



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1469号
学位記番号	第1055号
氏名	篠原 務
授与年月日	平成 27年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats: Early intervention in overcoming the survivin-mediated resistance to apoptosis (マシテンタンはサバイビンを介した細胞死抵抗性を低下させてラットの早期肺血管閉塞病変をリバースさせる)</p> <p>American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology DOI: 10.1152/ajplung.00129.2014</p>
論文審査担当者	<p>主査： 新実, 彰男 副査： 大手 信之, 齋藤 伸治</p>

【目的】肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は肺細動脈を構成する細胞の増殖により閉塞性血管病変を伴い、肺血管抵抗の上昇に伴う肺高血圧 (PH) を来し、右心不全を引き起こし死に至る進行性の疾患である。現在、肺高血圧治療薬にはエンドセリン系、一酸化窒素系、プロスタサイクリン系が存在し、各系統のメタ解析において、肺血管抵抗や運動耐容能が改善することが示されている。また、治療前に進行した例では予後が悪いことも示されている。しかし、肺高血圧治療薬が肺血管閉塞病変を治療開始前よりも減少 (reverse) させているか否かと、その分子機序は不明であり、さらには病期の違いによる肺高血圧治療薬の作用機序の違いも解明されていない。そこで我々は新規非選択性エンドセリン受容体拮抗薬マシテンタンによる、ヒト PAH 類似ラットの早期ないし後期肺血管閉塞病変の抗リモデリング作用とその分子機序を検討した。

【方法】時間依存的に進行する肺血管閉塞病変を伴う PAH モデルを作成するために、7 週雄 Sprague-Dawley ラットに血管内皮成長因子阻害剤 (Sugen5416、20mg/kg) を単回皮下注射した後、3 週間低酸素チャンバー内 (0.5 気圧、10%酸素) で飼育し、以後は大気中で管理した。早期治療研究としてマシテンタン (30mg/kg/日) を SU5416 投与後 3~5 週の間、後期治療研究は 5~8 週の間、1 日 1 回連日胃管投与した。マシテンタン投与の翌日に心臓超音波検査、心臓カテーテル検査、左右心重量比、肺血管閉塞病変の定量的評価、肺組織における遺伝子発現を検討した。研究対象は、肺血管病変の reverse を示すための治療開始直前の治療前 PH 群を含め、マシテンタン治療 PH 群、溶媒投与 PH 群、正常対照群の 4 群で行った。早期治療研究は n=40、後期治療研究は n=38 とした。全てのラットは期間中、週に 1 回体重を測定した。さらにマシテンタンの作用機序を調べるため、新たに用意したマシテンタン治療 PH 群 (n=10)、溶媒投与 PH 群 (n=10) において治療薬投与 3 日間での肺組織における遺伝子、蛋白発現 (real time RT-PCR、Western blot、免疫染色、共焦点顕微鏡) を各研究において検討した。統計解析は、ANOVA+Tukey 多重比較ないし unpaired two-tailed Student's *t* 検定を行い、 $p<.05$ を有意差ありとした。

【結果】準備した全ラットは研究期間内を通して生存していた。治療期間内での体重は、マシテンタン治療 PH 群において、早期・後期治療研究ともに溶媒投与 PH 群、正常対照群に比べ有意に増加した。また本モデルの肺組織において、溶媒投与 PH 群のエンドセリン-1 前駆体 (PreProEndothelin-1) の mRNA が正常対照群に比べ有意に増加し、マシテンタン治療 PH 群はさらに溶媒投与 PH 群よりも有意に増加していることを確認した。肺血管閉塞病変の有無については、各ラットの肺組織 1 切片内に存在する、血管径 15-50 μ m の全て (200 個以上/1 切片) に対し評価した。早期治療研究においてマシテンタン治療 PH 群は、治療前 PH 群、溶媒投与 PH 群に比べて肺血管閉塞病変の割合を有意に減少 (reverse) させた (治療前 PH 群 33.8 \pm 4.4%、溶媒投与 PH 群 41.5 \pm 4.1%、マシテンタン治療 PH 群 17.9 \pm 2.8%)。その結果は、肺動脈圧の指標となる右室収縮期圧(正常対照群 19.4 \pm 1.4 mmHg、治療前 PH 群 78.3 \pm 4.9 mmHg、溶媒投与 PH 群 79.5 \pm 6.4mmHg、マシテンタン治療 PH 群 50.3 \pm 5.0mmHg)、右室肥大の程度、血管径 50-200 μ m における中膜肥厚を reverse させたことと合致した。一方、後期治療研究においてマシテンタン治療は肺血管閉塞病変の割合 (30.1 \pm 5.1%) を溶媒投与 PH 群 (50.0 \pm 4.3%) に比べて有意に減少させたが、治療前 PH 群 (40.8 \pm 4.3%、 $p=0.27$)

に比べて有意な減少 (reverse) は示さなかった。次に本モデルの肺血管閉塞病変は、内腔と接する1層の細胞が von Willebrand factor (VWF) で染色され、その外側を α -smooth muscle actin (α SMA) 陽性細胞が幾層かを取り囲むように構成していることを共焦点顕微鏡で確認した。分子機序の検討においてマシテンタン治療は、その α SMA 細胞で細胞増殖マーカーKi67が発現する閉塞血管の割合を早期・後期治療研究ともに溶媒投与 PH 群より有意に低下させる一方で、細胞死マーカーcleaved caspase3が発現する割合は、早期治療研究において溶媒投与 PH 群よりも有意に増加させたが、後期治療研究では有意差を認めなかった。さらに早期治療研究においてのみ、マシテンタン治療は抗細胞死因子 survivin の肺組織での遺伝子・蛋白発現を有意に低下させ、 α SMA 細胞で survivin が発現する閉塞血管の割合を有意に低下させた。それに対して、閉塞病変の内腔1層を占める細胞での Ki67 発現血管の割合は、マシテンタン治療により早期・後期治療研究ともに有意に低下させたが、cleaved caspase3 や survivin の発現血管の割合に有意な差は認めなかった。

【結語】 マシテンタンは早期治療研究において閉塞性肺血管病変を reverse し、その病変を構成する細胞のうち α SMA 陽性細胞において、細胞増殖と survivin を介する細胞死抵抗性を抑制した。本研究により、早期治療の有効性を示す機序に加え、治療抵抗性に対するメカニズムの一つが新たに示された。今後は、進行例に認める治療抵抗性を如何に克服するかが研究課題である。

論文審査の結果の要旨

【目的】肺動脈性肺高血圧症（PAH）は肺細動脈を構成する細胞の増殖により閉塞性血管病変を伴い、肺血管抵抗の上昇に伴う肺高血圧（PH）を来とし、右心不全を引き起こし死に至る進行性の疾患である。現在、肺高血圧治療薬にはエンドセリン系、一酸化窒素系、プロスタサイクリン系が存在し、各系統のメタ解析において、肺血管抵抗や運動耐容能が改善することが示されている。また、治療前に進行した例では予後が悪いことも示されている。しかし、肺高血圧治療薬が肺血管閉塞病変を治療開始前よりも減少（reverse）させているか否かと、その分子機序は不明であり、さらには病期の違いによる肺高血圧治療薬の作用機序の違いも解明されていない。そこで我々は新規非選択性エンドセリン受容体拮抗薬マシテンタンによる、ヒト PAH 類似ラットの早期ないし後期肺血管閉塞病変の抗リモデリング作用とその分子機序を検討した。

【方法】時間依存的に進行する肺血管閉塞病変を伴う PAH モデルを作成するために、7 週雄 Sprague-Dawley ラットに血管内皮成長因子阻害剤（Sugen5416、20mg/kg）を単回皮下注射した後、3 週間低酸素チャンパー内（0.5 気圧、10%酸素）で飼育し、以後は大気中で管理した。早期治療研究としてマシテンタン（30mg/kg/日）を SU5416 投与後 3～5 週の間、後期治療研究は 5～8 週の間、1 日 1 回連日胃管投与した。マシテンタン投与の翌日に心臓超音波検査、心臓カテーテル検査、左右心重量比、肺血管閉塞病変の定量的評価、肺組織における遺伝子発現を検討した。研究対象は、肺血管病変の reverse を示すための治療開始直前の治療前 PH 群を含め、マシテンタン治療 PH 群、溶媒投与 PH 群、正常対照群の 4 群で行った。早期治療研究は n=40、後期治療研究は n=38 とした。さらにマシテンタンの作用機序を調べるため、新たに用意したマシテンタン治療 PH 群（n=10）、溶媒投与 PH 群（n=10）において治療薬投与 3 日間での肺組織における遺伝子、蛋白発現（real time RT-PCR、Western blot、免疫染色、共焦点顕微鏡）を各研究において検討した。統計解析は、ANOVA+Tukey 多重比較ないし unpaired two-tailed Student's *t* 検定を行い、 $p < .05$ を有意差ありとした。

【結果】治療期間内での体重は、マシテンタン治療 PH 群において、早期・後期治療研究ともに溶媒投与 PH 群、正常対照群に比べ有意に増加した。肺組織において、溶媒投与 PH 群のエンドセリン-1 前駆体（PreProEndothelin-1）の mRNA が正常対照群に比べ有意に増加し、マシテンタン治療 PH 群はさらに溶媒投与 PH 群よりも有意に増加していることを確認した。肺血管閉塞病変については、各ラットの肺組織 1 切片内に存在する、血管径 15–50 μm の全て（200 個以上/1 切片）に対し評価した。早期治療研究においてマシテンタン治療 PH 群は、治療前 PH 群、溶媒投与 PH 群に比べて肺血管閉塞病変の割合を有意に減少（reverse）させた。その結果は、肺動脈圧の指標となる右室収縮期圧、右室肥大の程度、血管径 50–200 μm における中膜肥厚を reverse させたことと合致した。一方、後期治療研究においてマシテンタン治療は肺血管閉塞病変の割合を溶媒投与 PH 群に比べて有意に減少させたが、治療前 PH 群に比べて有意な減少（reverse）は示さなかった。次に本モデルの肺血管閉塞病変は、内腔と接する 1 層の細胞が von Willebrand factor で染色され、その外側を α -smooth muscle actin（ α SMA）陽性細胞が幾層かを取り囲むように構成していることを共焦点顕微鏡で確認した。分子機序の検討においてマシテンタン治療は、その α SMA 細胞で細胞増殖マーカー Ki67 が発現する閉塞血管の割合を早期・後期治療研究ともに溶媒投与 PH 群より有意に低下させる一方で、細胞死マーカー cleaved caspase3 が発現する割合は、早期治療研究において溶媒投与 PH 群よりも有意に増加させたが、後期治療研究では有意差を認めなかった。さらに早期治療研究においてのみ、マシテンタン治療は抗細胞死因子 survivin の肺組織での遺伝子・蛋白発現を有意に低下させ、 α SMA 細胞で survivin が発現する閉塞血管の割合を有意に低下させた。

【結語】マシテンタンは早期治療研究において閉塞性肺血管病変を reverse し、その病変を構成する細胞のうち α SMA 陽性細胞において、細胞増殖と survivin を介する細胞死抵抗性を抑制した。本研究により、早期治療の有効性を示す機序に加え、治療抵抗性に対するメカニズムの一つが新たに示された。今後は、進行例に認める治療抵抗性を如何に克服するかが研究課題である。

審査委員会では主査（新実彰男教授）から、本研究に用いた肺高血圧モデルについて、先天性心疾患における肺高血圧との関連について、血管リモデリングについてなど 10 項目の質問、副査（大手信之教授）からは、従来モデルと本モデルの違いについて、PAH とエンドセリン系について、実験方法についての 11 項目の質問があった。指導教授である副査（齋藤伸治教授）からは、肺高血圧症における小児科領域の特徴について、その診断法と治療法についての 3 項目の質問を行った。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本研究領域について深く理解するとともに、専攻分野（小児医学）に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者には博士（医学）の学位を授与するに値すると判断した。