

氏 名	禹 英 喜
(ふりがな)	(う えいき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成30年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Capillary Degeneration and Right Ventricular Remodeling Due to Hypoxic Stress with Sugen5416 (Sugen5416投与下での低酸素ストレスによる毛細 血管変性と右室リモデリング)
論文審査委員	(主) 教授 石 坂 信 和 教授 星 賀 正 明 教授 寺 崎 文 生

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背景および目的》

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病因は数多くあり、血管リモデリングや血管収縮に伴う肺血管抵抗の上昇により右室リモデリングや右心不全を発症する。しかしながら、血管微細構造やシグナル伝達が心筋リモデリングの進展過程でどのように変化するかなどメカニズムは不明な点が多い。近年、vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体拮抗薬である Sugen5416 の投与と低酸素負荷の組み合わせによる PAH ラットモデルが報告され、PAH 患者の肺病理組織像と類似する。これまでに、低酸素および虚血に伴う組織傷害に対し VEGF が保護的に作用することが報告されているが、心筋リモデリングの経過における VEGF の発現様式についての報告はない。本研究では、Sugen5416 投与後の低酸素

負荷ラットを用い、右室リモデリングの経時的変化について、生理学および組織学的検討を行った。

《方法》

雄性 Sprague-Dawley ラット（7 週齢）を用い、Sugen5416 あるいは注射溶解液（Carboxymethyl cellulose）のみを単回皮下注射後、低酸素環境（ $10\pm 1\% \text{O}_2$ ）下に 2 週間飼育した。その後、通常大気下にてさらに 10 週間飼育し、それぞれ SU-hypoxia 群、V-hypoxia 群とした。なお、Sugen5416 あるいは溶解液を皮下注射後に 12 週間大気下で飼育したものをそれぞれ SU-normoxia 群、V-normoxia 群とした。

心臓カテーテル検査により右室内圧および左室内圧を、心エコー検査により三尖弁輪移動速度（TAPSE）、右室面積変化率（RV FAC）、肺動脈収縮期流速加速時間（AcT）、右心室駆出時間（ET）などを計測した。ラットを屠殺して心臓、肺組織を採取し、得られた標本は光学顕微鏡（光顕）および電子顕微鏡（電顕）で観察するとともに、免疫組織化学的検索を行った。右室心筋から RNA を抽出し、VEGF、extracellular signal-regulated kinase1 (ERK1) の mRNA を測定し、GAPDH を内在性コントロールとした。Western blot 法により VEGF、ERK1/2、phospho-ERK1/2 (pERK1/2) のタンパク定量を行った。

測定結果は平均値と標準誤差で表記した。統計学的検討は一元配置分散分析と Turkey-Kramer 法により検定を行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

《結果》

観察開始後 14 日目に、V-hypoxia 群、SU-hypoxia 群ともに右室圧は上昇しており、SU-hypoxia 群では 84 日目においても右室圧の上昇がみられた。SU-hypoxia 群は、V-normoxia 群と比較し、14 日目、84 日目において RV FAC、TAPSE および AcT/ET 比の有意な低下を認めた。組織学的検査では、光顕的に、観察開始後 14 日目の V-hypoxia 群、SU-hypoxia 群において、右室心筋細胞の肥大と血管周囲に線維化を伴う小動脈壁の肥厚を認めた。特に、SU-hypoxia 群では筋原線維の走行の乱れが進行し、84 日目には、心

筋細胞の変性と間質への単核球浸潤が顕著となった。一方、電顕的に観察開始後 3 日目より SU-hypoxia 群において右室毛細血管の閉塞が認められ、内皮細胞の空胞変性や小血管平滑筋細胞の肥大が認められた。さらに SU-hypoxia 群は V-hypoxia 群と比較し、右室心筋における Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色陽性細胞数および 4-hydroxy-2-nonenal protein (4-HNE) 付加タンパクの発現量の有意な増加を 14 日目および 84 日目に認めた。右室心筋での VEGF mRNA の発現では、SU-hypoxia 群は観察開始後 3 日目に V-hypoxia 群と比較して有意な減少を認めた後、8 日目に有意な上昇が認められた。同様に、ERK1 mRNA の発現も SU-hypoxia 群で 8 日目に有意な上昇を認めた。

Western blot 法によるタンパク定量結果からも、SU-hypoxia 群における VEGF の発現は、観察開始後 3 日目では抑制されていたが 14 日目では上昇していた。pERK/ERK 比は、SU-hypoxia 群において V-hypoxia 群と比べ 8 日目、14 日目に有意に増加していた。

《考察》

本研究により、Sugen5416 の皮下注射とその後の 14 日間の低酸素暴露が、84 日目の心筋リモデリングの原因であることが示唆された。Sugen5416 の効果は、投与から少なくとも 3 日間は持続すると考えられた。観察開始後 8 日目および 14 日目に SU-hypoxia 群では V-hypoxia 群と比較し pERK1/2 の上昇が認められ、電顕所見でみられた心筋微小血管の形態学的変化や閉塞所見から判断すると、14 日目までの VEGF/ERK シグナルの活性化により内皮細胞機能が傷害され、右室心筋における血管リモデリングを誘導すると考えられた。さらに、84 日目における心筋リモデリングの進展に過度な酸化ストレスが関与していると推察された。

SU-hypoxia 群では、観察開始後 84 日目に左室拡大と両心室肥大を認めた。Sugen5416 は全身に投与されており、右室および左室心筋の微小血管を含めた全身の血管に作用した可能性が考えられた。両心室における病理学的組織病変の差は、両心室の収縮力、壁厚の違いに起因すると考えられる。毛細血管の変性と VEGF/ERK1 シグナル経路の活性化が、

Sugen5416 投与下での低酸素ストレスに伴う心筋リモデリングにおいて重要と考えられた。

《結論》

毛細血管の形態変化とそれに続く VEGF/ERK1 シグナル経路の活性化が、平滑筋細胞と心筋細胞の肥大を促進させ、Sugen5416 投与下での低酸素ストレスに伴う心筋リモデリングにおいて重要であると考えられた。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病因は数多くあるが、患者予後を左右する重要な因子は右室リモデリングの進展と右心不全発症の有無である。しかしながら PAH における右室リモデリングの発症・進展メカニズムには不明な点が多く、詳細な検討と新たな治療法が必要とされる。

申請者は、vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体拮抗薬 Sugen5416 と低酸素負荷を組み合わせた PAH ラットモデルを用い、右室リモデリングの経過を生理学的側面と組織学的側面から経時的に評価を行った。その結果、低酸素負荷早期における毛細血管病変と、低酸素負荷期間中の遅発性 VEGF および extracellular signal-regulated kinase シグナルの活性化に加え、再酸素化以降における酸化ストレスの増加が、右室リモデリングのみならず左室機能を障害することを明らかにした。これらの結果は未解決な点が多い PAH の臨床において貴重な知見を与えるものである。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Current Vascular Pharmacology 15 (6): 589-598, 2017