

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09532

研究課題名(和文) 第3群肺高血圧症動物モデルの作製と薬剤による肺高血圧症抑制効果の検討

研究課題名(英文) Establishment of a novel model of group 3 pulmonary hypertension induced by SU5416/hypoxia in rats

研究代表者

花岡 正幸 (HANAOKA, Masayuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20334899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor: VEGF) 受容体阻害薬であるSU5416の投与、および慢性低酸素曝露により肺気腫と肺高血圧所見を呈するラットモデルを作製することを目的とした。オスSDラットにSU5416を皮下注射し(day1, 8, 15)、6週間低酸素環境下で飼育後に解剖、肺動脈圧測定を行った。SU5416/低酸素曝露群は対照群と比較して平均肺動脈圧は高値、肺気腫の程度を表すmean linear intercept (MLI)も高値で、その病理像はヒトにおける肺気腫に伴う肺高血圧症、すなわち第3群肺高血圧症に類似すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺疾患に伴う肺高血圧症(第3群肺高血圧症)は患者数が多く、予後不良であるが、酸素療法以外に有効性が証明された治療はない。第3群肺高血圧症の動物モデルは現在まで報告がなく、肺気腫合併肺高血圧症モデルが完成すれば、病態の解明や治療戦略の構築に寄与する。本研究により、既に第1群肺高血圧症(肺動脈性肺高血圧症)に使用されている選択的肺血管拡張薬の有効性が証明され、さらに肺血管選択性の高い薬剤送達システムについて新たな知見が得ることができれば、難治性の第3群肺高血圧症の診療に道が開け、臨床応用への期待が高まる。

研究成果の概要(英文)：The rats treated with vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor blocker, SU5416, developed emphysema. Moreover, the SU5416/hypoxia/normoxia-exposed rats developed severe pulmonary hypertension (PH) of group 1 with progressive proliferation of pulmonary arterial endothelial cells. The aim of this study attempts to establish a rat model of PH in association with emphysema. Male Sprague-Dawley rats were injected subcutaneously with SU5416 on day 1, 8 and 15, and exposed to normobaric hypoxia for 6 weeks. The results showed that the airspaces (mean linear intercept) were significantly enlarged, suggesting development of emphysema. Furthermore, the SU5416/hypoxia rats showed significantly increased mean pulmonary arterial pressure. The present study suggested that the exposure of the rats treated with VEGF receptor inhibitor to hypoxia induced PH that was highly associated with emphysema. This novel animal model is mimic of the pathophysiological changes of group 3 PH in humans.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：第3群肺高血圧症 肺気腫 VEGF受容体阻害薬 低酸素 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症 (pulmonary hypertension : PH) は様々な原因により持続的な肺動脈圧の上昇を認める疾患の総称であり、右心不全から死亡へと至る予後不良の疾患である。慢性肺疾患に伴う PH は 2018 年第 6 回肺高血圧症ワールドシンポジウムで提案された肺高血圧症臨床分類 (ニース分類) の第 3 群に相当し、左心疾患に伴う第 2 群に次いで症例数が多いとされる。多くの第 3 群 PH では肺動脈圧上昇の程度は強くないが、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease : COPD) や気腫合併肺線維症 (combined pulmonary fibrosis and emphysema : CPFE) の一部において高度の肺高血圧症症例が存在し、予後の悪化に関与する。PH はさまざまな病態に関連して発症することが知られており、肺疾患に伴う肺高血圧症のメカニズムとして想定される成因には、低酸素に関連した機序 (血管収縮、肺血管リモデリング、炎症、成長因子の活性化) と、低酸素非依存性の機序 (喫煙による内皮細胞の機能低下、肺血管床の減少) が関与していると考えられているが、決定的なものはない。我々は、米国コロラド大学医学部と共同でタバコ抽出液 (cigarette smoke extract : CSE) によるラット肺気腫モデルを確立した。このラット肺気腫モデルにおいて複数の薬剤の肺気腫抑制効果を検討し、海外の医学雑誌に発表した。一方、肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension : PAH) は、肺動脈の増殖性変化に伴う血管内腔の狭窄、閉塞により持続的な肺動脈圧上昇をきたす疾患群である。PAH の病因を解明するため様々な動物実験が行われてきたが、本症に認められる進行した病理像 (求心性内膜過形成、叢状病変) を再現することはできなかった。昨今、VEGF 受容体阻害薬である SU5416 を皮下注し、低酸素下で 3 週間、常酸素下で 10 週間飼育することで、PAH の病理像を再現したラット肺高血圧症モデルが作製可能であると報告されている。このラットモデルにおいて、一酸化窒素 (nitric oxide : NO) 系やエンドセリン系に作用する薬剤など、幾つかの薬剤の肺血管拡張効果が示されている。また、薬剤と同時に組織貫通型のホーミングペプチド (CARSKNKDC : CAR) を投与することで肺血管拡張効果が増強するという、薬剤送達システム (drug delivery system : DDS) の研究も報告されている。すなわち、CAR を用いることで肺血管特異的に薬剤を効率良く送達できる可能性があり、肺高血圧症における治療効果の向上が期待される。SU5416 皮下注と低酸素曝露などの肺高血圧症モデルを用いることにより、様々な薬剤の肺血管拡張効果の検証とその機序の検討、DDS の研究が可能となったが、肺気腫など肺疾患に伴う肺高血圧症の動物モデルは確立していない。

2. 研究の目的

VEGF 受容体阻害薬 (SU5416) / 低酸素曝露ラットモデルにおいて、以下を明らかにする。

- 1) SU5416 / 低酸素曝露による肺気腫合併肺高血圧症ラットモデルの確立
- 2) 本ラットモデルにおける肺動脈性肺高血圧治療薬投与による肺動脈圧低下効果の検討
- 3) ホーミングペプチド (CARSKNKDC : CAR) を用いた肺血管拡張作用増強効果の検討

3. 研究の方法

- 1) 4 週齢のオス SD ラットに SU5416 を皮下注、低酸素曝露飼育し肺気腫、肺高血圧の発症を確認する。
- 2) このラット肺気腫合併肺高血圧症モデルに、ホスホジエステラーゼ 5 (phosphodiesterase 5 : PDE-5) 阻害薬、および可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase : sGC) 刺激薬を投与し、その肺血管拡張効果を評価する。
- 3) PDE-5 阻害薬あるいは sGC 刺激薬と CAR を同時投与し、血管拡張効果をはじめ薬理作用の変化を検討する。
- 4) 肺気腫合併肺高血圧症ラットモデルを用いて炎症や酸化ストレス、アポトーシスの評価、VEGF-NO/NOS システムとの関連を検討し、薬剤の作用機序の解明を試みる。同時に肺気腫抑制効果に関しても検討を加える。

4. 研究成果

オス Sprague-Dawley ラット (生後 4 週齢) を対照群、低酸素曝露群 (Hx)、SU5416 投与低酸素曝露群 (SUHx) の 3 群に分けた。SU5416 を皮下注し (20mg/kg, day1, 8, 15)、低酸素下に飼育した (15%、6 週間)。初回の SU5416 皮下注から 6 週後に肺血行動態測定を行った。SUHx ラットは対照群、Hx 群と比較して有意な平均肺動脈圧の上昇を認めた。肺動脈病変は主に中膜平滑筋層の肥厚が観察され、肺動脈性肺高血圧症 (第 1 群) の病理所見に特徴的である叢状病変は認めず、ヒト第 3 群肺高血圧症の病理所見に類似していると考えられた。また、SUHx ラット肺は肺気腫の各指標 (mean linear intercept : MLI, destructive index : DI) が有意に高値であった。アポトーシスの指標としてカスパーゼ 3 免疫染色を行い、その陽性細胞を計測し、apoptotic index (AI) として算出した。AI は SUHx 群において有意に高く、肺気腫形成にカスパーゼ 3 が関与することが示唆された。肺ホモジネートから mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を実施した。SUHx ラット肺では肺高血圧症の進行に関与する interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 等の炎症性サイトカインの発現が亢進していた。また、ELISA 法によりラット肺における VEGF を定量すると、SUHx ラット肺において有意な低下がみられた。以上の検討から、ヒト第 3 群肺高血圧症の病理所見に近い、肺気腫合併肺高血圧症動物モデルが確立できた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Nishie K, Yamamoto S, Yamaga T, Horigome N, Hanaoka M. Peripherally acting μ -opioid antagonist for the treatment of opioid-induced constipation: Systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019; 34: 818-829. doi: 10.1111/jgh.14586. 査読有

Ikuyama Y, Ushiki A, Akahane J, Kosaka M, Kitaguchi Y, Urushihata K, Yasuo M, Yamamoto H, Hanaoka M. Comparison of clinical characteristics of patients with *Mycobacterium avium* complex disease by gender. *Epidemiol Infect*. 2019; 147: e108. doi: 10.1017/S0950268819000293. 査読有

Yamamoto H, Yasuo M, Komatsu M, Ushiki A, Hamano H, Hori A, Nakajima T, Uehara T, Fujinaga Y, Matsui S, Hanaoka M. Comparison of the chemokine profiles in the bronchoalveolar lavage fluid between IgG4-related respiratory disease and sarcoidosis: CC-chemokine ligand 1 might be involved in the pathogenesis of sarcoidosis. *Cytokine*. 2019; 120: 125-129. doi: 10.1016/j.cyto.2019.04.017. 査読有

Yasuo M, Kitaguchi Y, Kinota F, Kosaka M, Urushihata K, Ushiki A, Yamamoto H, Kawakami S, Hanaoka M. Usefulness of the forced oscillation technique in assessing the therapeutic result of tracheobronchial central airway obstruction. *Respir Investig*. 2018; 56: 222-229. doi: 10.1016/j.resinv.2018.01.005. 査読有

Wada Y, Kitaguchi Y, Yasuo M, Ueno F, Kawakami S, Fukushima K, Fujimoto K, Hanaoka M. Diversity of respiratory impedance based on quantitative computed tomography in patients with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018; 13: 1841-1849. doi: 10.2147/COPD.S163129. 査読有

Kato A, Yasuo M, Tokoro Y, Kobayashi N, Ichiyama T, Tateishi K, Ushiki A, Urushihata K, Yamamoto H, Hanaoka M. Virtual bronchoscopic navigation as an aid to CT-guided transbronchial biopsy improves the diagnostic yield for small peripheral pulmonary lesions. *Respirology*. 2018; 23: 1049-1054. doi: 10.1111/resp.13377. 査読有

Kinota F, Droma Y, Kobayashi N, Horiuchi T, Kitaguchi Y, Yasuo M, Ota M, Hanaoka M. The contribution of genetic variants of the peroxisome proliferator-activated receptor- α gene to high-altitude hypoxia adaptation in Sherpa highlanders. *High Alt Med Biol*. 2018. doi: 10.1089/ham.2018.0052. 査読有

Yasuo M, Kitaguchi Y, Komatsu Y, Hama M, Koizumi T, Agatsuma T, Ichiyama T, Kato A, Moteki H, Hanaoka M. Self-assessment of allergic rhinitis and asthma (SACRA) questionnaire-based allergic rhinitis treatment improves asthma control in asthmatic patients with allergic rhinitis. *Intern Med*. 2017; 56: 31-39. doi: 10.2169/internalmedicine.56.7251. 査読有

Ushiki A, Nozawa S, Yasuo M, Urushihata K, Yamamoto H, Hanaoka M, Fujimoto K. Associations between the distance covered in the incremental shuttle walk test and lung function and health status in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Investig*. 2017; 55: 33-38. doi: 10.1016/j.resinv.2016.08.004. 査読有

Ozawa Y, Yamamoto H, Yasuo M, Takahashi H, Tateishi K, Ushiki A, Kawakami S, Fujinaga Y, Asaka S, Sano K, Takayama H, Imamura H, Hanaoka M. Two patients with TAFRO syndrome exhibiting strikingly similar anterior mediastinal lesions with predominantly fat attenuation on chest computed tomography. *Respir Investig*. 2017; 55: 176-180. doi: 10.1016/j.resinv.2016.10.003. 査読有

Ueno F, Kitaguchi Y, Shiina T, Asaka S, Miura K, Yasuo M, Wada Y, Yoshizawa A, Hanaoka M. The preoperative composite physiologic index may predict mortality in lung cancer patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Respiration*. 2017; 94: 198-206. doi: 10.1159/000477587. 査読有

Ikegawa K, Ota M, Kobayashi N, Droma Y, Yaegashi H, Nishizawa M, Yasuo M, Urushihata K, Yamamoto H, Hanaoka M. Lack of association of serotonin 2A receptor gene in Japanese patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Shinshu Med J*. 2017; 65: 153-162. 査読有

Cole A-M, Cox S, Jeong C, Petousi N, Aryal D-R, Droma Y, Hanaoka M, Ota M, Kobayashi N, Gasparini P, Montgomery H, Robbins P, Rienzo A-D, Cavalleri G-L. Genetic structure in the Sherpa and neighboring Nepalese populations. *BMC Genomics*. 2017; 18: 102. doi: 10.1186/s12864-016-3469-5. 査読有

Droma Y, Kato A, Ichiyama T, Kobayashi N, Honda T, Uehara T, Hanaoka M. Electron microscopy observation of human pulmonary ultrastructure in two patients with high-altitude pulmonary edema. *High Alt Med Biol*. 2017; 18: 288-291. doi: 10.1089/ham.2016.0163. 査読有

Kosaka M, Ushiki A, Ikuyama Y, Hirai K, Matsuo A, Hachiya T, Hanaoka M. A four-center retrospective study of the efficacy and toxicity of low-dose trimethoprim-sulfamethoxazole for the treatment of Pneumocystis pneumonia in patients without HIV infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61. pii: e01173-17. doi: 10.1128/AAC.01173-17. 査読有

〔その他〕

著書(計 2 件)

花岡正幸. 呼吸器系疾患の診断・治療・ケア「60. 重症肺炎の治療指針」. 岡本和文 総著. 救急・集中治療最新ガイドライン 2018-19. 総合医学社、2018、pp 215-217.

花岡正幸. 特殊な肺高血圧症の診療指針と実践「3. 気腫合併肺線維症に合併する肺高血圧症」. 伊藤 浩, 松原広己 編. 新肺高血圧症診療マニュアル 根治を目指す最新の診療指針. 南江堂、2017、pp 256-259.

ガイドライン(計 3 件)

花岡正幸 他, 日本呼吸器学会 薬剤性肺障害の診断・治療の手引き第 2 版作成委員会 編. 薬剤性肺障害の診断・治療の手引き 2018. メディカルレビュー社、2018.

花岡正幸 他, 日本肺高血圧・肺循環学会, 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業「呼吸不全に関する調査研究」班. 肺疾患に伴う肺高血圧症診療ガイドライン. レタープレス株式会社、2018.

花岡正幸 他, 日本登山医学会 高山病と関連疾患の診療ガイドライン作成委員会 編. 高山病と関連疾患の診療ガイドライン. 中外医学社、2017.

〔学会発表〕(計 9 件)

花岡正幸. Year Review in Assembly. 肺循環・肺損傷学術部会. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会、2019 年.

安尾将法、和田洋典、北口良晃、花岡正幸. III 群肺高血圧は本当に III 群か?. III 群肺高血圧症モデルを使用した肺高血圧症の病態解明. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会、2019 年.

Hanaoka M. Diagnosis and registry for pulmonary hypertension. -Brief review of NICE PH conference -, 23rd Congress of Asian Pacific Society of Respiriology, 2018. (招聘講演)(国際学会)

Wada Y, Kitaguchi Y, Yasuo M, Hanaoka M. Establishment of a novel model of group 3 pulmonary hypertension induced by SU5416/hypoxia in rats. The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension, 2018. (国際学会)

Wada Y, Kitaguchi Y, Yasuo M, Hanaoka M. Antioxidant activity of a SU5416/hypoxia-induced emphysema and pulmonary hypertension model in rats. The ISMM World Congress on Mountain Medicine. 2018. (国際学会)

花岡正幸. Year Review in Assembly. 肺循環・肺損傷学術部会. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会、2018 年.

花岡正幸. 第 3 群肺高血圧症診断と治療戦略の方向性. ニース会議の結果からみた第 3 群肺高血圧症. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会、2018 年.

和田洋典、北口良晃、安尾将法、小林信光、立石一成、漆畑一寿、牛木淳人、山本 洋、花岡正幸. SU5416/低酸素曝露による第 3 群肺高血圧症ラットモデルの確立. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会、2018 年.

和田洋典、北口良晃、安尾将法、花岡正幸. SU5416 /慢性低酸素曝露 3 群肺高血圧ラットによる炎症性メディエーターの検討. 第 3 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会、2018 年.

〔図書〕(計 1 件)

Hanaoka M, Nakamura H, Aoshiba K, eds. Drug-Induced Lung Injury. 1st ed., Springer, 2018.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 安尾 将法

ローマ字氏名:(YASUO Masanori)

所属研究機関名: 信州大学

部局名: 学術研究院医学系(医学部附属病院)

職名: 講師

研究者番号(8桁): 20402117

研究分担者氏名：北口 良晃

ローマ字氏名：(KITAGUCHI Yoshiaki)

所属研究機関名：信州大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教（診療）

研究者番号（8桁）：40447751

(2)研究協力者

研究協力者氏名：和田 洋典

ローマ字氏名：(WADA Yosuke)

研究協力者氏名：雲登 卓瑪

ローマ字氏名：(YUNDEN Droma)