



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1922号
学位記番号	論第1678号
氏名	大下 裕法
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Perinatal hypoxia aggravates occlusive pulmonary vasculopathy in SU5416/hypoxia-treated rats later in life (周産期低酸素刺激による SuHx ラットの致死的な閉塞性肺血管病変)</p> <p>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2022 Aug 1;323(2):L178-L192.</p>
論文審査担当者	<p>主査： 新実 彰男 副査： 奥田 勝裕, 杉浦 真弓</p>

論文内容の要旨

【背景】肺動脈性肺高血圧症（PAH）は進行性かつ致死的な疾患である。PAHは肺小動脈の内膜過形成、中膜肥厚、叢状病変などの閉塞性肺血管疾患（PVD）、および肺動脈への炎症細胞の浸潤により特徴づけられる。最近、血管内皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤である SUGEN をラットに投与し慢性低酸素にさらすことによりヒトの PAH 様 PVD を再現した動物モデル、通称 SUGEN モデルが作製された。しかし SUGEN モデルは致死的ではなくまた閉塞性 PVD は進行せず一部の病変ではむしろ改善していたという点でヒトの PAH とは異なる点がある。そこで我々は SUGEN モデルにさらなる刺激を与えることで新たな致死性かつ進行性のモデルが作れるのではないかと考えた。ここで我々は「DOHAD 仮説」に注目した。この仮説は、ヒトの出生時体重と成人後の冠動脈疾患による死亡率の間に密接な関係があることに基づいて提唱されたものである。胎児発育不全は、胎盤循環障害やエピジェネティックな変化と関連することが報告されているが、ヒトや動物モデルにおいて胎児発育不全を引き起こすような周産期の侵襲が実際に PVD を増悪させるかどうかは不明であった。そこで我々は「周産期低酸素症が SUGEN ラットの閉塞性 PVD と生存予後を悪化させる」、「閉塞性 PVD の悪化は PVD の主要構成成分である肺動脈平滑筋細胞（PASMC）のエピジェネティックな変化が関係している可能性がある」という仮説を立てた。

【方法】周産期低酸素症は臨床の現場においては母体の低酸素症、喫煙、糖尿病、子癩前症など、新生児においては NICU での低酸素症などに関連するため、我々は周産期侵襲として低酸素症に着目した。妊娠ラットを妊娠後期から出生後まで低酸素にさらすことで周産期低酸素症ラットを作製した。周産期低酸素症の有無、SUGEN 処理の有無で計 4 群のラットを作製し、7 週齢で SUGEN を投与したのちに 15 週齢で評価した。追加実験として SUGEN 投与直前のタイミングである 7 週齢でも評価を行った。

【結果】周産期低酸素症は SUGEN モデルにおいて有意な早期死亡を誘発したが他の 3 群のラットは実験終了時まで死亡しなかった。周産期低酸素症は血行動態の評価において SUGEN ラットの右室収縮期圧、右室圧/体血圧比、右室肥大を悪化させた。また病理学的評価において周産期症は SUGEN ラットの内膜過形成、中膜肥厚、叢状病変などの閉塞性 PVD を悪化させ、肺動脈周囲へのマクロファージの浸潤を有意に増加させた。一方で周産期低酸素症は SUGEN ラットの肺胞構造および右室の繊維性変化には影響を与えず、死亡原因として気管病変や右室心筋症は否定的と考えられた。また SUGEN 投与直前のタイミングである 7 週齢の評価において、周産期低酸素症のみでは体重、血行動態、肺血管の病理学的評価に影響を与えなかった。これらの結果から周産期低酸素による SUGEN ラットの生存率および肺高血圧の悪化は SUGEN 投与前における生理的、組織学的な変化では説明できず、PVD 構成細胞のなんらかの機能的変化が関与している可能性が示唆された。ここで我々は PAH 患者において PVD の構成成分である PASMC の増殖能および炎症反応性が亢進しているという報告に注目した。SUGEN 投与前の 7 週齢ラットから採取、培養した PASMC を用いて増殖能と炎症反応性を検証した。各種解析により、周産期低酸素症は培養 PASMC の増殖能と炎症性サイトカイン分泌を亢進させることが示された。培養 PASMC において表現型変化が維持されている背景にはエピジェネティックなメカニズムが関与している可能性が考えられた。エピジェネティックな変化のメカニズムとして DNA メチル化、ヒストンアセチル化、microRNA の関与が知られているが、我々は肺血管疾患における主要なエピジェネティック変化である DNA メチル化に着目した。周産期低酸素症およびコントロールラットから採取培養した PASMC に対してメチル化 DNA 免疫沈降シーケンシングを行った結果、2 群間でメ

チル化に有意な差があった領域が複数同定された。これらの領域に関連する遺伝子についてエンリッチメント解析を行い、これらの遺伝子と有意に関連する機能を同定した。その結果 DNA のメチル化変化が起こっていた領域には Wnt シグナル、T 細胞の遊走、分子シャペロンなど細胞増殖や炎症反応性に関わる機能が関連していることが判明した。

【結語】我々の確立した新たな PAH モデルは致死的かつ進行性であり、SUGEN ラットの周産期低酸素曝露による閉塞性 PVD の悪化と早期死亡は培養 PASC 1 の表現型変化と関連していた。培養 PASC 1 の表現型変化はエピジェネティックな変化によって特徴づけられており、周産期低酸素症が PASC 1 のエピジェネティックな変化を介して SU ラットの閉塞性 PVD を悪化させる可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

【背景】肺動脈性肺高血圧症（PAH）は進行性かつ致死的な疾患である。PAH は肺小動脈の内膜過形成、中膜肥厚、叢状病変などの閉塞性肺血管疾患（PVD）、および肺動脈への炎症細胞の浸潤により特徴づけられる。最近、血管内皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤である SUGEN をラットに投与し慢性低酸素にさらすことによりヒトの PAH 様 PVD を再現した動物モデル、通称 SUGEN モデルが作製された。しかし SUGEN モデルは致死的ではなくまた閉塞性 PVD は進行せず一部の病変ではむしろ改善していたという点でヒトの PAH とは異なる点がある。そこで我々は SUGEN モデルにさらなる刺激を与えることで新たな致死性かつ進行性のモデルが作れるのではないかと考えた。ここで我々は「DOHAD 仮説」に注目した。この仮説は、ヒトの出生時体重と成人後の冠動脈疾患による死亡率の間に密接な関係があることに基づいて提唱されたものである。胎児発育不全は、胎盤循環障害やエピジェネティックな変化と関連することが報告されているが、ヒトや動物モデルにおいて胎児発育不全を引き起こすような周産期の侵襲が実際に PVD を増悪させるかどうかは不明であった。そこで我々は「周産期低酸素症が SUGEN ラットの閉塞性 PVD と生存予後を悪化させる」、「閉塞性 PVD の悪化には PVD の主要構成成分である肺動脈平滑筋細胞（PASMC）のエピジェネティックな変化が関与する可能性がある」という仮説を立てた。

【方法】周産期低酸素症は臨床の現場においては母体の低酸素症、喫煙、糖尿病、子癇前症など、新生児においては NICU での低酸素症などに関連するため、我々は周産期侵襲として低酸素症に着目した。妊娠ラットを妊娠後期から出生後まで低酸素にさらすことで周産期低酸素症ラットを作製した。周産期低酸素症の有無、SUGEN 処理の有無で計 4 群のラットを作製し、7 週齢で SUGEN を投与したのちに 15 週齢で評価した。追加実験として SUGEN 投与直前のタイミングである 7 週齢でも評価を行った。

【結果】周産期低酸素症は SUGEN モデルにおいて有意な早期死亡を誘発したが他の 3 群のラットは実験終了時まで死亡しなかった。周産期低酸素症は血行動態の評価において SUGEN ラットの右室収縮期圧、右室圧/体血圧比、右室肥大を悪化させた。また病理学的評価において周産期症は SUGEN ラットの内膜過形成、中膜肥厚、叢状病変などの閉塞性 PVD を悪化させ、肺動脈周囲へのマクロファージの浸潤を有意に増加させた。一方で周産期低酸素症は SUGEN ラットの肺泡構造と右室の線維性変化には影響を与えず、死亡原因として気管病変や右室心筋症は否定的と考えられた。また SUGEN 投与直前のタイミングである 7 週齢の評価で、周産期低酸素症のみでは体重、血行動態、肺血管の病理学的評価に影響を与えなかった。これらの結果から周産期低酸素による SUGEN ラットの生存率および肺高血圧の悪化は SUGEN 投与前における生理的、組織学的変化では説明できず、PVD 構成細胞の何らかの機能的変化が関与している可能性が示唆された。ここで我々は PAH 患者において PVD の構成成分である PASMC の増殖能および炎症反応性が亢進しているとの報告に注目し、SUGEN 投与前の 7 週齢ラットから採取、培養した PASMC を用いて増殖能と炎症反応性を検証した。各種解析により周産期低酸素症は培養 PASMC の増殖能と炎症性サイトカイン分泌を亢進させることが示された。培養 PASMC において表現型変化が維持されている背景にはエピジェネティックなメカニズムが関与している可能性が考えられた。エピジェネティックな変化のメカニズムとして DNA メチル化、ヒストンアセチル化、microRNA の関与が知られているが、我々は肺血管疾患における主要なエピジェネティック変化である DNA メチル化に着目した。周産期低酸素症およびコントロールラットから採取培養した PASMC に対してメチル化 DNA 免疫沈降シーケンシングを行った結果、2 群間でメチル化に有意な差があった領域が複数同定された。これらの領域に関連する遺伝子についてエンリッチメント解析を行い、これらの遺伝子と有意に関連する機能を同定した。その結果 DNA のメチル化変化が起こっていた領域には Wnt シグナル、T 細胞の遊走、分子シャペロンなど細胞増殖や炎症反応性に関わる機能が関連することが判明した。

【結語】我々の確立した新たな PAH モデルは致死性かつ進行性であり、SUGEN ラットの周産期低酸素曝露による閉塞性 PVD の悪化と早期死亡は培養 PASMC の表現型変化と関連した。培養 PASMC の表現型変化はエピジェネティックな変化により特徴づけられており、周産期低酸素症が PASMC のエピジェネティックな変化を介して SUGEN ラットの閉塞性 PVD を悪化させる可能性を示唆するものである。

【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査の新実教授から、疾患の疫学や病態・分類、生存率悪化の原因、低酸素条件の設定などを中心に 10 項目、第一副査の奥田教授から、周産期侵襲の設定、病理学的評価の方法、細胞培養の手技などを中心に 10 項目の質問がされた。杉浦教授からは Barker 仮説、低酸素による胎児侵襲のメカニズム、新生児期の肺高血圧などに関して 10 項目の質問がなされた。いずれの質問にも概ね満足いく回答が得られ、学位論文の主旨を十分に理解していると判断した。本研究は、肺動脈性肺高血圧の新たな動物モデルの作成ならびにエピジェネティックな変化についての解析を行い、臨床・研究の両面において意義のある結果が得られた研究である。以上をもって、本論文の著者には博士（医学）の称号と与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 新実 彰男 副査 奥田 勝裕、杉浦 真弓