

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592333

研究課題名(和文) 硫化水素による実験的肺高血圧治療と内因性硫化水素産生系の解析

研究課題名(英文) pulmonary hypertension and hydrogen sulfide

研究代表者

丸山 一男 (Maruyama, Kazuo)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20181828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素(NO)は、肺高血圧と肺高血圧血管病変の発生を抑制する。硫化水素も、生体内で産生させる生理活性物質で、NOと同様の作用を持つ。NOは硫化水素の産生を高めると報告されているので、本研究では、硫化水素を産生させるNaHSをモノクロタリン誘起肺高血圧ラットと慢性低酸素暴露肺高血圧ラットに腹腔内投与(予防実験として単回連日投与、治療実験としてオモポンプによる持続投与)して、肺高血圧および肺高血圧血管病変に対する、発症予防効果および治療効果を調べた。予想に反して、高濃度NaHS投与(12mg/day=500µg/hr 3日間持続投与)により、正常ラットの肺NO合成酵素の発現が低下した。

研究成果の概要(英文)：To determine if hydrogen sulfide prevents the development of pulmonary hypertension, we gave sodium hydrogen sulfide(NaHS), hydrogen sulfide donor, (1) to rats by intra-abdominal injection daily from one day before the injection of monocrotaline for 19 days (prevention protocol), (2) to rats by osmo-pump from day15 to day17 day after the injection of monocrotaline (therapeutic protocol), and (3) to rats by osmo-pump from day12 to day14 after the start of continuous hypobaric hypoxic exposure(380mmHg, 10%oxygen) (therapeutic protocol). <Results>Continuous intraabdominal administration of NaHS(12mg/day=500µg/hr) for 3 days by Alzat osmo-pump reduced eNOS mRNA and protein expression in lung tissue. We could not detect the preventable or therapeutic effect on experimental pulmonary hypertension at least in the present experimental protocol of NaHS administration.

研究分野：麻酔集中治療学

キーワード：肺高血圧 硫化水素 一酸化窒素 硫化水素ナトリウム モノクロタリン 慢性低酸素

1. 研究開始当初の背景

我々は、肺高血圧血管の器質的变化に対する、発症抑制や回復促進対策について、実験的肺高血圧モデルを用いて報告してきた。肺高血圧血管では、代償性に内因性 NO 産生能が高まっているが (J Anesth 24:432-440, 2010)、これに加えて内因性の NO (nitric oxide) -cGMP 系をさらに賦活する操作は、肺血管平滑筋の異常な肥大・増生を主体とする肺高血圧血管病変の発生を抑制することを報告した (Circulation 96:689-97, 1997 ; J Thorac Cardiovasc Surg 136: 142-9, 2008)。NO は、NADPH オキシダーゼを抑制しスーパーオキシドの産生を低下させることから抗炎症作用を持つので、血管拡張作用に加えて、抗炎症作用が肺高血圧血管病変の発症を抑制する可能性がある。我々はこれまで、炎症反応に介在する転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) の拮抗薬である pyrrolidine dithiocarbamate がラットにおいて、モノクロタリンによる肺高血圧血管病変の発生を抑制することを見出し、同肺高血圧血管病変が NF- κ B を介する炎症反応の一種であることを示した (Chest 132: 1265-74, 2007)。つまり、NO のような血管拡張作用と抗炎症作用を持つ物質は、急性の肺動脈圧降下作用や慢性的な肺高血圧血管病変の発生を抑制するのではないかと考えられる。

一方、我々は、外因性 NO 吸入の肺高血圧治療における限界も明らかにしている (Chest 126: 1919-25, 2004 ; Chest 125:2247-52, 2004)。さらにレチノイン酸投与により内因性 NO を高める操作では、肺高血圧の発症を抑制できないことも報告した (Circ J 74: 1696-703, 2010)。したがって内因性や外因性の NO には、肺高血圧発症抑制効果が確かに存在するが万能ではなく、NO をハブ (中継点) としたその先の状態や反応が、病態発生や治療において重要な可能性もある。つまり、NO が標的とする物質がすでに枯渇していたら、NO の効果は十分に発揮できないであろう。

NO の標的物質として、 H_2S の存在は以前、他の研究者から報告されているが、肺動脈や肺高血圧での H_2S の動態は不明である。NO ドナーである SNP (構造上 NO を含み、NO を放出する) 存在下にラットの摘出腸間膜動脈や大動脈を培養すると、 H_2S 産生が増加した (Zhao W, et al. EMBO J 20: 6008-16, 2001)。つまり、NO は H_2S 産生を高める。

2. 研究の目的

硫化水素 (H_2S) は、血管内皮細胞で、cystathionine -synthase (CBS) や cystathionine -lyase (CSE) という内因性のいわば硫化水素合成酵素により産生される生理活性物質である。一酸化窒素 (NO) と類似の作用を持ち、血管拡張や抗炎症効果を持つ。NO による肺高血圧の発症抑制効果はす

で報告されているが、NO が内因性 H_2S 産生を高めるという報告もある。本研究課題では、ラットにおける肺高血圧モデルを用いて、肺高血圧と肺高血圧血管病変の発症に対する硫化水素ドナーによる抑制効果を調べるとともに、内皮型一酸化窒素合成酵素への影響を調べた。

硫化水素ナトリウム (NaHS) は、体内に投与すると分解され H_2S を放出する H_2S ドナーである。実際、 H_2S は、血管平滑筋拡張作用、酸化ストレスに対するグルタチオン産生を介した抑制作用、虚血再灌流障害の抑制作用、iNOS の抑制作用、炎症性サイトカイン産生抑制作用などが報告されている。最近、他の研究者により、マウスを用いた実験で、 H_2S が心停止後の蘇生率を改善し、同時に NO 合成酵素のリン酸化が上昇すると報告された (Circulation 120:888-96, 2009)。

本研究では、実験的肺高血圧に対する、NaHS による発症抑制効果、NaHS による回復促進効果を調べ、肺における一酸化窒素合成酵素 (NOS) への NaHS による影響を調べた

3. 研究の方法

硫化水素ナトリウム (NaHS) は、体内に投与すると分解され、 H_2S を放出する H_2S ドナーである。本課題では、NaHS を実験的肺高血圧ラットモデルに投与し、肺高血圧と肺高血圧血管病変の発症に対する抑制効果を生理学的 (肺動脈圧測定)、病理学的 (肺血管組織の評価、右心室肥大) に調べ、肺組織の NOS 発現を mRNA および蛋白レベルで調べた。

4. 研究成果

A 正常ラットにおける3日間持続投与と実験

生理食塩水投与群と NaHS投与群 (500 μ g/hour) では平均肺動脈圧、平均動脈圧、平均肺動脈圧/平均動脈圧)、右心室重量 / (心室重量+中隔) (RV/LV+S) で両群に、有意差はなかった。この2群の肺eNOS 発現量を調べた。

雄の Sprague-Dawley ラット (6 週齢、体重 180-200g、計 8 匹) を生理食塩水投与群 (n=4)、NaHS (500 μ g/hour) 投与群 (n=4) に分け、浸透圧ポンプ留置後3日目に、組織を取りだし、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の発現を mRNA および蛋白レベルで調べた。

RT (reverse transcription) -realtime-PCR では、NaHS投与群の方がeNOSの発現量が少ないものの、有意差は見られなかった (図1)。

Western blotting では、標準化 eNOS/actin (生理食塩水投与群の eNOS/actin の平均値を 100 として、他の値を相対的に補正) は NaHS 投与群で有意に低かった (図2)。

($p < 0.05$)

図 1

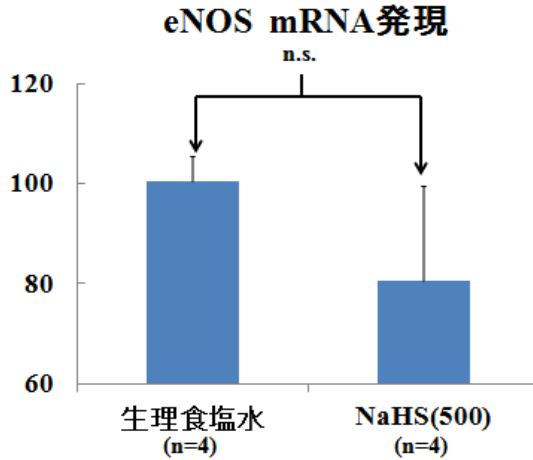
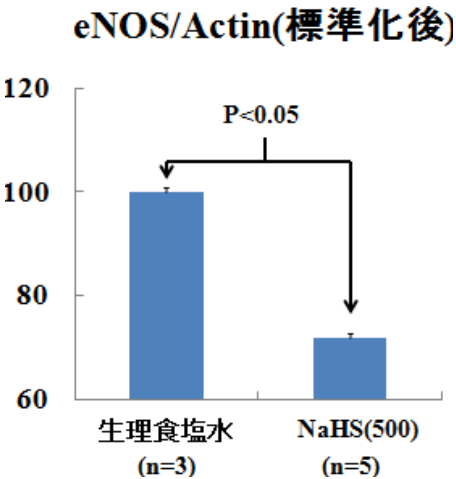
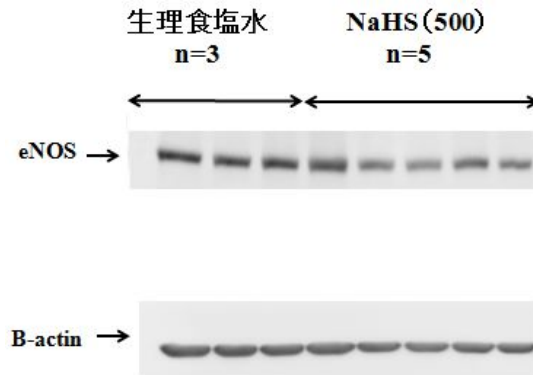


図 2



B 発症前からの連日投与による、発症予防実験

慢性低酸素曝露モデル (0.78mg / kg / 日) (= 1.4 μmol/kg/日)
 空気下コントロールラットの平均肺動脈圧は、19.9 ± 0.5 mmHg (n = 6) で慢性低酸素曝露(1/2気圧、10%酸素 14日間)で37.5 ± 2.9 mmHg (n=4)に上昇した。NaHS 投与慢性肺高血圧ラット

では、39.7 ± 1.2 mmHg(n=8)であった。右心室重量 / (心室重量+中隔) 比は、それぞれ、0.26 ± 0.01、0.42 ± 0.02、0.44 ± 0.02 であった。慢性低酸素曝露により肺高血圧が発生したが、NaHS (0.78mg / kg / 日 = 1.4 μmol/kg/日)の投与は、肺高血圧の発症を抑制しなかったが、悪化もしなかった。

C 発症後の治療実験

モノクロタリンモデル モノクロタリン投与後14日目にオスポンプを植え込み3日間投与

NaHSの投与量により3群に分けた
 H2S20 : NaHS 0.48mg / 日 = 20μg / 時
 H2S100 : NaHS 2.4mg / 日 = 100μg / 時
 H2S500 : NaHS 12mg / 日 = 500μg / 時

モノクロタリン投与後19日後の平均肺動脈圧(mmHg) (対照群、H2S20、H2S100、H2S500)は、27.0 ± 2.1、228.7 ± 0.9、32.8 ± 4.3、28.6 ± 1.3; RVH (右心室重量 / (左心室+中隔)重量比)は0.33 ± 0.02、0.33 ± 0.01、0.36 ± 0.01、0.33 ± 0.01で群間に有意差を認めなかった。

肺組織のeNOSmRNAレベルは、H2S20群、H2S100群で上昇したが、H2S500群では上昇は認められなかった(図3)。一方、eNOS蛋白量(図4)の有意な群間差を認めなかった。

図 3

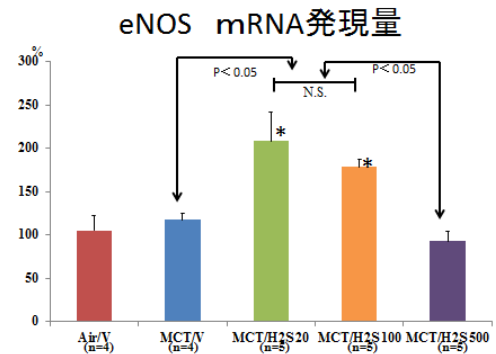
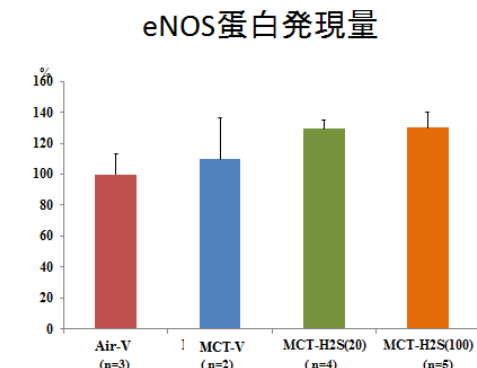
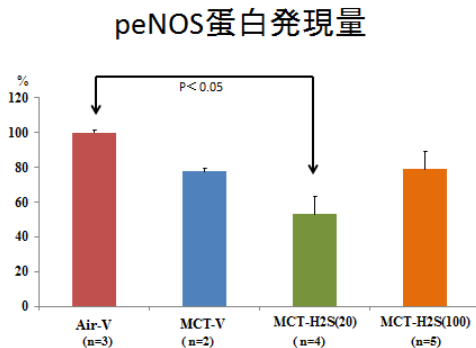


図 4



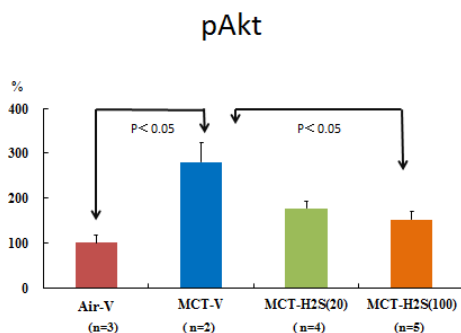
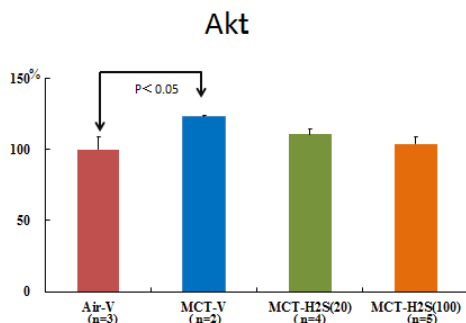
リン酸化 eNOS(peNOS)は活性型 eNOS と考えられている。モノクロタリン投与 peNOS は低下傾向を示した(図5)。

図5



モノクロタリン投与により Akt(図6)、リン酸化 Akt(図7)に上昇したが、H2S 投与の影響はなかった。

図6

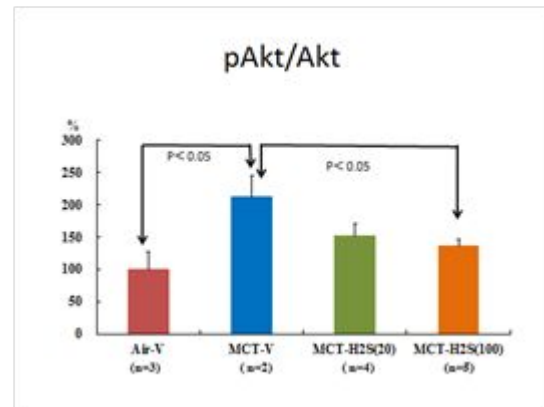


【pAkt /Akt 比】

MCT 投与により pAkt/Akt 比は有意に上昇し、NaHS 投与はこの上昇を抑制した(図7)。pAkt/Akt 比は Air/Veh 群を $100.0 \pm 27.66\%$ として考え、MCT/Veh 群 $212.8 \pm 32.85\%$ 、MCT/H2S (20 $\mu\text{g}/\text{h}$) 群 $152.6 \pm 17.38\%$ 、MCT/H2S (100 $\mu\text{g}/\text{h}$) 群 $136.3 \pm 9.80\%$ であった。Air/Veh 群に対して MCT/Veh 群は有意に高く、Air/Veh

群に対して MCT/ H2S (100 $\mu\text{g}/\text{h}$) 群は有意に低かった。

図7



D 発症後の治療実験

慢性低酸素曝露モデル 低酸素曝露開始後 12 日目にオスモポンプを植え込み 14 日まで3日間投与

NaHS の投与量により 3 群に分けた

H2S 20 : NaHS 0.48mg / 日 = 20 μg / 時

H2S100 : NaHS 2.4mg / 日 = 100 μg / 時

H2S500 : NaHS 12mg / 日 = 500 μg / 時

平均肺動脈圧 (対照群、H2S20、H2S100、H2S500)、 32.8 ± 2.5 、 35.9 ± 2.1 、 32.8 ± 4.3 、 34.0 ± 1.6 ; RVH 0.46 ± 0.01 、 0.42 ± 0.02 、 0.52 ± 0.03 、 0.46 ± 0.02 で群間に有意差を認めなかった。

結果のまとめ

H2S により NOS のリン酸化が低酸素脳症で高まると報告されている。NO は肺高血圧の発症を抑制することが報告されているので、本課題では、H2S による NOS 活性の亢進が肺高血圧に対して、発症予防効果と治療効果をもたらす可能性を調べた。結果として、NaHS の低用量 (H2S20: NaHS 0.48mg / 日 = 20 μg / 時) は NOS mRNA の発現を高めたが、eNOS 蛋白の増加をもたらさず、逆に peNOS を弱めた。NOS のリン酸化を起す pAkt はモノクロタリン単独群に比べ NaHS 群で低下傾向を示した。肺動脈圧や右心室肥大の程度は、NaHS の投与により、改善しなかったが、悪化もしなかった。

今回の NaHS 投与量・投与方法では、肺高血圧の発症予防効果、治療効果を見い出せなかった。別の NaHS 投与方法や他の H2S 供与体の使用、内因性 H2S 産生を高める操作による効果を今後、検討する必要がある。

H2S500(12mg / 日 = 500 μg / 時)の 3 日間持続投与は、正常ラットにおいて eNOS の発現を弱める作用があることが判明した。これまで、この作用の報告はないため、この生理学的役割については、研究課題となりうるであろう。

5. 主な発表論文
(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 16 件)

1. Shinohara T, Sawada H, Otsuki S, Yodoya N, Kato T, Ohashi H, Zhang E, Saitoh S, Shimpo H, Maruyama K, Komada Y, Mitani Y. Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats: early intervention in overcoming the survivin-mediated resistance to apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 5;308(6):L523-538. (2015) 査読あり
2. Zhang E, Maruyama J, Yokochi A, Mitani Y, Sawada H, Nishikawa M, Ma N, Maruyama K. Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin 5HT_{2A} receptor antagonist, ameliorates the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Anesth*. [Epub ahead of print] (2015) 査読あり
3. Yamada Y, Maruyama J(2/10), Zhang E(3/10), Sawada H(6/10), Mitani Y(7/10), Maruyama K(10/10). Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Anesth*. **28(1):26-33**. (2014) 査読あり
4. 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*. 2015 Feb 25;10(2):e0118655. doi: 10.1371 査読あり
5. Iwashita Y, Zhang E(2/10), Maruyama J(3/10), Sawada H(6/10), Mitani Y(7/10), Maruyama K(10/10). Thrombomodulin protects against lung damage created by high level of oxygen with large tidal volume mechanical ventilation in rats. *J Intensive Care* **2:57** (2014) 査読あり
6. Kruzliak P, Maruyama J, Maruyama K. Role of nitric oxide in pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension. *Vitam Horm*. **96:407-424**. (2014) 査読あり
7. Wagner R, Maruyama J(4/7), Maruyama K(5/7). Adjuvant cardioprotection in cardiac surgery: update. *Biomed Res Int*. **2014:808096**. doi: 10.1155/2014/808096 (2014) 査読あり
8. Yamanaka K, Maruyama J(4/19), Maruyama K(15/19). Persistent release of IL-1s from skin is associated with systemic cardio-vascular disease, emaciation and systemic amyloidosis: the potential of anti-IL-1 therapy for systemic inflammatory diseases. *PLoS One*. **2014 Aug 13;9(8):e104479**. (2014) 査読あり
9. 丸山一男, 横地 歩, 張 尔泉, 岩下義明, 藤岡正紀, 今井 寛, 周術期の輸液管理、消化器外科 37:1895-1907(2014) 査読なし
10. Sawada H, Mitani Y(17/20). Reduced BMPR2 expression induces GM-CSF translation and macrophage recruitment in humans and mice to exacerbate pulmonary hypertension. *J Exp Med*. **211(2):263-280**. (2014) 査読あり
11. 丸山一男, 張 尔泉, 丸山淳子, NO 吸入療法とは?
呼吸管理 Q&A - 研修医からの質問 316
総合医学社 東京, p208-215, 2014 査読なし
12. Iwashita Y, Maruyama K(12/13). Food poisoning associated with *Kudoa septempunctata*. *J Emerg Med*. **44(5):943-945**. (2/13)(2013) 査読あり
13. Ishiguro S, Maruyama K(9/9). Day zero ambulation under modified femoral nerve block after minimally invasive surgery for total knee arthroplasty: preliminary report. *J Anesth*. **27(1):132-134**. (2013) 査読あり
14. Ishiguro S, Maruyama K(8/8). Technical communication: anatomy and clinical implications of ultrasound-guided selective femoral nerve block. *Anesth Analg*. 2012 115:1467-1470. (2012) 査読有り
15. Habe K, Maruyama K(7/10). Plasma ADAMTS13, von Willebrand factor (VWF) and VWF propeptide profiles in patients with DIC and related diseases. *Thromb Res*. **129(5):598-602**. (2012) 査読あり
16. Maruyama K(1/3). Integrins and Nitric Oxide in the Regulation of Glial Cells: Potential Roles in Pathological Pain. *J Anesth Clin Res* [Reshttp://dx.doi.org/10.4172/2155-6148.1000292](http://dx.doi.org/10.4172/2155-6148.1000292) (2012) 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 張尔泉、丸山淳子(3/6)、丸山一男(6/6). モノクロタリン (MCT) 誘発性肺高血圧発症に対するトロンボモジュリン (TM) の抑制効果の検討. 麻酔 Vol.63 P.63. (抄録)(5月17日、2014) 第61回日本麻酔科学会(パシフィコ横浜、横浜国際会議場 横浜)
2. 張尔泉、丸山淳子(5/6)、丸山一男(6/6). 慢性低酸素暴露肺高血圧に対する H2S による血管病変の抑制効果. 麻酔 Vol.62 P.75. (抄録)(5月23日2013) 第60回日本麻酔科学会(ロイトン札幌、札幌)
3. Otsuki S, Sawada H(2/12), Zhang E(7/12), Maruyama K(10/12), Mitani Y(12/12). Phenotype modulation of smooth muscle cells and related inflammation in the development of experimental obstructive pulmonary vasculopathy in rats. *Circulation* 128:A14611 American Heart Association (Nov.16-20,2013) (Dallas, USA)
4. 山田康晴、丸山淳子(2/14)、張尔泉(3/14)、丸山一男(14/14). 従圧式人工呼吸における VILI ラットモデルの作成. 抄録集 P.181. (抄録) 第35回日本呼吸療法医学会学術総会(7月21日,2013)(京王プラザ 東京)
5. 張尔泉、丸山淳子(3/6)、丸山一男(6/6). モノクロタリン誘起肺高血圧症における eNOS 発現とシロスタゾールによる発症抑制作用. 麻酔 Vol.61 P.63. (抄録)(6月7日、2012) 第59回日本麻酔科学会 優秀演題(神戸国際会議場 神戸)

〔図書〕(計 11 件)

1. 丸山一男 痛みの考えかた p1-352, 南江堂、2014
2. 丸山一男、全身麻酔患者の術後管理 天羽敬祐監修 麻酔科学レビュー p220-225、総合医学社 2014
3. 丸山一男 周術期輸液の考えかた(11刷) P1-191, 南江堂 2014
4. 丸山一男、張尔泉、岩下義明、循環器系合併症、澄川耕二編 高齢者の周術期管理、p309-322、克誠堂 2014
5. 丸山一男、片肺換気、永井良三 総監修 麻酔科 研修のノート p400-403、診断と治療社 2014
6. 丸山一男、全身麻酔患者の術後管理 天羽敬祐監修 麻酔科学レビュー p220-225、総合医学社 2013
7. Maruyama J, Zhang E(3/5), Sawada H(4/5), Maruyama K(5/5). Nitric oxide in the

- pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension. **Pulmonary Hypertension. ISBN 980-953-307-704-3**
InTech <http://dx.doi.org/10.5772/55680> (2013)
8. 丸山一男、人工呼吸の考えかた(第7刷) p1-271、南江堂、2012
 9. 丸山一男、張尔泉、横地歩. 呼吸の生理. クリテイカルケアにおける呼吸管理. 編集: 氏家良人. 克誠堂出版. P.3-12, (2013)
 10. 丸山一男、横地歩. 肺高血圧症、澄川耕二編、麻酔前の評価・準備と予後予測 p28-31、克誠堂 2012 病態に応じた術期管理のために
 11. 丸山一男、全身麻酔患者の術後管理 天羽敬祐監修 麻酔科学レビュー p220-225、総合医学社 2012

〔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

丸山一男 (Maruyama Kazuo)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20181828

(2) 研究分担者

澤田博文 (Sawada Hirofumi)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30362354

張尔泉 (Zhang Erquan)
三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30456727

丸山淳子 (Maruyama Junko)
鈴鹿医療科学大学・医用工学部・教授
研究者番号: 50263017

三谷義英 (Mitani Yoshihide)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 60273380

横地歩 (Yokichi Ayumu)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 60359768

(3) 連携研究者

なし