

令和元年6月25日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16030

研究課題名(和文)慢性血栓性肺高血圧症の発症機序の解明-慢性肺血栓性肺高血圧症の作成と解析

研究課題名(英文)Elucidation of the onset mechanism of chronic thromboembolic pulmonary hypertension-Creation and analysis of chronic pulmonary thromboembolism

研究代表者

杉山 陽一 (Sugiyama, Yoichi)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40750691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は慢性血栓性肺高血圧症の前段階である慢性肺血栓性肺高血圧症の発症に線溶系異常と内皮機能障害の双方が必要であることを検証することである。慢性肺血栓性肺高血圧症のモデルマウス作成を試みるも再現性が乏しく本仮説の立証できなかった。しかし、内皮障害および線溶系異常マウスに肺血栓性肺高血圧症を作成する過程で肺高血圧症が残存していた。そこで、肺動脈内皮細胞の血栓への生体反応に着目することとし、肺血管内皮細胞が血管内異物を貪食し血管外へ排泄する能力の機序解明を試みているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)に関連した線溶系異常と一酸化窒素合成酵素(NOS)障害に関連した内皮障害の双方を有していても、慢性肺血栓性肺高血圧症のモデルマウスを作成することが困難であったことを示した点である。また、異物に対する内皮機能であるAngiophagyの研究を肺血管内皮細胞で試みたことにも学術的意義がある。慢性肺血栓性肺高血圧症のモデルマウスの作成やAngiophagyと慢性肺血栓性肺高血圧症の関連を示すまでに現時点で至らなかったことから、本研究の社会的意義の判断は難しい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate whether both fibrinolytic and endothelial dysfunction are related to the onset of chronic pulmonary thromboembolism. Although we tried to create a model mouse for chronic pulmonary thromboembolism, it was poorly reproducible. However, pulmonary hypertension remained in the process of creating this model. Therefore, we are focusing on the biological reaction of pulmonary artery endothelial cells to thrombus, and we will elucidate the mechanism of the ability of vascular endothelial cells to phagocytose foreign substances in blood vessels and excrete them out of blood vessels.

研究分野：肺循環

キーワード：慢性肺血栓性肺高血圧症 慢性肺血栓性肺高血圧症 内皮障害 線溶系異常

## 1. 研究開始当初の背景

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) は肺血栓の器質化によって発症する肺高血圧症である。CTEPH の治療は器質化した肺血栓を外科的に取り除く肺動脈血栓内膜除去術 (pulmonary endarterectomy: PEA) や経カテーテル的に器質化した肺血栓を破壊する肺動脈形成術 (balloon pulmonary angioplasty: BPA) により発展してきた。しかし、PEA や BPA の適応外となる症例、PEA や BPA による治療後に肺高血圧症が残存・進行する症例に対する治療は確立していない。このような症例の生命予後は不良であり、新しい治療法の開発が求められている。新しい治療法の開発の糸口として肺血栓が器質化する機序に関する研究が注目されている。これまでの臨床報告から肺血栓が器質化するためには、肺血栓塞栓が慢性的に肺動脈内に残存すること (慢性肺血栓塞栓症) が必要であると考えられている。しかし、慢性肺血栓塞栓症の発症機序が不明であり、CTEPH の基礎研究は未発達のみである。そこで本研究では、慢性肺血栓塞栓症の発生機序を解明することを目的とした。

CTEPH の臨床背景として凝固線溶系異常が多いことが報告されている。共同研究者である福本義弘は CTEPH 症例において Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) の亢進により線溶系が障害され、慢性肺血栓塞栓症が発症する可能性を報告した (Yaoita N, Fukumoto Y, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016.)。しかし、線溶系異常モデルを用いた基礎研究で慢性肺血栓塞栓症は発症せず (Kenneth, et al. *Circulation.* 1991.)、疫学研究でも線溶系疾患だけでは慢性肺血栓塞栓症は発症しないことが報告されている。これらの知見から、CTEPH が発症するためには線溶系異常だけで必要十分でない可能性を考えた。久留米大学の臨床研究で凝固線溶系疾患を有する CTEPH 症例は、肺動脈の血管内皮機能が低下していた (未発表データ)。血管内皮機能障害の発生には亢進した血小板凝集能から一次血栓が誘発される報告がある (Williams RH, et al. *Thromb J.* 2004.)。申請者は慢性肺血栓塞栓症の発生には線溶系異常と内皮機能障害の双方が必要であると仮説を立て、本研究を着想した。

しかし、実験開始後に本仮説を証明するために当施設で確立していた慢性血栓塞栓症のモデルマウスの再現性が乏しいことが発覚した (後述)。慢性血栓塞栓の再現性は乏しかったが、肺高血圧症を本モデルマウスで作成することはできていた (後述)。本モデルマウスの作成工程が内皮障害を来したマウスに血栓塞栓を作成することであるため、内皮障害を有する血管の血栓への生体反応に着目することにした。近年、血管内皮細胞が血管内異物を貪食し血管外へ排泄する能力 (Angiophagy) が報告されており (CK Lam et al. *Nature.* 2010)、Angiophagy は脳血管や腎血管だけでなく肺血管でも確認された (Grutzendler J et al. *Science.* 2014)。Angiophagy は亜急性期から慢性期に血栓を血管外へ排泄する機能であることも報告されており (Grutzendler J et al. *Science.* 2014)、慢性肺血栓塞栓症の発症に関連する血管内皮機能である可能性がある。そこで、慢性肺血栓塞栓症の発症機序を解明するために、本研究の目標を血栓に対する血管内皮機能である Angiophagy について、肺血管内皮細胞を用いて解析することに変更し、本研究を進める方針とした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は「慢性肺血栓塞栓症の発症には線溶系異常と内皮機能障害の双方が必要ある」という仮説を検証し、慢性血栓塞栓症の発症機序を解明することである。また、血管内皮機能である Angiophagy について、肺血管内皮細胞で検証することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 計画 A

仮説「慢性肺血栓塞栓症の発症に線溶系異常と内皮機能障害の双方が必要ある」の検証

計画 1: 線溶系異常および内皮機能障害マウスを用いて慢性肺血栓塞栓症を作成する

計画 2: 慢性肺血栓塞栓症を免疫組織化学的に解析する

計画 3: 慢性肺血栓塞栓症の遺伝子発現を解析する

### (2) 計画 B 血管内皮機能である Angiophagy について肺血管内皮細胞での検証

計画 1: 肺血管内皮細胞が異物を貪食することを確認

肺血管内皮細胞をマイクロビーズ (異物) と共培養させて貪食能を評価

計画 2: 異物を貪食した肺血管内皮細胞の遊走能を評価

ボイデンチャンバーを用いて遊走能を評価

計画 3: 異物を貪食した肺血管内皮細胞のアポトーシスを評価

## 4. 研究成果

### (1) 計画 A

申請者の予備実験では線溶系異常および内皮機能障害マウスに肺血栓塞栓症を発症させることで慢性肺血栓症のモデルマウスを作成することが可能であると判断し、研究計画を作成したが、慢性肺血栓の再現性が乏しく慢性肺血栓症のモデルマウスを作成することができなかった。しかしながら、右心カテーテル検査を用いた右室収縮期圧はコントロール群と比較して上昇していた (図 2)。

(2)計画 B

計画 1:

異物(マイクロビーズ)と肺血管内皮細胞を共培養したところ、肺血管内皮細胞内にマイクロビーズがあることが確認された(図 3)。肺血管内皮細胞の貪食能は経時的に共培養 4 日目まで上昇した(図 4)。

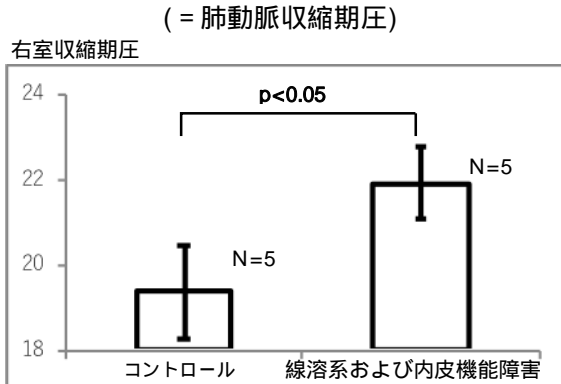
計画 2: ボイデンチャンバーを用いて評価を行ったが、マイクロビーズを貪食した肺血管内皮細胞とコントロール群の二群間では遊走能は有意差がなかった( $p > 0.05$ )(図 5)

計画 3:

TUNEL 染色でマイクロビーズを貪食した肺血管内皮細胞とコントロール群の二群間でアポトーシスを評価したが、コントロール群で出現していなかったアポトーシスがマイクロビーズを貪食させた肺血管内皮細胞では少数確認された(図 6)。

申請者らは、肺動脈内皮細胞の異物排泄能である Angiopathy に着目し、本研究では正常肺動脈内皮細胞における異物貪食に関する異物貪食能、細胞遊走能、アポトーシスを組織学的に検証した。今回の検証で肺動脈内皮細胞に異物貪食能があることが確認され、細胞遊走能やアポトーシスが異物の貪食の有無にかかわらず有意差がないことが確認された。今後は、肺動脈内皮異常細胞モデル(低酸素暴露モデルおよび一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害薬による内皮障害モデル)を用いて、肺動脈内皮異常細胞で計画 B と同様の検証を行う予定である。また、共培養中の上清液を用いて異物貪食によるサイトカイン(IL-6)などの炎症評価も行う予定である。

図 2 肺血栓塞栓症 1 週間後の右室収縮期圧



線溶系異常および内皮機能障害マウスはコントロールマウスと比較すると肺血栓塞栓症 1 週間後の右室収縮期圧

図 3 マイクロビーズを貪食した

肺動脈内皮細胞(免疫染色)

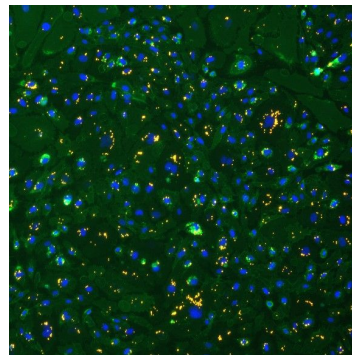


図 4 肺動脈内皮細胞の貪食能力(貪食係数)

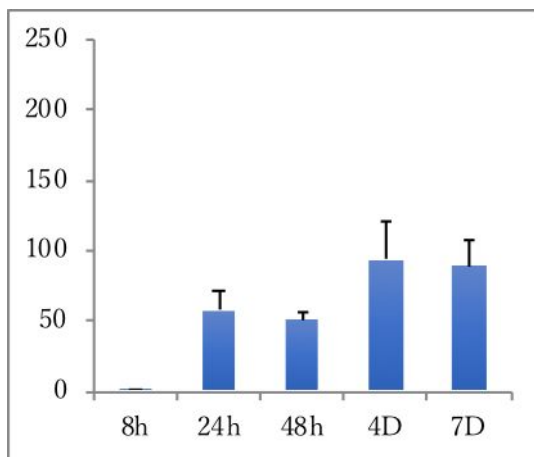


図 5 マイクロビーズを貪食した

肺動脈内皮細胞の遊走能力

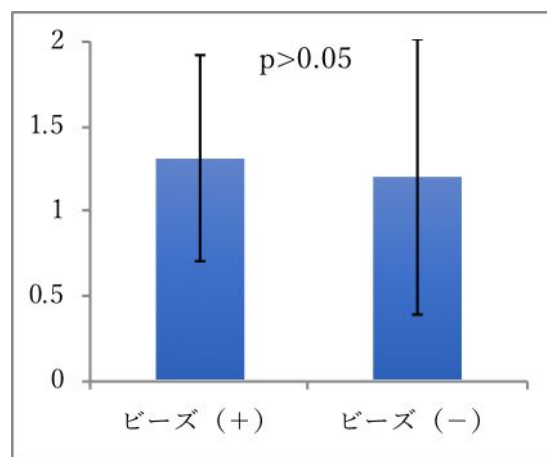
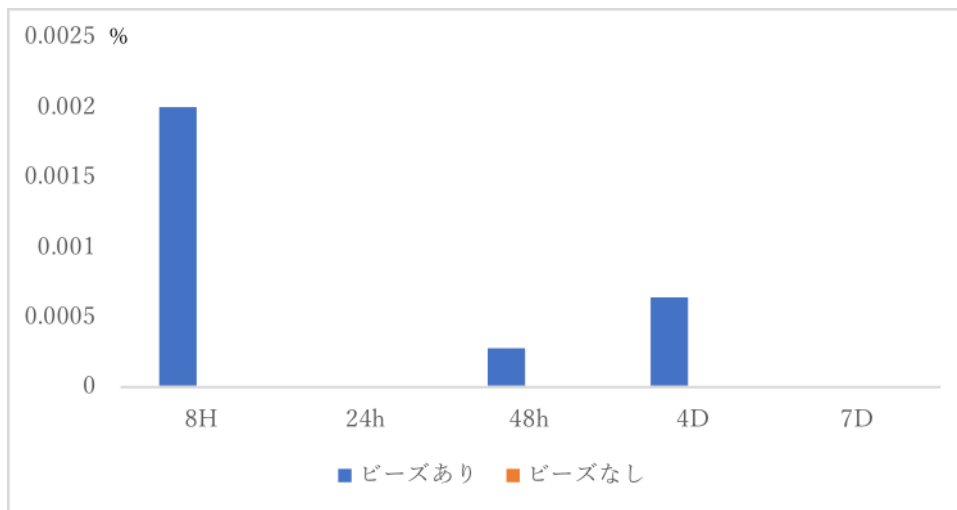


図6 マイクロビーズを貪食した肺動脈内皮細胞のアポトーシス



## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 10件)

Igata S, Tahara N, Sugiyama Y, Bekki M, Kumanomido J, Tahara A, Honda A, Maeda S, Nashiki K, Nakamura T, Sun J, Abe T, Fukumoto Y. Utility of the amplitude of RV1+SV5/6 in assessment of pulmonary hypertension. PLoS One 13(11): e0206856, 2018. 査読有  
 Tahara N, Bekki M, Sugiyama Y, Tahara A, Fukumoto Y. Importance of extracardiac FDG uptake to diagnose cardiac sarcoidosis. J Nucl Cardiol: Epub ahead of print, 2018. 査読有

Maeda S, Tahara N, Takase F, Bekki M, Tahara A, Honda A, Igata S, Sugiyama Y, Nakamura T, Sun J, Kurata S, Fujimoto K, Abe T, Fukumoto Y. Diagnostic performance of FDG-PET/CTA in native mitral valve endocarditis. J Nucl Cardiol 26 (2):681-683, 2019. 査読有

Bekki M, Tahara N, Tahara A, Igata S, Honda A, Sugiyama Y, Nakamura T, Sun J, Kumashiro Y, Matsui T, Fukumoto Y, Yamagishi S-I. Switching dipeptidyl peptidase-4 inhibitors to tofogliflozin, a selective inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2 improves arterial stiffness evaluated by cardio-ankle vascular index in patients with type 2 diabetes: a pilot study. Curr Vasc Pharmacol: Epub ahead of print, 2018. 査読有  
 Bekki M, Tahara N, Tahara A, Honda A, Igata S, Sugiyama Y, Nakamura T, Sun J, Kurata S, Fujimoto K, Abe T, Tanaka H, Suda K, Fukumoto Y. J Nucl Cardiol. Anti-inflammatory effect of statin in coronary aneurysms late after Kawasaki disease. J Nucl Cardiol 26(2):671-673, 2019. 査読有

Nakamura T, Tahara N, Tahara A, Honda A, Bekki M, Sugiyama Y, Sun J, Kumagai E, Kurata S, Fujimoto K, Abe T, Igata S, Fukumoto Y. Myocardial metabolic improvement prior to electrocardiographic or volumetric changes of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. J Nucl Cardiol 25(1): 358-359, 2018. 査読有.

Nakamura T, Tahara N, Tahara A, Honda A, Igata S, Bekki M, Sugiyama Y, Sun J, Kumagai E, Kurata S, Fujimoto K, Abe T, Kato S, Tanaka H, Fukumoto Y. Right ventricular workload assessed by FDG-PET in a patient with residual VSD and infundibular pulmonary stenosis after repair of tetralogy of Fallot. J Nucl Cardiol 25(3): 1053-1055, 2018. 査読有

Tahara A, Tahara N, Yamagishi SI, Honda A, Igata S, Nitta Y, Bekki M, Nakamura T, Sugiyama Y, Sun J, Takeuchi M, Shimizu M, Yamazaki H, Fukami K, Fukumoto Y. Ratio of serum levels of AGEs to soluble RAGE is correlated with trimethylamine-N-oxide in non-diabetic subjects. Int J Food Sci Nutr. 68(8):1013-20, 2017. 査読有

Nakamura T, Tahara N, Tahara A, Honda A, Igata S, Bekki M, Sugiyama Y, Sun J, Kumagai E, Kurata S, Fujimoto K, Abe T, Kato S, Tanaka H, Fukumoto Y. Right ventricular workload assessed by FDG-PET in a patient with residual VSD and infundibular pulmonary stenosis after repair of tetralogy of Fallot. J Nucl Cardiol 25(3):1053-1055, 2018. 査読有.

Nakamura T, Tahara N, Tahara A, Honda A, Bekki M, Sugiyama Y, Sun J, Kumagai E, Kurata S, Fujimoto K, Abe T, Igata S, Fukumoto Y: Myocardial metabolic improvement prior to electrocardiographic or volumetric changes of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. J Nucl Cardiol 25(1): 358-359,2018. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

発表者: 杵山陽一, 発表演題: 当院における肺高血圧症の長期予後, 学会等名: 第 124 回日本循環器病学会九州地方会, 発表日時: 2018 年 6 月 30 日, 発表場所: かごしま県民交流センター, 鹿児島県.

発表者: 杵山陽一, 発表演題: 当院における肺高血圧症の長期予後, 学会等名: 第 3 回日本肺高血圧症・肺循環学会, 発表日時: 2018 年 6 月 23 日, 発表場所: 千里ライフサイエンスセンター, 大阪.

発表者: 杵山陽一, 発表演題: セレキシパグ導入が困難だった特発性肺動脈性肺高血圧症の一例, 学会名等: 第 3 回日本肺高血圧症・肺循環学会, 発表日時: 2018 年 6 月 23 日, 発表場所: 千里ライフサイエンスセンター, 大阪.

発表者: 杵山陽一, 発表演題: Long-term survival of patients with pulmonary hypertension at a single center, 学会名等: 第 82 回日本循環器学会学術集会, 発表日時: 2018 年 3 月 24 日, 発表場所: リーガロイヤルホテル大阪, 大阪

〔図書〕(計 1 件)

著者名: 杵山陽一, 田原宣広, 福本義弘, 文部出版: 日経メディカル, 書名: 『ガイドライン 外来診療 2019』専門医の管理・治療が必要なガイドライン 肺高血圧症 発表年: 2019. 頁: 421-430.

〔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:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。