

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20406021

研究課題名（和文）極限高地生息動物の肺循環特性—Rhoキナーゼを中心とした分子生物学的研究

研究課題名（英文） Characteristics of pulmonary circulation in high-altitude active animals—Biomolecular study focusing on the central role of Rho-kinase

研究代表者

石崎武志（Ishizaki Takeshi）

福井大学・医学部・教授

研究者番号：80151364

研究成果の概要（和文）：極限高地生息動物であるヤクは低酸素環境にもかかわらず、肺高血圧症（High-altitude pulmonary hypertension, HAPH）を発症しない。その理由の一つは、血管トーンスの基本的な維持機序である Rho キナーゼ活性の極度の抑制にあると判明した。肺血管組織学的検討でも肺動脈血管壁肥厚というリモデリングも認められなかった。一方、ウシやキルギス人ではHAPHを発症し、その成立機序には Rho キナーゼの活性化が関与していた。

研究成果の概要（英文）：Despite in the hypoxic air circumstance, yak, a high-altitude living animal, has never developed high-altitude pulmonary hypertension (HAPH). The reason behind it is that a Rho-kinase, an essential enzyme of maintaining of vascular tone is not activated in the pulmonary vessels. There is no remodeling of pulmonary arterial wall in yak. On the contrary, a bull or Kyrgyzstan people who are living at high-altitude and having HAPH have augmented activity of Rho-kinase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：高地適応動物、ヤク、ウシ、high-altitude pulmonary hypertension (HAPH)、Rhoキナーゼ、エンドセリン、肺高血圧症、右心カテーテル法

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患や高地居住者の低酸素性肺高血圧症は、低酸素性肺血管収縮と本来、平滑筋を保持しない微小肺動静脈の内膜と平滑筋細胞の増殖（肺血管リモデリング）をもたらす。一方、肺血管内皮細胞からは、強力な血管拡張物質のNOやPGI₂が産生される。

低酸素状態では、肺血管内皮細胞NO合成酵素（eNOS）の基質でもある酸素分圧の低下でeNOS活性が低下すること、そして、NO吸入・NOドナー投与（J Clin Invest 94(2):578, 1994、Circulation 15;96(2):689, 1997.）は培養肺動脈平滑筋細胞増殖を抑制することも知られている。

低酸素はHIF-1 α 、VEGF、PDGFとエンドセリン (ET) などの細胞増殖因子の誘導と産生を促し、肺血管平滑筋細胞肥大増生をもたらす。事実、HIF-1 α 遺伝子欠損マウスは低酸素性肺高血圧症になりにくい (J Clin Invest 103: 691, 1999)。臨床の場で肺動脈性肺高血圧症にPGI2アナログ製剤、ET受容体拮抗剤やNO吸入療法が応用されている所以でもある。

細胞増殖誘導と細胞周期停止には、サイクリン(cyclin-dependent kinase, CDK ファミリー)の働きが重要であると新たに認識されているが、低酸素刺激細胞増殖にもCDKファミリーの重要性が示唆されている (Oncogene 22:3431, 2003)。著者らは、NOの肺血管平滑筋細胞増殖抑制機序に、腫瘍増殖抑制遺伝子産物のp53とCDK-インヒビターp21、MAPキナーゼの関与が (Am J Respir Cell Mol Biol 31:184, 2004)、PGI2の肺血管平滑筋細胞増殖抑制機序には低酸素暴露で発現が低下するCDK-インヒビターp27をup regulationする作用がそれぞれ働いていること (Am J Respir Crit Care Med 171(2) A122, 2005.)を明らかにし得た。

近年、内因性NOS阻害作用を示すADMA (asymmetric demethylarginine) が全身性心血管内皮細胞機能障害のマーカーとして注目されている (Vasc Med 10:S1, 2005.)。このADMAは肺動脈性肺高血圧症患者でも高値を示すことが報告された (FASEB J 19:1175, 2005)が、著者らは、極限高地生息動物の肺循環研究を通して、チベット羊やヤクは高地低酸素環境にもかかわらず肺血管NO合成酵素活性が維持されていること (Respir Physiol Neurobiol. 146(2-3):225, 2005, Eur J Appl Physiol. 94(1-2):93, 2005, Eur J Appl Physiol. 93(1-2):190, 2004, Respir Physiol Neurobiol.140(2):189, 2004.)、殊にヤク肺血管系ではDDAH(dimethylarginine-dimethyl-amino-hydrolase)活性が強く発現して、ADMAの肺循環系での生成が低く抑えられていることを明らかにした。

低分子量GTPaseの一つであるRhoは、アクチン系の細胞骨格を介して低酸素性肺血管平滑筋収縮作用を示す (Am J Respir Cell Mol Biol 25:628, 2001)が、著者らは、Rhoキナーゼが低酸素によるCDK-インヒビターp27のdown regulationを誘導していることを明らかにし得た (Am J Respir Crit Care Med 173 (2) A757, 2006)。このように、低酸素暴露による肺血管リモデリングには、これまで不明の点が多かったCDKインヒビターやRhoキナーゼなどが内因性血管拡張物質のNOやPGI2やDDAH活性の調節系の関与が示唆される。かかる背景から著者らは以下の着想を得た。

即ち、「極限高地生息動物の肺循環特性 (低酸素暴露にもかかわらず肺高血圧症・肺性心を発症しないこと) にはRhoキナーゼのdown regulationが強く関与している」。

2. 研究の目的

- (1) 上記仮説を実証すべく、以下の検証を行う。即ち、極限高地生息動物の肺血管系では、
- ① 低酸素暴露下でRhoキナーゼは、抑制されている？
 - ② Rhoキナーゼは、NOSを直接抑制する？
 - ③ Rhoキナーゼは、DDAH活性に直接作用するのか、しないのか？
 - ④ 低酸素暴露下でRhoキナーゼは、CDKファミリー p 21, p 27, p 53や p 38MAPキナーゼ、p 42/44MAPキナーゼの発現にどんな影響を与えているのか？
 - ⑤ RhoキナーゼはET・VEGF・HIF-1 α 発現・生成にいかなる影響を与えているのか？
 - ⑥ Rhoキナーゼは、肺血管平滑筋肥大増殖を促進するのか？
 - ⑦ キルギス人高地居住者のHAPH患者でのRhoキナーゼ系とET系の変化はヤクと比較して異なるのか？なお、⑦は現地共同研究者の強い要請があり、当初の本研究検討項目にはなかったものの、本研究遂行上、現地共同研究者の支援が不可欠であるので、追加検討項目とした。

3. 研究の方法

- (1) ヤク実験を中心に行った。海拔3,800m以上の高地に生息している元気な野生の雄ヤク (2~3歳、体重約200kg) を捕獲者に捕獲してもらい購入した。対象動物として牛を確保した。
- (2) 主な予定検討項目：
- ① 体重、体温、末梢血赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン量、左・右心室重量比測定。肺動脈圧測定、体動脈圧測定。
 - ② 肺組織RhoキナーゼのmRNA、タンパク量発現をポリクロマーナル (モノクロマーナル) 抗体を応用した免疫組織染色法で検索する。
 - ③ 肺組織を融解しRhoキナーゼのmRNAと蛋白量とをRT-PCR法、Western blot法とで測定する。
 - ④ Rhoキナーゼインヒビターの投与によって肺組織DDAH活性、ADMA量、CDKファミリー (p 21, p 27, p 53)、MAPキナーゼ、ET, VEGF, HIF 1 α 、NOとヘモグロビン結合状態が変動するかをそれぞれ、ELISA法、RT-PCR法、Western blot法、等電点電気泳動法を駆使して検討する。

(3) 調査研究実施国

調査研究実施国はキルギス共和国である。対象動物のヤク、ナキウサギはチベット高原から天山山脈がその国土の大部分を占めるキルギス共和国の海拔2,300mから5,500mにかけて垂直的に広く生息している。

本研究実施拠点をキルギス共和国の首都ビシュケク市（海拔約800m）に在るキルギス国立心臓病・内科センター内、分子生物医学研究所に置く。同分子生物医学研究所長（キルギス科学アカデミー事務総長を兼務）は海外共同研究者でもあるアルダシェフ教授である。

現地への移動は、関空―タシュケント―ビシュケク間の定期飛行便を利用した。現地に着後、現地スタッフとともに、動物（ヤク、ナキウサギ）の入手しやすい海拔3,100mの高地に在る同研究センター分院に移動して、具体的な実験を開始する。肺循環生理学的計測を（小）動物用血管カテーテル法で測定の後、採血と肺組織を得、凍結・ホルマリン保存等の処置を行い、ビシュケク市の当該センターに運び検索を続行する。時期と期間は、わが国の医学系大学の学生夏季休暇中で、しかも当該地の降雨量の少ない7～8月を中心に各年度とも20日以内を予定とした。

(4) 調査研究実施場

平成20年8月5日、関西空港からウズベキスタン航空でタシュケントへ向かった。最終目的地はビシュケクであるが直行便がない。8時間の飛行後タシュケントに到着し、同日、タシュケントを出発し、約1時間10分でキルギスタンの首都、ビシュケク市のマナス国際空港に到着した。現地スタッフ迎いの4輪駆動車に乗り動物（ヤク、ナキウサギ）の入手しやすい海拔3,100mの高地に在る野外実験場に移動して、具体的な実験を開始した。途中、海拔1,600mの第1ベースキャンプに宿泊した。以後の訪問時も同所を利用した。確保してもらったヤクとウシのうち、ヤクは実験中暴れるので、現地の実験補助者3人で固定してもらっての遂行である。実験終了後第1ベースキャンプに帰着した。以後も同様な時間調整で実験を年度毎繰り返した。

4. 研究成果

(1) ヤク、ナキウサギ、キルギス人 HAPH 患者肺血管の組織学的検討

実験終了後に作成したヤク肺組織標本（図1）上、細気管支に並走する肺動脈の壁肥厚は全く目立たない。

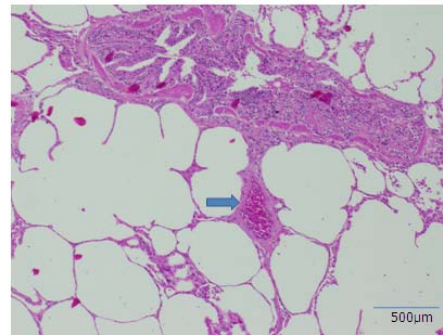


図1. ヤク肺組織（H&E染色）高倍率

一方、実験終了後に作成したウシ肺組織標本（図2）では、細気管支に並走する肺動脈がしばしば肥厚し、図2の右側肺動脈の中膜、外膜が肥厚し内部空間がイレギュラーであった。

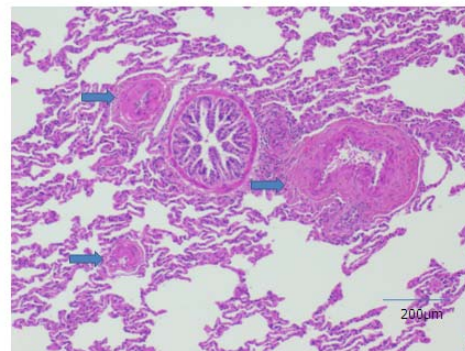


図2. 高地生息ウシ肺組織（H&E染色）高倍率

実験には供しなかったが、入手したナキウサギ肺標本をみると、細気管支に並走する肺動脈には肥厚所見を認めない。キルギス人 HAPH 患者の肺組織標本（図3）では肺動脈内膜の偏った肥厚と中膜肥厚、外膜も肥厚している所見を認めた。このように、高地環境に適応したヤクやナキウサギの肺動脈は低地で生まれ高地環境に生息しているウシや高地で出生しそのまま居住しているキルギス人 HAPH 患者のそれと比較して肺動脈肥厚を全く認めないという組織学的所見は、ヤク、ナキウサギには低酸素性肺高血圧が無いという証明となる。

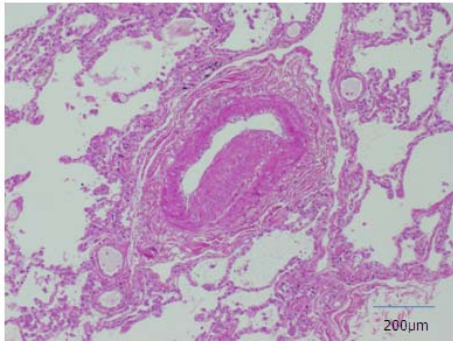


図3. キルギス人肺組織 (H&E染色) 高倍率

(2) ヤク肺血管反応性の検討

海拔3,800m以上の高地に生息するヤクと海拔3,100mの高地に居住しているウシを用いた。いずれも2~3歳の雄である。海拔3,100mの場所で肺循環測定実験に供した。Swan-Ganzカテーテルを肺動脈に挿入し、ベースラインの肺動脈圧を測定後Rhoキナーゼ抑制剤 (Fasudil) 60mgを20mlの生理食塩水に溶かしたものを10mg/分の流速で末梢静脈から投与した(6分間)。投与後経時的に肺動脈圧を測定した。結果はヤクでは、スタート時、Fasudil投与後5分、10分、15分、20分で平均肺動脈圧 (mPAP) は17mmHg, 14, 15, 16, 17 mmHgとほとんど薬剤の影響を受けなかった。一方、雄ウシでは70mmHg, 30, 33, 40, 48と5分後に急激なmPAPの減少を来し、その効果は少なくとも投与後20分持続した(表1)。引き続き高地生息雄ヤクと雄それぞれウシ1匹ずつを対象とし、同様の実験を行った。海拔3,200mの野外で肺循環測定実験を行った。5分、15分、30分時の平均肺動脈圧 (mPAP) は36.9 mmHg, 36.1 mmHg, 30.4 mmHg, 26.7 mmHgと軽度のmPAPの低下を認めた。

表1. Fasudilのヤク・ウシPAP低下効果

Effects of fasudil on PAP in highland bovine					
	Baseline (Bovine)	Fasudil 5 min	Fasudil 10 min	Fasudil 15 min	Fasudil 20 min
PAPsyst, mmHg	90	48	52	56	64
PAPmean, mmHg	70	30	33	40	48

Effects of fasudil on PAP in highland yak					
	Baseline (Yak)	Fasudil 5 min	Fasudil 10 min	Fasudil 15 min	Fasudil 20 min
PAPsyst, mmHg	36	24	25	26	26
PAPmean, mmHg	17	14	15	16	17

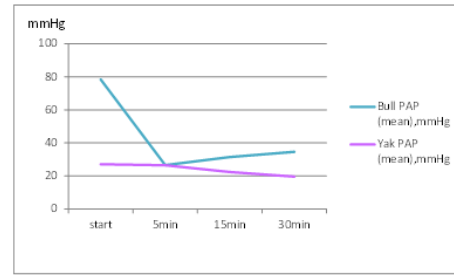


図4. Fasudilのヤク・ウシPAP低下効果

一方、雄牛では106.5mmHg, 36.2mmHg, 42.9 mmHg, 47.0 mmHgと急激なmPAPの減少をきたした(図4)。実験終了後、心臓を摘出して、右心/心比を求めるとヤクでは0.352、0.315であり、ウシでは0.545であった。

(3) HAPHに罹患したキルギス人肺血管反応性の検討

海拔3,200m~3,600mの天山山脈に生まれ現在も居住している19名のHAPH患者を対象に、無作為二重盲検法でFasudil (Rho-kinase inhibitor, Eril, アサヒ化成、東京) 投与群と control vehicle(生理食塩水)とに分け、海拔3,600mに在る高地医学病院(キルギス国立心・内科センター分院)にて、検査前のドップラー心エコー測定後、30分間安静を経て、Fasudilあるいはplaceboを投与した。Fasudilは末梢静脈から1mg/分、30分間持続点滴(計30mg)した。実験終了5分前から再度ドップラー心エコー測定を行った。結果は表1に示す如く、PAPsystがFasudil群で51.8±0.7mmHgから41.5±0.6mmHgへと有意に低下したのに比し、placebo群では51.9±0.7mmHgから51.9±0.8mmHgと変化しなかった。肺血管抵抗(PVR)もFasudil群で2.7±0.1WUから2.3±0.1WUと著しく低下したが、placebo群では2.7±0.1WUから2.7±0.1WUと全く変動をみなかった。なお、Fasudil群とplacebo群には実験前後の心拍量、体血圧、心拍数、SpO2の変化をみなかった。

以上の結果は、FasudilがHAPH患者でも肺動脈圧の低下という急性期効果をもたらすことを示唆した。これは、ヤク実験でのコントロール動物であるウシの肺高血圧症に対するFasudil効果と同様であった。すなわち、高地居住者に見られる低酸素性肺高血圧症には肺血管系Rho-kinaseの活性化が関与していることを強く疑う結果であった。

表2. キルギス人 HAPH 患者への Rho-kinase inhibitor、Fasudil の肺循環急性効果

Parameters	Baseline	Placebo	Baseline	Fasudil
		(30 min)		(30 min)
PAPsyst, mmHg	51.9±0.7	51.9±0.8	51.8±0.7	41.5±0.6*
PAAT, msec	0.087±0.001	0.086±0.001	0.087±0.001	0.102±0.001*
CO, l/min	6.2±0.2	6.2±0.3	6.1±0.3	6.6±0.2
PVR (WU)	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.5±0.1*
RAP, mmHg	5.5±0.4	5.5±0.4	5.5±0.4	5.3±0.3
BP syst, mmHg	125.2±4.0	125.0±4.0	125.2±4.1	122.8±4.1
BP diast, mmHg	78.7±1.5	78.7±1.6	78.6±1.6	76.3±1.5
HR, bpm	71.3±2.6	70.8±2.7	71.4±2.6	72.0±2.8
SpO ₂ , %	88.3±1.1	88.0±0.9	88.2±0.7	87.9±0.6

Data are presented as mean ± SEM,

PAP – pulmonary artery pressure,

PAAT – pulmonary artery acceleration time,

CO – cardiac output, PVR – pulmonary vascular resistance,

RAP – right atrial pressure,

BP – systemic blood pressure, HR – heart rate

, bpm – beats per minute. *p<0.001 – fasudil versus placebo.

(4) HAPH に罹患したキルギス人肺高血圧症への ET1 受容体拮抗剤の急性効果

海拔 3,200m~4,000m に終生居住している高地住民 138 名に右心カテーテル法を用いて肺高血圧症群 88 名と正常群 50 名とを同定した。その 2 群間で ET1 遺伝子のタイピングを行ったところ、肺高血圧症群に有意に heterozygous -3a/-4a genotype が多く、正常群では homozygous -3a/-3a genotype が多かった。

表3. HAPH 患者の ET-1 遺伝子 -3a/-4a 多型

Groups	Genotypes (number of patients)			Alleles (number of alleles)	
	-3a/-3a	-3a/-4a	-4a/-4a	-3a	-4a
Healthy (n=50)	0.49 (20)	0.42 (30)	0.09 (0)	0.70 (70)	0.30 (30)
HAPH (n=88)	0.32 (13)	0.49 (75)	0.19 (0)*	0.57 (101)	0.43 (75)**

* $\chi^2=11.15$; p=0.0008, ** $\chi^2=4.304$; p=0.03

また、15 名の肺高血圧症群に経口 ET1 受容体拮抗剤 (Bosentan) 125mg を投与し、内服前、内服 3 時間後にそれぞれドップラー心エコーを用いて血行動態を検索したところ PAPsyst は 46.4±6.2mmHg から 37.0±7.2 mmHg と有意に低値を示した。Bosentan+酸素吸入併用ではさらに 33.0±5.8mmHg と低値を示した。

表4. 肺高血圧症の高地居住者への bosentan と酸素吸入の急性効果

Parameters	Baseline	Bosentan	Bosentan + Oxygen
PAAT, sec	0.086±0.003	0.098±0.003*	0.110±0.005*†
PAPsyst, mmHg	46.4±6.2	37.0±7.2*	33.0±5.8*
CO, l/min	5.9±1.0	6.0±1.5	5.9±1.0
BP syst, mmHg	127.5±14.6	126±13.7	123±9.7
BP diast, mmHg	80.0±1.6	78±5.7	77±4.7
HR, bpm	80.0±13.1	83.0±13.5	81±10.5
SaO ₂ , %	88±2.1	89±1.6	96±0.8*

Data are presented as mean ± SD. PAAT – pulmonary artery acceleration time, PAPsyst – pulmonary artery systolic pressure, CO – cardiac output, BP – blood pressure, HR – heart rate, bpm – beats per minute, *p<0.05 – vs. baseline; †p<0.05 – vs. bosentan.

追記

(5) 国際肺循環カンファレンス

H23 年 6 月 26 日、金沢医科大学病院 新館 大会議室で肺高血圧症をテーマとした第 10 回日本海国際肺カンファレンス (The 10th Japan Sea International Lung Conference) を開催した。本研究の共同研究者である Aldashev 教授はキルギス共和国の天山山脈

に生息するヤクや高地居住者の肺循環特性を公表し討論した。また、金沢での国際カンファレンス後、松本市の松本大学に赴き、市民公開講座を開催した。その中で Aldashev 教授はキルギス共和国の自然、文化、高地医学を取り上げ説明した。松本市長とも歓談し国際高地医科学研究交流の必要性を話し合った。

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)

- ① B Kojonazarov, J Isakova, B Imanov, N Sovkhozova, T Sooronbaev, T Ishizaki, A. Aldashev

Bosentan reduces pulmonary artery pressure in high altitude residents
High Altitude Medicine & Biology 査読あり accepted.

- ② B Kojonazarov, A Myrzaakhmatova, T Sooronbaev, T Ishizaki, A Aldashev. Effects of fasudil in patients with high-altitude pulmonary hypertension. Eur Respir J 査読有 39:496-498, 2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Effects%20of%20fasudil%20in%20patients%20with%20high-altitude%20pulmonary%20hypertension>

[学会発表] (計 2 件)

- ① A Aldashev. New approaches in treatment of high-altitude pulmonary arterial hypertension. L-arginine and Rho-kinase inhibitor study. The 10th Japan Sea International Lung Conference 26th June 2011. Kanazawa

- ② B Kojonazarov, M Kasymbekova, M Wilkins, T Ishizaki, A Aldashev. Effects of Rho-kinase inhibitor fasudil on pulmonary arterial pressure in highlanders with high altitude pulmonary hypertension. (Double-blind placebo-controlled study)
ERS 14th September 2009. Wien
ERJ abstract issue .34: 317s, 2009

[その他]

中日新聞 2011年6月28日発刊記事
市民タイムス (松本市) 2011年6月28日
発刊記事

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 武志 (ISHIZAKI TAKESHI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：80151364

(2) 研究分担者

松川 茂 (MATSUKAWA SHIGERU)

福井大学・ライフサイエンス支援センター・准教授

研究者番号：00092809

酒井 秋男 (SAKAI AKIO)

松本大学・人間健康学部・教授

研究者番号：70020758

小泉 知展 (KOIZUMI TOMONORI)

信州大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20273097

梅 博久 (TOGA HIROHISA)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90142554

飴嶋 慎吾 (AMESHIMA SHINGO)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60262614

(3) 研究協力者

Almaz Aldashev

キルギス国立分子生物医学センター長

研究者番号：なし