

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16023

研究課題名（和文）血管老化に着目した慢性血栓塞栓性肺高血圧症における血栓器質化機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism of CTEPH by focusing on vascular aging

研究代表者

谷口 悠（Taniguchi, Yu）

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80823046

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：わが国におけるCTEPH患者数は増加の一途をたどっている。しかし、依然としてCTEPHの発症・進展の分子メカニズムは不明であり、その発症の本態に迫る研究は乏しい。本研究において、PEAサンプルを二光子顕微鏡で包括的に器質化の程度を理解する、という独自のアプローチを展開した。具体的な励起波長や観察波長の最適化を検討した。これらの本研究結果は、CTEPH発症の分子メカニズムを明らかにして新たなCTEPH治療方針を提案する可能性があり、またさらには将来的には有効な治療薬の開発に資するシーズを提供する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化に加え、疾患の認知・治療法の発達によりわが国におけるCTEPH患者数は増加の一途をたどっている。BPA、PEAに加え可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬の登場によりCTEPH症例のQOLや予後は10年前とは比較にならないくらい劇的に改善し、CTEPHは今や「治る病気」になった。しかし、依然としてCTEPHの発症・進展の分子メカニズムは不明であり、その発症の本体に迫る研究は乏しい。本研究は、CTEPH発症の分子メカニズムを明らかにして新たなCTEPH治療方針を提案する可能性があり、またさらには将来的には有効な治療薬の開発に資するシーズを提供する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The number of CTEPH patients is increasing with aging of society and with development of diagnosis accuracy and improvement of its therapy. However, the molecular mechanism of initiation and development of CTEPH is unclear. Because of lack of adequate model, little is ongoing in investigating the basis of pathological mechanisms. Here, we evaluated the CTEPH progress using two photon microscopy. Using our technique, there are possibilities to understand the molecular mechanism and provide the new therapies of CTEPH.

研究分野：循環器内科

キーワード：血栓

1. 研究開始当初の背景

慢性肺血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) は器質化した血栓により肺動脈が狭窄・閉塞し、肺動脈圧が上昇して心不全を発症する難治性疾患である。近年、CTEPH 治療のゴールドスタンダードとされている血栓内膜摘除術 (PEA) に加え、バルーン肺動脈形成術 (BPA) および血管拡張薬の可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬 (リオシグアト) の登場により、CTEPH 症例の QOL および生命予後は劇的に改善した。しかしながらこれらの治療を組み合わせても器質化血栓による肺動脈の狭窄・閉塞病変の進展や肺高血圧の増悪が抑制できない症例が一部にあるのも事実であり、さらなる病態の解明が望まれている。CTEPH の発症は加齢とともに増加し、70 歳代が発症のピークとなっている。また、超高齢化社会を迎えつつある本邦において患者数は増加の一途をたどっている。以上の疫学的データからは、CTEPH の発症には加齢が関与していることが示唆される。CTEPH は、急性肺血栓塞栓症が発症後に血栓が器質化することで発症すると考えられる。しかし、CTEPH を発症するのは、急性肺血栓塞栓症のうちのわずか約 0.1-3.8% とされており、大部分の急性肺血栓塞栓症症例では線溶系が働き血栓が融解していると考えられている。すなわち、特殊な条件下において、肺動脈の新鮮血栓が溶解せずに主に線維組織で構成される器質化血栓として残存することにより CTEPH の病態が形成されるのである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、加齢に伴う血栓器質化反応の機序を解明することである。具体的には「血管の老化が血栓の器質化を促進し、血栓の溶解スピードを上回ることが CTEPH の病態を形成する」という仮説を下記の 2 つのアプローチを用いて検証する。

3. 研究の方法

二光子顕微鏡を用いた PEA サンプルのホールマウントイメージング

二光子顕微鏡は共同研究機器であり、使用頻度も高いため、手術サンプルの採取直後に使用できる可能性は低い。よって、神戸大学医学部附属病院で血栓内膜摘除術を施行された症例において、摘出された器質化血栓を無固定で凍結保存する。実際の二光子顕微鏡イメージングの際は肉眼的に確認可能な末梢肺動脈病変があれば、そこから FITC デキストランを注入し、簡易に血管内腔を描出可能である。もし確認できなければ isolectin をホールマウント下に浸潤させて、血管内皮を蛍光染色することで、血管を描出する。血栓の線維化は二光子顕微鏡では SHG (第 2 高調波発生光) 技術により、染色ステップなしで、直接可視化できる。これによって、摘除サンプル全体を俯瞰的に観察し、線維化の程度が進行したエリアと、比較的新鮮であると想定される、線維化の少ないエリアを同定可能である。その後、線維化の進行したエリア、中等度のエリア、少ないエリアをそれぞれ病理解析のために薄切し、詳細に検討する。これにより、既存の盲目的な病理解析では未解明であった、CTEPH における血栓器質化機構の解明につながる可能性が高い。

血管老化マウスにおける血栓器質化反応の解析

CTEPH は高齢者に多いことが疫学的に明らかになっている。それゆえ、申請者は血管の老化が血栓の器質化を促進し、血栓の溶解スピードを上回ることが原因ではないか、という仮説を着想した。これを検証するために、血管老化マウスを用いた基礎研究を行う。具体的には血管老化マウスに下大静脈結紮による静脈血栓を形成される。野生型マウスでは結紮後 4 日程度から血栓の線維化が進み、14 日目にはほぼ線維化が完成することが知られている。血管老化マウスにお

いて、この血栓の線維化の速度が野生型マウスより早いことを二光子顕微鏡による SHG 技術により生体下に同一マウスで経時的に観察することにより明らかにする。その後、病理学的にマッソン染色による線維化の評価でも確認を行う。血栓の線維化のみではなく、線維化に先行して、好中球やマクロファージが血栓内に浸潤することも知られている。これら炎症細胞の浸潤が血管老化マウスにおいて、増加していることを病理学的に検証する。

4. 研究成果

二光子顕微鏡によるイメージング法を用いた解析

外科的は到達困難な、種々の器質化ステージの局所病変に効率的に到達することができる。研究期間中に二光子顕微鏡の故障があり、イメージング研究は遅れていたが、2022年12月ようやく再稼働できた。その中で、今年度は二光子顕微鏡の追加修理の間に、フィルター設置条件を再検討することで、4色同時イメージングが可能か否かを検討した。二光子励起可能な励起光波長を持ちながら、既存の DAPI, FITC, Cy3 の3波長領域より長い Cy5 領域の蛍光をもつ、Qtracker655 を検出できるように二光子顕微鏡の最適化を行った。新規に Cy5 用のフィルターを追加しても、CY5 領域の蛍光を検出できなかった。この原因を検討したところ、予想外に検出光の光路において、UV 領域と CY5 より遠位の波長をブロックするようなフィルターがデフォルトで設置されていた。これを除いてみたところ、多波長領域とシグナルの重ならない独自の蛍光シグナルを検出可能となり、Qtracker655 を実際にマウスに投与した場合においても血管領域に一致した血流シグナルを得ることに成功した。しかし、この条件下では SHG (第二次高調波) によるコラーゲン繊維の検出が一部の励起光波長においては困難になることが一部デメリットになることがわかったが、これも、励起光波長の最適化によって、最低限の SHG 検出に成功し、4色同時イメージングを生体において可能とすることができた。

血管老化マウスにおける血栓器質化反応の解析

「高齢者では血栓の器質化反応(炎症細胞浸潤や線維化)が早いため、血栓溶解が不完全となり、器質化血栓として肺動脈に残存して CTEPH となる」という仮説に基づき、血管のみが老化した遺伝子改変マウス(TRF-2DN マウス:血管老化マウス)に静脈血栓を形成し、炎症細胞浸潤や線維化形成を経時的に観察し、野生型(WT)マウスと比較した。これまでの研究結果では、血管老化マウスでは予想に反して、小型の血栓が形成されることが想定される。また、器質化が進んだ白色血栓が形成されることが明らかになりつつある。これらを総合すると、現時点では器質化のスピード亢進が起こっているものと思われる。これはすなわち CTEPH 病変の形成にも影響を及ぼしている可能性が高く、今後も解析をすすめていく。

社会の高齢化に加え、疾患の認知・治療法の発達によりわが国における CTEPH 患者数は増加の一途をたどっている。BPA, PEA に加え可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬の登場により CTEPH 症例の QOL や予後は 10 年前とは比較にならないくらい劇的に改善し、CTEPH は今や「治る病気」になった。しかし、依然として CTEPH の発症・進展の分子メカニズムは不明であり、その発症の本態に迫る研究は乏しい。本研究は、CTEPH 発症の分子メカニズムを明らかにして新たな CTEPH 治療方針を提案する可能性があり、またさらには将来的には有効な治療薬の開発に資するシーズを提供する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------