

機関番号：22701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：平成 20 年度～平成 21 年度
 課題番号：20791088
 研究課題名（和文） 肺高血圧における VIP の機能解明と遺伝子治療への応用
 研究課題名（英文） The role of VIP in pulmonary hypertension and application for the gene therapy
 研究代表者 川上 裕理 (Kawakami Hiromasa)
 横浜市立大学附属病院麻酔科・助教
 研究者番号：90407958

研究成果の概要（和文）：重症肺高血圧症には根本的な治療法がない。神経伝達物質 VIP, PACAP は肺循環、呼吸機能に関与するとされるが、詳細な機能は不明である。実験的肺高血圧モデルの肺、心臓組織では VIP, PACAP が減少する一方、その受容体 VPAC1, VPAC2, PAC1 の発現は亢進していた。VIP, PACAP 補充により肺高血圧が改善すると推測し、生体内で VIP, PACAP を産生させるプラスミドベクターを作製した。静脈内、腹腔内投与等による治療効果を検証する。

研究成果の概要（英文）：

Pulmonary hypertension (PH) is critical disease. It has been reported that neuropeptides VIP, PACAP involve in pulmonary circulation and respiratory system, however, their functions are not fully elucidated. The contents of VIP and PACAP in the lung decreased in experimental PH, while the expression of their receptors VPAC1, VPAC2 and PAC1 increased. Similar results were obtained from cardiac tissue. To verify the hypothesis that replacement of the peptides may improve PH, we constructed plasmid vector encoding VIP or PACAP. We have been investigating the more efficient method to deliver the plasmid and the effect in PH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000 円	630,000 円	2,730,000 円
2009 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：麻酔科学、生理学

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：VIP、PACAP、PAC1 受容体、肺高血圧、プラスミドベクター

1. 研究開始当初の背景

原発性、二次性肺高血圧症における不可逆的な血管損傷は肺移植以外に根治的治療方法はない。Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 等が次世代の治療薬と期待されていたが、肺循環における詳細な機能は不明であった。Neuropeptide である VIP は心肺循環系

において自律神経線維に存在し、肺循環、呼吸機能等に関与しているとされる。原発性肺高血圧症では VIP の低下が示され、更に VIP 投与により肺高血圧が改善することが報告された (JCI 111, 1339-1346, 2003)。一方、VIP と 70%の相同性を持つ PACAP は PACAP 受容体に加え VIP 受容体にも作用する。VIP、

PACAP の各々の knockout mice はともに肺高血圧、右心不全を示し、VIP、PACAP が肺循環に重要な役割を果たしていると考えられた。以上より、VIP、PACAP 投与による肺高血圧症に対する治療効果を検証し、その機序の解明を計画した。

既に VIP 投与により原発性肺高血圧が部分的に改善することは報告されていたが、VIP は生体内での半減期が短く長期投与が困難だった。より簡便な投与方法が望まれていた。ウイルスベクターは動物実験に広く使用されているが、臨床応用へのハードルは依然として非常に高い。また、呼吸器に感染させやすいアデノウイルスベクターは免疫反応を惹起し、効果は一時的で単回投与のみ可能であった。非ウイルスベクターで、複数回の投与が可能であるプラスミドベクターを効果的に使用する条件を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、VIP/PACAP 及びその受容体の肺循環における役割を解明するため、実験的肺高血圧モデルを用い以下の方法で検討した。また、VIP/PACAP 発現プラスミドベクターによる肺高血圧に対する治療効果を検討するため、VIP 又は PACAP 発現プラスミドベクターを構築し、更に in vivo で導入する方法を検討した。

3. 研究の方法

(1)モノクロタリン誘発肺高血圧モデル作製、及び循環動態測定(右室圧、体血圧、心拍数)。モノクロタリン 60mg/kg をラットに皮下注射し4週間で肺高血圧モデルを作製し Group C とした。正常群は group C とした。吸入麻酔による全身麻酔下に気管挿管し、陽圧換気を行った。実体顕微鏡下に右内頸静脈よりカテーテルを挿入し右室圧を測定した。右室に入ったことは圧ラインの波形から判断した。大腿動脈にカテーテルを挿入し体血圧を測定した。測定後に心臓、肺を摘出し右室/左室重量比、右室/体重比より右室肥大の評価を行った。

(2)肺、心臓組織、血液における VIP、PACAP 量測定。VIP/PACAP の共通受容体 VPAC1、VPAC1 及び PACAP 特異的受容体 PAC1 受容体発現量の測定。ELISA, Western blot analysis, Realtime PCR により、組織、血液中の VIP、PACAP 含有量、VPAC1, VPAC1, 及び PAC1 受容体発現量を測定した。

(3) 免疫組織学的検討

肺、心臓組織における VIP/PACAP 及びその受

容体の発現部位を検討するため、肺、心臓の免疫染色を行った。肺組織はパラホルムアルデヒドで固定しパラフィン切片を、心臓組織は固定後凍結切片を作製し、免疫染色を行った。

(4) プラスミドベクターの in vivo における導入条件検討。

ラット、マウスへ in vivo においてプラスミドベクターを導入する条件を検証した。哺乳動物細胞で GFP を発現するプラスミドベクター pCMS-EGFP を lipofectamine plus (Invitrogen) を用い静脈内、腹腔内に投与した。またエレクトロポレーションを用いプラスミド単体を大腿筋肉に投与した。肺、肝臓、大腿筋における GFP 発現は western blot analysis で検出した。

(5) VIP、PACAP 発現プラスミドベクターの構築。

マウス脳組織より mRNA を抽出し、RT-PCR により VIP (NM_011702.2), または PACAP (NM_009625.2) の cDNA を増幅した。PCR プロダクトをプラスミドベクター pCMS-EGFP, pSecTag2 に導入した。構築したベクターを HEK293 細胞に lipofectamine を用い transfection させ、PCR, western blot により mRNA, peptide の発現を検証した。

(6) VIP 及び PACAP 発現プラスミドベクターによる肺高血圧への治療効果検討。

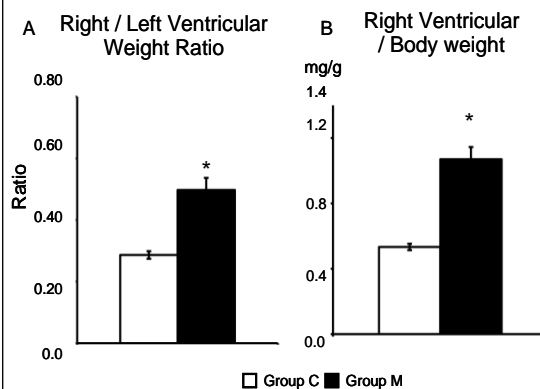
モノクロタリン誘発肺高血圧モデルに VIP, PACAP 発現プラスミドベクターを方法(4)で検証した方法で導入し、循環動態から治療効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 肺高血圧モデル作製

ラットにモノクロタリン 60mg/kg を一回投与した。4週間後、右室圧、右室圧/左室圧比、右室重量/左室重量比の上昇を認め、肺高血圧症、右肥大を確認した。(Fig. 1)

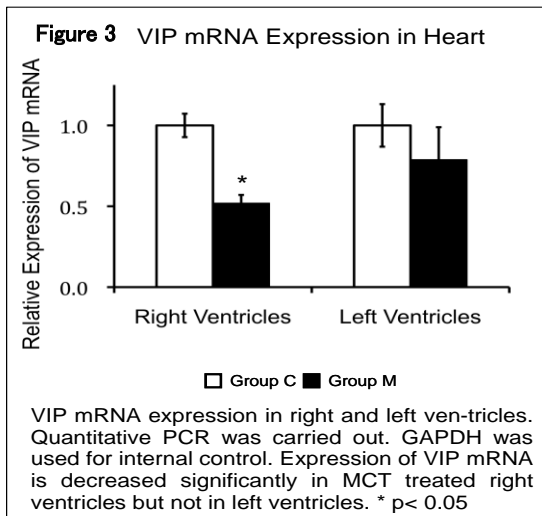
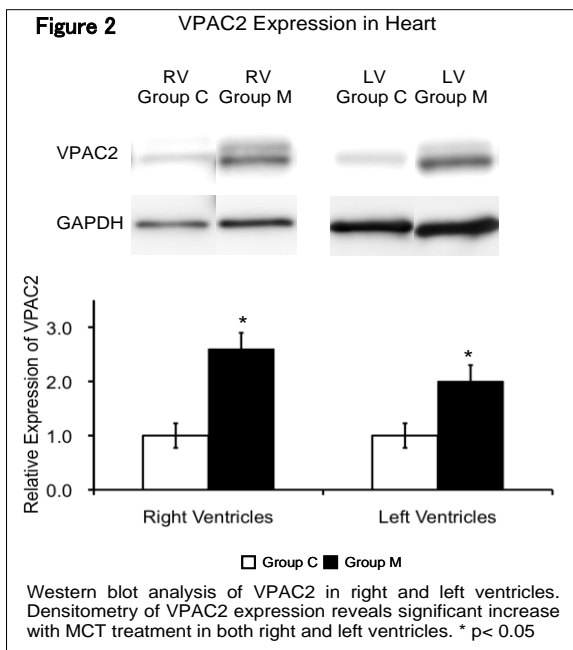
Figure 1



Ratio of RV to LV+IVS weight is shown in panel A. Ratio of RV to body weights is shown in panel B. These ratios in Group M are increased significantly. * p< 0.05

(2)肺、心臓、血液中VIP, PACAP 及び受容体発現量。

肺高血圧ラット肺及び右心室組織中のVIP, PACAP は減少していた。一方、VPAC1, VPAC2 及び PAC1 受容体発現の亢進を認めた。血液中のVIP量は不変であった。VIP, PACAPの減少に対しPAC1, VPAC1, VPAC2受容体が代償的に増加していると推測された。これらの結果より、PACAP, 又はVIPを補充することで肺高血圧を改善する、との仮説の検証に進んだ。VIP, PACAP発現プラスミドベクター作製と、in vivoでの導入条件検討を開始した。(Figure 2, 3)



(3)免疫組織学的検討を行ったが、肺、心臓組織とも発現部位を未だ十分には解明できておらず、染色条件検討を継続している。

(4)プラスミドベクターのin vivoにおける導入条件検討。

GFP発現プラスミドベクターpCMS-EGFPをlipofectamineを用い静脈内、腹腔内に投与した。投与2日後、肺、肝臓組織においてGFPの発現を認めた。発現は経時的に減少した。ベクターの再投与により再びGFPの発現が見られた。エレクトロポレーションによる大腿筋での発現は数日から数週間継続した。静脈内、腹腔内投与では肺組織に導入されやすいため、肺疾患への応用に都合が良いが、発現を比較的長期に維持するには定期的な投与が必要になる。一方、Recombinant VIP, PACAPは内因性VIP, PACAPと同様、前駆体はシグナルペプチドが存在するため細胞外に分泌される。従って大腿筋、肝臓等の標的以外の組織にベクターが導入されても、血中濃度は上昇し得る。

以上より、上記の各投与方法による組織へのベクター導入は確認された。最も治療効果が高い投与方法の決定のため、VIP, PACAP発現ベクターを用いた検討に進んだ。

(5)VIP, PACAP発現プラスミドベクターの構築。

VIP, PACAP発現ベクターは上記研究方法により作製した。PCR、制限酵素による切断パターン、シーケンス等の方法により設計通りのベクターであることを確認した。ベクターをHEK293細胞にlipofectamineを用い導入し、recombinant VIP, PACAPのmRNA, peptide発現をPCR, western blotにより確認した。

(6)VIP及びPACAP発現プラスミドベクターによる肺高血圧への治療効果検討。

現在、作製したベクターを肺高血圧ラットに投与し治療効果の検討を行っている。治療効果は右心圧、右心圧/左心圧比、右心重量/左心重量比、組織内VIP, PACAP量、受容体発現量で評価する。現在、異なる投与方法で検討中である。

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)

[学会発表] (計4件)

(1)水野祐介、川上裕理、古賀資和、後藤隆久 実験的肺高血圧症における toll-like receptor 4 の関与と Heme oxygenase-1 によるその抑制。日本麻酔科学会学術集会 神戸 2011.5.19 (予定)

(2)Hiromasa Kawakami, Yusuke Mizuno, Mokazu Koga, Takahisa Goto. "Attenuation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by heme oxygenase-1 involves toll-like receptor 4 signalings". European Society of Anesthesiologists. 2010.6.13 Helsinki, Finland.

(3)Mokazu Koga, Yusuke Mizuno, Hiromasa Kawakami, Takahisa Goto. "Altered expression of VIP/VPAC2 in hypertrophic right ventricle induced with monocrotaline in rats." American Society of Anesthesiologists. 2009.10.20 New Orleans , USA

(4)Hiromasa Kawakami, Yusuke Mizuno, Mokazu Koga, Takahisa Goto. "Effect of Hemin on Pulmonary Artery Pressure of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." American Society of Anesthesiologists. 2008.10.20 Orland, USA.

。

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上裕理 (Kawakami Hiromasa)

横浜市立大学附属病院麻酔科

研究者番号：90407958

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし