

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591573

研究課題名(和文)肺高血圧における血管周囲交感神経の血管リモデリングへの関与とエンドセリンの役割

研究課題名(英文)The role of perivascular sympathetic nerve in the development of experimental pulmonary arterial hypertension and the effect of endothelin on vascular innervation

研究代表者

加藤 太一 (KATO, TAICHI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20422777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺高血圧症での新規治療標的の探索目的で、血管周囲交感神経の肺血管リモデリングへの関与とエンドセリンの役割を検討した。肺高血圧病変の中心となる血管周囲には交感神経の分布は極めて稀で、より近位の血管周囲に多く認められたが、後者はコントロール群に比べて肺高血圧群で少なかった。エンドセリン拮抗薬アンブリゼンタンによる分布の差異は認めなかった。本研究によりラットMCT誘発肺高血圧病変における血管周囲交感神経の分布が明らかとなった。一方、肺高血圧病変において、エンドセリンを介した血管周囲交感神経の関与はあまり強くない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the role of perivascular sympathetic nerve in the development of experimental pulmonary arterial hypertension and the effect of endothelin antagonist, ambrisentan, on vascular innervation were investigated. Perivascular sympathetic nerves around pulmonary arteries with the diameter of 50-200  $\mu\text{m}$  were very rare. On the other hand, more nerves were confirmed at larger pulmonary arteries. Perivascular sympathetic nerves at larger pulmonary arteries were decreased in pulmonary arterial hypertension group compared to control group. In addition, these distributions were not affected by ambrisentan. These results demonstrated the distribution of perivascular sympathetic nerve in the development of experimental pulmonary arterial hypertension. Furthermore, the effect of ambrisentan on vascular innervation was limited. Therefore, the other factors associated with decreased vascular sympathetic nerve remain to be elucidated.

研究分野：小児科学

キーワード：肺高血圧症 交感神経 リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性疾患である肺高血圧症では、従来、細胞成分などの増殖による血管内腔の狭窄に対して、肺血管を直接拡張させる薬剤が開発され、治療に応用されているが、それらの薬剤で治療には至らず肺移植が行われる例もあり、新たな治療戦略が必要である。

(2) 血管トーンは交感神経線維もその制御に関与している。肺高血圧患者では交感神経活動が亢進していることについてはこれまでも複数の報告があるが、肺血管における交感神経支配と肺高血圧病変の関連については組織学的には明らかにされていない。

(3) 肺高血圧病変の形成に大きく関与していることが知られているエンドセリンは血管周囲交感神経の神経支配の形成にも関与していることが報告されている。一方、肺高血圧症の治療に臨床でもすでに用いられているエンドセリン拮抗薬は肺血管壁の中膜平滑筋の肥厚を改善するが、肺血管リモデリングの過程に神経支配が関与しているかは分かっていない。

(4) 近年高血圧症の治療において、腎動脈に沿った神経をカテーテルを用いて焼灼する手法で強い降圧効果が得られることが報告されており、血管周囲神経がこうした疾患において重要な治療ターゲットになりうることを示唆されている。しかしながら、肺血管における血管周囲神経の存在についてはこれまでほとんど解析されていない。

## 2. 研究の目的

本研究においては、肺高血圧症病変での肺血管リモデリングにおける血管周囲交感神経の役割を解明するため、ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデルを用いて、血管周囲交感神経支配の変化を評価し、さらに肺高血圧治療薬として、臨床ですでに用いられているエンドセリン拮抗薬の血管周囲交感神経支配に対する作用も合わせて検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ラットモノクロタリン誘発肺高血圧モデルをモノクロタリン (以下 MCT) の皮下注により作成した。アンプリセンタン治療群 (以下 A 群) はエンドセリン拮抗薬アンプリセンタンを、非治療群は MCT 投与後生理食塩水を 16 日間経口摂取させた (以下 M 群)。さらに、コントロール群として MCT を投与しなかったラットも設定して (以下 C 群) 3 群で評価した。さらに、経時的な変化を見る目的でアンプリセンタンによる治療期間を 21 日間にして 3 群で比較した。

(2) 16 日間、あるいは 21 日間の飼育期間後、右室圧測定を行った上で屠殺した。右室圧測

定は麻酔下で、胸骨下から 21 ゲージ針にて右室を直接穿刺して、圧モニターにて測定を行った。続いて、ラットを気管切開した上で、小動物用人工呼吸器にて人工換気下に開胸し、右室前壁より肺動脈内にカテーテルを挿入固定した。その上で、固定したカテーテルよりリン酸緩衝生理食塩水にて還流を行った上で 4% パラフォルムアルデヒドにて固定した。屠殺後に右室/左室 + 心室中隔重量比の測定も行い、肺高血圧と右室肥大の評価を行った。

(3) 肺組織の評価として、ヘマトキシリンエオジン染色、エラスチカワンギーソン染色、抗アルファアクチン抗体による免疫染色を行い、肺血管の形態、中膜の筋性化の程度および血管密度を 3 群間で比較した。エラスチカワンギーソン染色にて内弾性板と外弾性板に囲まれた中膜が、50-200  $\mu\text{m}$  の径の肺血管において、周の何%に存在するかを評価したうえで、25% 未満を筋性化なし、25-75% を部分的筋性化、75% 以上を筋性化血管と判定し、全体の血管本数に対する部分的筋性化および筋性化血管の本数の割合にて血管の筋性化を評価した。さらに、抗アルファアクチン抗体による免疫染色でも同様の血管において周の何%が陽性かを評価し、同様の基準で筋性化を評価した。血管本数については肺胞 100 個あたりの血管本数を 20 視野において計測し、比較した。

(4) チロシンヒドロキシラーゼ (以下 TH) をマーカーとして、免疫染色により、血管周囲の交感神経の分布を光学顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡にて検討した。これにあたっては、肺高血圧病変の中心である 50-200  $\mu\text{m}$  の径の肺血管周囲における分布と、より近位の径の大きい肺血管周囲における分布を分けて検討し、3 群間での分布の相違を検討した。また、病変形成における経時的な経過を見るために、MCT 投与後 16 日と 21 日のそれぞれにおいて、検討を行った。

(5) MCT 誘発肺高血圧モデルラットに対するエンドセリン拮抗薬のカテコラミン分泌への影響評価のため、ELISA 法にて血漿ドーパミン、アドレナリンを測定し、3 群間で比較した。

## 4. 研究成果

(1) MCT 投与後 16 日、あるいは 21 日の血行動態評価でいずれも M 群では著明な右室圧の上昇と右室/左室 + 心室中隔重量比の上昇、すなわち右室肥大を認めしたが、A 群においては M 群に比較していずれも軽快していた。

(2) MCT 投与後 16 日、あるいは 21 日の肺組織において、エラスチカワンギーソン染色による評価では、中膜の筋性化は C 群に比べて M 群で増悪していたが、A 群では改善してい

た。この結果は抗アルファアクチン抗体による免疫染色での評価でも同様であった。また、血管密度については MCT 投与後 16 日、あるいは 21 日のいずれにおいても C 群に比べて M 群で減少していたが、A 群では改善していた。

(3) 肺高血圧病変の中心である 50-200  $\mu\text{m}$  の径の肺血管周囲における TH 陽性シグナルは極めてまれにしか存在しなかった (図 1)。一方で、さらに近位の径の大きい肺血管の周囲には TH 陽性シグナルはいずれの群においても認められ (図 2)、50-200  $\mu\text{m}$  の径の肺血管よりも多く認めた。3 群間での比較では、C 群に比べて M 群で少ない傾向にあったが、M 群と A 群で明らかな差は認めなかった。MCT 投与後 16 日と 21 日で同じ群同士で比較した場合、いずれの群においても TH 陽性シグナルに有意な差は認めなかった。

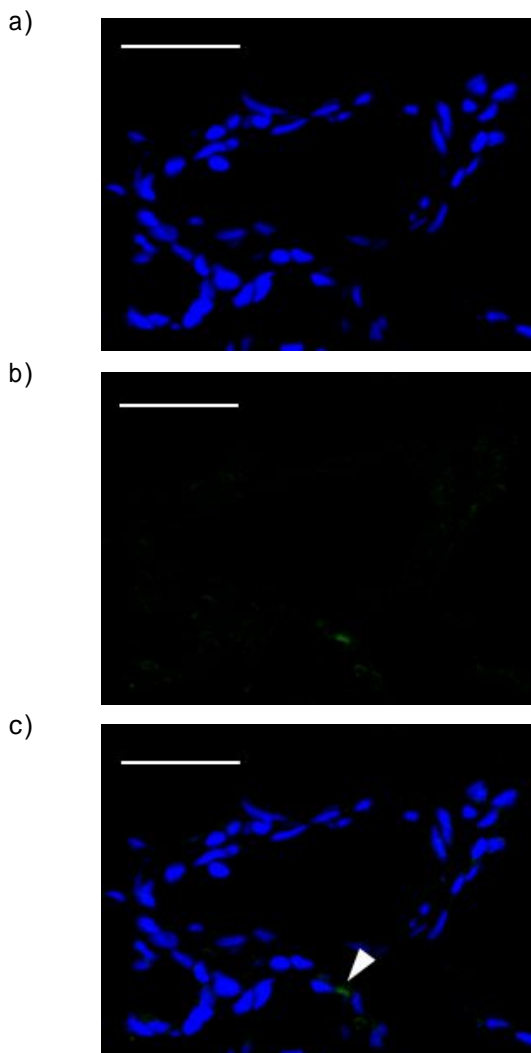


図 1 50-200  $\mu\text{m}$  の径の肺血管周囲における肺血管周囲交感神経 (線は 30  $\mu\text{m}$  を示す)

- a) 核染色
- b) TH 染色
- c) 合成画像。矢頭は肺血管周囲交感神経を示す TH 陽性シグナル

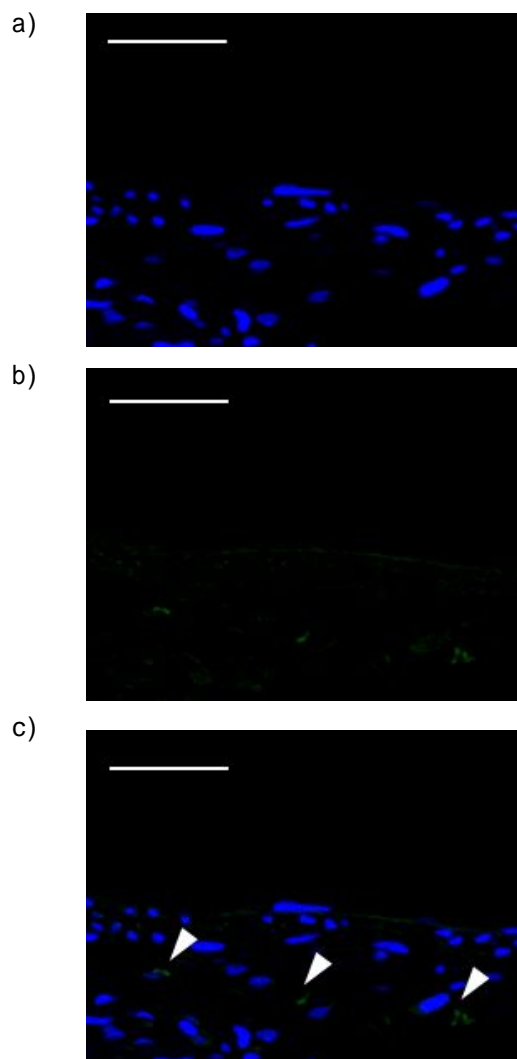


図 2 近位肺動脈における肺血管周囲交感神経 (線は 40  $\mu\text{m}$  を示す)

- a) 核染色
- b) TH 染色
- c) 合成画像。矢頭は肺血管周囲交感神経を示す TH 陽性シグナル

(4) 血漿ドーパミンは 3 群間で明らかな差異を認めなかったが、血漿アドレナリンは C 群よりも M 群で高い傾向があり、A 群ではさらに高かった。

以上の結果より、ラット MCT 誘発肺高血圧病変における血管周囲交感神経の分布は、肺血管病変の中心である 50-200  $\mu\text{m}$  の径の肺血管周囲には極めて稀にしか存在せず、むしろ、それよりも近位の大血管において多く認められることが明らかとなった。また、これらの肺血管周囲交感神経は肺高血圧モデルにおいてコントロール群よりも減少しており、病変形成において何らかの関与をしている可能性が示唆された。一方、エンドセリン拮抗薬アンプリセンタンを用いても、肺血管周囲交感神経の分布に明らかな差は認めなかったことから、肺高血圧病変形成における肺血管周囲交感神経の分布において、エンドセ

リンの関与はあまり強くない可能性が示唆された。今後、肺高血圧病変における近位の肺血管周囲交感神経の分布を修飾する因子の探索が必要であると考えられた。また、血漿中のアドレナリン濃度はこうした肺血管周囲交感神経の量に一致した傾向を示しておらず、交感神経の機能など別の要素が関与していることが示唆された。肺動脈周囲交感神経が肺高血圧症の治療ターゲットになるかはこれらに対する更なる検討が必要である。

#### 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)

[雑誌論文](計 3件)

1. Otsuki S, Sawada H, Yodoya N, Shinohara T, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Imanaka-Yoshida K, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y.

Potential contribution of phenotypically modulated smooth muscle cells and related inflammation in the development of experimental obstructive pulmonary vasculopathy in rats.

PLoS One. (査読有) Vol.10, No.2, 2015, p.e0118655.

doi: 10.1371/journal.pone.0118655.

2. 鬼頭真知子、長井典子、小沢広明、加藤太二、馬場礼三

左室心筋緻密化障害および肥大型心筋症様の所見を示したのち histiocytoid cardiomyopathy と病理診断されたミトコンドリア病の一例

日小児循環器会誌 (査読有) 30 巻 2 号、2014、205-214

3. Sato Y, Kawataki M, Hirakawa A, Toyoshima K, Kato T, Itani Y, Hayakawa M. Central venous pressure in mechanically ventilated neonates correlates with the diameter of the inferior vena cava.

Acta Paediatr. (査読有) Vol.102, No.6, 2013, pp.e241-6.

doi: 10.1111/apa.12247.

[学会発表](計 6件)

1. 加藤太二

心臓病を持った児童生徒の管理をどうするか

平成 26 年度学校保健シンポジウム 2015 年 3 月 1 日 愛知県医師会館(愛知県名古屋市)

2. 大槻祥一郎、澤田博文、淀谷典子、篠原務、加藤太二、大橋啓之、張尔泉、新保秀人、丸山一男、駒田美弘、三谷義英

肺動脈性肺高血圧進展における血管平滑筋細胞の形質転換と炎症の関与：ヒト肺動脈性肺高血圧類似ラットモデルを用いた検討

第 50 回日本小児循環器学会 2014 年 7 月 4 日  
岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

3. 篠原務、澤田博文、淀谷典子、大槻祥一郎、大橋啓之、加藤太二、Zhang Erquan、丸山一男、新保秀人、駒田美弘、三谷義英  
新規エンドセリン受容体拮抗薬マシテンタンはヒト肺動脈性肺高血圧類似ラットの早期血管病変を reverse させる：抗リモデリング作用と分子機序から見た早期治療の意義  
第 50 回日本小児循環器学会 2014 年 7 月 4 日  
岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

4. 加藤太二、三谷義英、澤田博文、池山夕起子、出口隆生、榎屋正浩、張尔泉、丸山一男、新保秀人、駒田美弘

治療標的としての肺高血圧病変形成における骨髄由来細胞動態

第 1 回日本肺高血圧学会学術集会 2013 年 10 月 13 日 慶應義塾大学日吉キャンパス協生館(神奈川県横浜市)

5. 加藤太二、岸本泰明、深澤佳絵、沼口敦、羽田野爲夫、郷清貴、太田宇哉、倉石建治、早野聡、馬場礼三

川崎病冠動脈石灰化のバイオマーカーとしての単球サブポピュレーションの検討

第 33 回日本川崎病学会学術集会 2013 年 9 月 27 日 富山国際会議場(富山県富山市)

6. 加藤太二、澤田博文、大橋啓之、大槻祥一郎、淀谷典子、池山夕起子、榎屋正浩、宮田恵里、中村志帆、新保秀人、丸山一男、駒田美弘、三谷義英

Bosentan Promotes Incorporation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells but Inhibits Infiltration of Macrophages in Mice Exposed to Chronic Hypoxia.

第 77 回日本循環器学会総会 2013 年 3 月 16 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 太一(KATO, Taichi)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20422777

(2)研究分担者

深澤 佳絵(FUKASAWA, Yoshie)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00612764

(3)連携研究者

佐藤 義朗(SATO, Yoshiaki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30435862