

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591844

研究課題名(和文) 新たなマウス肺高血圧モデルの作成とRNA干渉を利用した治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy using i-RNA method in a newly created pulmonary hypertension model in mice

研究代表者

上園 晶一 (UEZONO SHOICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10291676

研究成果の概要(和文)：

肺高血圧症の病態は、肺血管のリモデリング(血管壁の肥大・内腔の狭窄)であるという理解のもと、マウスにおける実験モデルを作成することが本研究の目的であった。低酸素暴露(酸素濃度17%)3週間に植物毒モノクロタリンの同時投与で、血管リモデリングを伴う高度肺高血圧症を呈することがわかったが、肺動脈圧測定に耐えられないマウスが50%以上に及び、安定した実験モデルの作成には至らなかった。臨床において、高度の肺高血圧症は、妊娠経過における母体・新生児のリスクファクターであることを疫学研究にて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Remodeling of pulmonary vasculature (neointimal formation) is a key pathophysiology of development of pulmonary hypertension. The primary purpose of this research is to establish severe form of pulmonary hypertension model in mice. We observed that three-week-long exposure to hypoxic (FiO₂= 17%) environment with monocrotaline injection caused severe pulmonary hypertension. Unfortunately, more than 50% of these pulmonary hypertensive mice were too sick to tolerate an experiment of measurement of pulmonary artery pressure, necessitating abandon of this experimental model. Using a large cohort of pregnant women with congenital heart disease, we revealed the presence of pulmonary hypertension is a risk factor for maternal and neonatal poor outcome of pregnancy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：肺高血圧、マウス、血管リモデリング、核内転写因子、核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症をきたす疾患では、肺血管緊張の異常亢進や血管壁の肥大・内腔の狭窄などの血管壁リモデリングにより、血液が流れうる有効血管床断面積が減少し、血管抵抗が増加する。したがって、肺高血圧の治療に、まず肺血管拡張薬を用いるのはごく自然な発想である。1980年代から最近に至るまで、カルシウム拮抗薬大量投与療法、プロスタサイクリン、一酸化窒素（NO）、エンドセリン受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ（PDE）

-5 阻害薬などが肺血管拡張薬として用いられ、ある程度の有効性が報告されている。しかしなお治療抵抗性の症例が存在し、かつ、これらの肺血管拡張薬は、単に肺高血圧の進行を遅くするだけで、根治療法ではない。近年、臨床的に有用性の確認されたこれらの肺血管拡張薬が、実際は肺血管を拡張するだけでなく、いずれも細胞増殖を抑制する作用も持っていることがわかってきた。

一方で、肺高血圧症のメカニズムが解明するにつれ、肺血管内皮の機能異常や、それに続いて起こる肺小動脈の内膜の細胞増殖

(neointimal formation)といった、肺血管の3次元構築の改変（リモデリング）が、肺高血圧の進展に重要であることが明らかになった。さらに、家族性肺高血圧症の原因遺伝子として特定された BMPR2 (bone morphogenic protein receptor-2) 遺伝子が TGF- β

(transforming growth factor- β)ファミリーに属することから、それらの患者では、

「BMPR2 の遺伝子異常によって、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の増殖を抑制することができずに、異常な増殖を引き起こし、肺血

管リモデリングならびに肺高血圧症へ進展する」という仮説が提唱されている。具体的には、血管内皮細胞機能不全、血管平滑筋細胞の機能不全、血管外マトリックスの変化、血小板や炎症細胞の活性化による肺血管の損傷が、血管収縮、細胞の増殖、血栓、炎症を引き起こし、これらが悪循環を形成し、肺高血圧性血管疾患の発症、進行に至ると考えられている。

以上を踏まえ、肺高血圧の治療戦略に、新たに細胞増殖抑制療法という概念が加わってきた。そのパラダイムシフトに対応して、われわれは、血管狭窄、臓器線維化、炎症反応、血管新生などの血管リモデリングに共通する核内転写因子に注目し、転写因子レベルでの遺伝子発現制御を行うことによって、内膜の細胞増殖や炎症反応を抑え、肺血管リモデリングを抑制する治療法の可能性に取り組んできた。これまでに、核内転写因子である NF- κ B (Nuclear factor kappa B) ならびに Egr-1 (Early growth response factor-1) に対するデコイ型核酸医薬は、幼若ラットモノクローリン誘発肺高血圧モデルにおいて、肺血管リモデリングを改善し、肺高血圧の進展を抑えることを学会報告した (American Society of Anesthesiologists 2004, American Heart Association 2005)。われわれの方法も含め、遺伝子や細胞レベルに着目した新たな肺高血圧治療法は、将来が大いに期待できるものの、治療効果のメカニズム、有効性、安全性、投与方法など解決すべき問題点は多く、実験動物でのトライアルを積み重ねていく必要がある。

われわれが開発した、幼若ラットに植物毒で

あるモノクロタリン (MCT) を投与して肺高血圧を誘発する実験モデルは、高度の肺高血圧 (平均肺動脈圧 50mmHg) と新生内膜増生を生じるという点で、成獣ラットに植物毒であるMCTを投与して作成する従来の軽度～中程度の肺高血圧モデルとは大きく異なる。しかしながら、成獣ラットでも片肺にした後にMCTを投与すると、血管リモデリングを引き起こし、高度の肺高血圧を呈する。この実験モデルでは、MCTによる肺血管障害に、片肺によって生じる血行動態変化が加わったため、非常に強い炎症反応、そして肺血管リモデリングが引き起こされたと考えられている。一方、マウスでは、肺血管リモデリングを引き起こすような肺高血圧モデルは存在しない。MCTをマウスに投与しても、ほとんど肺血管障害を起こすことはないからである。また、低濃度酸素や高濃度酸素に長期間暴露することによって作成する肺高血圧マウスでは、肺高血圧の程度は軽度であり、炎症のコンポーネントを欠くため、血管リモデリング病変がほとんど見られないという致命的な欠点を持っている。しかしながら、肺血管リモデリングを持つ肺高血圧モデルマウスが開発できたならば、ノックアウトマウスや、オーバーエクスプレッションマウスなどさまざまな細胞工学的手法を用いた実験が可能となるため、細胞や遺伝子レベルを標的にした肺高血圧治療法の開発に大いに貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

先天性心疾患、肝硬変、肺塞栓症などに伴う2次性肺高血圧は、従来の肺血管拡張薬に治療抵抗性であり、心臓手術や肝移植、肺動脈血栓内膜摘除術などの周術期管理は容易ではない。われわれが提唱する、抗血管リモデリングを対象にした肺高血圧治療法は、手術という侵襲が加わる前に、肺血管における炎

症を抑制することで肺高血圧の改善を図ろうとするものである。本研究の目的は、「肺血管リモデリングを伴う肺高血圧マウスモデルを確立することによって、現在の細胞工学的手法を用いて、細胞レベルや遺伝子レベルでの肺高血圧の病態解析を進め、抗リモデリング療法の開発にいつその拍車をかけること」にある。このマウスモデルが完成した暁には、遺伝子の選択的阻害法であるRNA干渉法によって、NF- κ BやEgr-1などを介した炎症や細胞増殖のシグナル伝達を継続的に阻害し、肺高血圧の進展を強力に防ぐといった新たな治療法の開発も期待できる。肺高血圧症の病態解析や新たな治療戦略の開発のために、マウスにおける新たな肺高血圧モデルの確立は必須の条件であり、本研究がその役割を担えると考えた。

同時に、臨床の場で、肺高血圧症がリスクファクターになるかどうかを、先天性心疾患を持つ妊婦を対象にした比較的大規模の cohort 疫学研究を展開し、妊婦ならびに新生児のアウトカムについて調査した。

3. 研究の方法

(1) マウス肺高血圧モデルの確立: 各群8-10匹からなるマウスを、低酸素(10%)に暴露するかしないか、また、MCT 60mg/kg皮下注をするかしないかで、計4群に分ける。具体的には、(1) NM群: 21%空気下、MCT投与群、(2) NC群: 21%空気下、生理食塩水(生食)投与群(コントロール)、(3) HM群: 10%低酸素下、MCT投与群、(4) HC群: 10%低酸素下、生食投与群、とする。低酸素暴露群では、MCTまたは生食を投与した翌日から、酸素濃度10%にコントロールした低酸素チャンバーで飼育を開始する。1週間に2回のゲージ交換を除いて、低酸素暴露を維持する。成育環境条件は、空気下飼育群と同じとする。3週間後に、ケタミン・キ

シラジンによる全身麻酔下に、開胸手術を行い、(1) 血行動態の測定 (動脈圧、肺動脈圧、右室収縮期圧)、(2) 右肺、右室、中隔を含む左室を採取、計量 (3) 肺組織の一部を包埋固定し、組織学的検査を各個体に対して行う。組織学的検査では、肺動脈内腔閉塞スコア (Am J Pathol 1997;1019-25) を用いて評価する。統計学的な解析には、ANOVA ならびに Newman-Keuls の多重比較法を用いる。

(2) 仮説「NF- κ B p65 サブユニットに対する RNAi (RNA 干渉) は、低酸素-MCT によって誘発された肺高血圧マウスの肺動脈圧を軽減し、肺血管リモデリングを減弱させる。」を検証する。

①マウスを3群に分ける。4群の内訳は、(1) Sham群 (シャム手術のみ、RNAi を含まないベクターを投与)、(2) Injured群 (低酸素-MCTによる肺高血圧誘発、RNAi を含まないベクターを投与) (3) Treatment群 (低酸素-MCTによる肺高血圧誘発、NF- κ B に対する RNAi を投与)

②NF- κ B p65 サブユニットに対する RNAi は、Surabhi らによって報告された配列を用い、ベクターとして市販の HVJ-E キットを用いる。

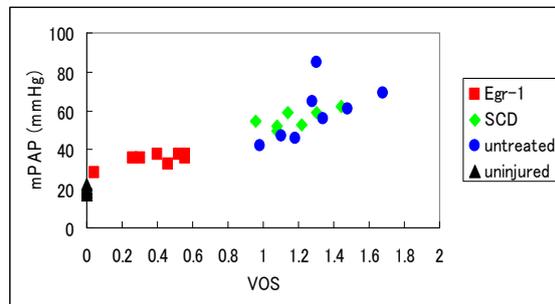
③実験開始後3週間後に、(1) で述べた方法によって、肺高血圧の程度を、生理学的・病理学的手法で検討する。

(3) 東京女子医科大学周産期センターにおける、先天性心疾患を持つ妊婦のデータベースをもとに、1998年から2004年までの期間で、母体と患児のアウトカムについて、後方視的調査を行い、母体のリスクファクターについて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 核内転写因子 EGR-1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを不活化ウイルス

のエンベロープに包埋し、IV 投与により肺血管に取り込ませることで、ラット肺高血圧におけるリモデリングを抑制することを発見した。



この結果を英文論文としてまとめ、American Journal of Respiratory and Critical Care 誌に投稿した。査読の結果は、reject であったが、多くの有益なコメントをもらった。現在、そのコメントに沿って、追加実験を行っている。

(2) マウスを17%の低酸素室で3週間管理しても肺高血圧にはほとんど進展しない。しかし、植物毒であるモノクロタリンを投与したのち、低酸素室に3週間管理すると、高度の肺高血圧 (右室圧にして200%増し) に進展することがわかった。しかしながら、この方法では生存率が50%前後であり、マウスの肺高血圧モデルの安定化には条件設定に改善の余地があると結論した。現在、モノクロタリンの量を調整することを考慮中である。

(3) 先天性心疾患を持った妊婦は、多くが肺高血圧の状態である。これらの患者は臨床における肺高血圧モデルととらえることができる。これらの患者は、時に、帝王切開を受けることがあり、麻酔が必要となる。これらの患者群を対象に、周産期における母子の予後について後方視的解析を行い、肺高血圧がリスクファクターであることを確認した。その結果は International Journal of Obstetric Anesthesia 誌に受理された。

(4) 先天性心疾患により単心室型循環を持つ患者における周術期管理では、肺血管抵抗の調節が重要である。そのことに関する総説を Journal of Anesthesia に発表した。

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. 著者 Hidano G, Uezono S, Terui K:

論文表題: A Retrospective 7-Year

Single-Center Survey of Adverse Maternal and Neonatal Outcomes for Parturients with Congenital Heart Disease: Mode of Delivery and Anesthetic Management

雑誌名 International journal of bstetric anesthesia

査読 有り

2011年

2. 著者 Yuki K, A. Casta A, Uezono S

論文表題 Anesthetic management of noncardiac surgery for patients with single ventricle physiology

査読 有り

巻 25

発行年 2011年

ページ 247-256

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上園 晶一 (UEZONO SHOICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10291676