary vasculopathy in rats.  
Tutomu Shinohara, Hirofumi Sawada, Shoichiro Otsuki, Noriko Yodoya, Taichi Kato, Hiroyuki Ohashi, Erquan Zhang, Shinji Saitoh, Hideto Shimpo, Kazuo Maruyama, Yoshihiro Komada and Yoshihide Mitani

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

#### (2)研究協力者

研究協力者氏名：齋藤伸治

ローマ字氏名：Saitoh Shinji

研究協力者氏名：三谷義英

ローマ字氏名：Mitani Yoshihide

研究協力者氏名：澤田博文

ローマ字氏名：Sawada Hirohumi

研究協力者氏名：加藤太一

ローマ字氏名：Kato Taichi

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。