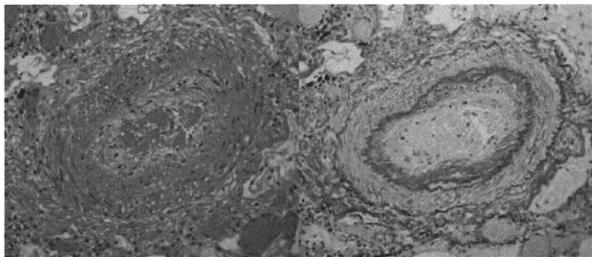


図3



300~500 μm の肺動脈の病理組織学的所見として、Heath-Edward grade 3が観察された (図4a,b)。

図4a,b



肺静脈は、肺静脈炎および静脈周囲炎、肺静脈閉塞も認められ (図5a,b,c)、さらに肺門リンパ節炎も観察された (図6a,b)。

図5a,b,c

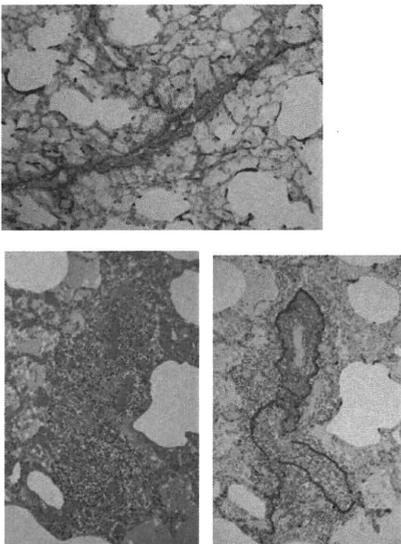
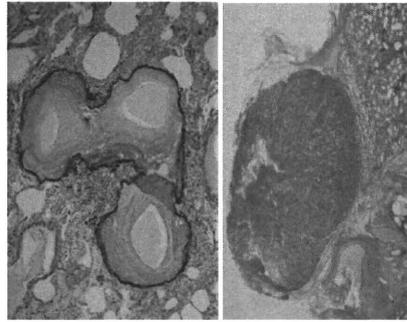


図6a,b



症例2: 50歳代女性、発症から死亡までの期間は約6年であった。

胸部レントゲンの変化を下図7に示す。

図7

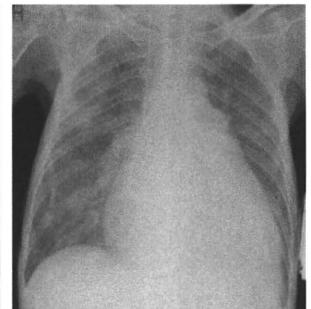
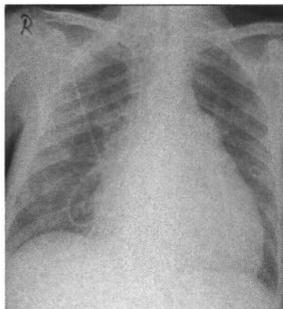
49歳

50歳



51歳

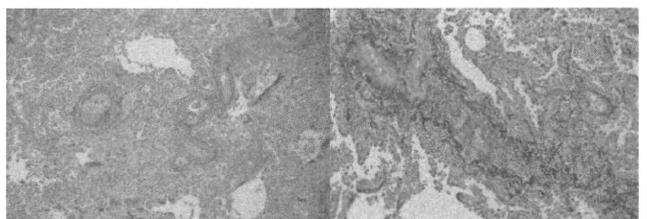
52歳



肺血流シンチグラムでは両肺野の多発陰影欠損を認めた。DLCOは26%であった。室内気での血液ガスはPH 7.51, PaO₂ 50.5 Torr, PaCO₂ 32.3 Torrであった。

病理組織学的所見として、肺静脈閉塞および外膜の線維性肥厚が観察された (図8a,b)。

図8a,b



上記報告の PVOD 症例においては、血管病変は肺血管系の post capillary レベルにある静脈の狭窄および閉塞所見が認められ、静脈炎 血管周囲炎を伴っているものもあり同部位にはリンパ球等の炎症細胞の発現が認められた。外膜は肥厚し癭痕化をきたしている。また肺門部リンパ節腫脹がみられ炎症細胞の浸潤が観察された。

2. 1) PVOD 9 例の検査結果の検討

9 例すべて剖検での診断であった。発症年齢の平均は 39±18 歳、男性 6 例 女性 3 例、smoker 3 ex-smoker 2 non-smoker 3 不明 1、動脈血液ガス所見 (PH 7.47±0.03, PaO₂ 59.1±7.5 Torr, PaCO₂ 30.8±3.3 Torr)、呼吸機能検査 (%VC 98.8±24.8, FEV_{1.0%} 84.6±10.8, %DLCO 35.9±21.3)、心臓カテーテル検査 (PCWP 5.3±3.4 mmHg, mPAP 54.9±16.2 mmHg, RAP 7.6±5.4 mmHg, AOP 61.7±10.6 mmHg, CO 3.39±1.46, CI 2.06±0.87, SVO₂ 54±16, SaO₂ 88±6.6 Torr) であった。HRCT 施行例 (5 例) のうち Interlobular septal thickening 所見は 2 例に、Centrilobular ground-glass opacities 所見は 3 例に認められ、治療による肺うっ血出現は 7 例が悪化し 1 例は未治療、1 例不明であるという報告を得た。

2) IPAH との比較

病理組織にて確定診断し得た IPAH 25 例と上記 PVOD 症例 9 例の 2 群を比較検討した。

発症時年齢は有意差をもって PVOD 群が高く (PVOD vs. IPAH: 39±18 歳 vs. 23±13 歳 p<0.05) 動脈血液ガス検査所見で低酸素が強く、PaO₂ は PVOD vs. IPAH: 59.1±7.5 mmHg vs. 82.3±21.2 mmHg p<0.05、呼吸機能検査においては %VC と FEV_{1.0%} に有意差はないものの %DLCO が有意に低かった (PVOD vs. IPAH: 35.9±21.3 vs. 73.6±18.8 p<0.01)。また心臓カテーテル検査所見での両群の肺高血圧の程度や CO に有意差はなかった。(PVOD vs. IPAH: mPAP (mmHg) 54.9±16.2 vs. 60.3±18.8 p=0.45, RAP (mmHg) 7.6±5.4 vs. 6.4±4.6 p=0.57, CO 3.39±1.46 vs. 3.39±1.46 p=0.59)

D.E 考察 および 結論

病理所見以外の PVOD の特徴と考えられる検査所見としては、今回の中間報告より IPAH と比較して発症年齢が比較的高く低酸素血症や肺拡散能の低下が強いとの結果を得た。各種画像検査 (HRCT や肺血流シンチグラフィ) でこれまで報告のある所見もあわせ PVOD 診断ガイドラインの作成に向けさらなる症例の検討を行ってきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakuma M, Nakanishi N, Shirato K. Mortality from Pulmonary Heart Disease in Japan. 1979-2006. *Ann Vasc Dis.* 2010; 3(3):e1-e6.
- 2) 船迫宴福、佐久間聖仁、宮地克維、山田修、京谷晋吾、中西宣文. 肺動脈性肺高血圧症と甲状腺機能異常. *Therapeutic Research.* 2010; 31(10):1413-1414.

2. 学会発表

- 1) Takagi Y, et al., "Genetic Differences in Hereditary Hemorrhagic Teleangiectasia with or without Pulmonary Hypertension: From Literatures and Our Own Experiences", The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2011, Yokohama.
- 2) 進藤一紘、高木弥栄美、宮地克維、佐久間聖仁、中西宣文. 肺塞栓症を合併した、成人での末梢性肺動脈狭窄症の 1 例. 第 17 回 肺塞栓症研究会・学術集会, 2010 年, 東京.
- 3) 佐久間聖仁, 松原広己, "肺高血圧症治療の現状と将来展望", The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010, Kyoto.
- 4) 佐久間聖仁, "Potential Risk Factors for Venous Thromboembolism in Outpatients", The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010, Kyoto.

H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況 なし

肺静脈閉塞症についての病理病態解明と診断基準確立のための研究

研究分担者 松原 広己 独立行政法人国立病院機構 岡山医療センター 循環器科医長

研究要旨：肺静脈閉塞症は非常にまれで、予後不良な肺高血圧症であり、しばしば臨床診断が困難である。臨床診断を確立して早期から治療に介入する必要がある。我々はPGI2投与により肺うっ血・水腫となり低酸素となる症例をPVODと臨床診断し、イマチニブを投与したところ非投与群と比較して良好な生命予後が得られた。

A. 研究目的

ダナポイント分類で1'に分類される肺静脈閉塞症（PVOD）・肺毛細血管腫症（PCH）は診断確定を病理組織診断によらねばならないため、生前に確定に至れる症例は少ない。一方で、その病像は一般の肺動脈性高血圧症（PAH）と明らかに異なるため、臨床的にある程度までの診断は可能である。特に特徴的なのはPAHの治療であるPGI2持続静注により肺うっ血・水腫を来し酸素化の悪化を起こすことであり、これまで当施設ではこの反応を手掛かりに臨床診断を行ってきた。PVOD・PCHに関して、もう一つの大きな問題は、有効な内科的治療が確立されていないことである。我々は臨床的にPVOD・PCHと診断された症例に対して、自主臨床治験として分子標的薬であるイマチニブの投与を行ってきたので、その成績を報告する。

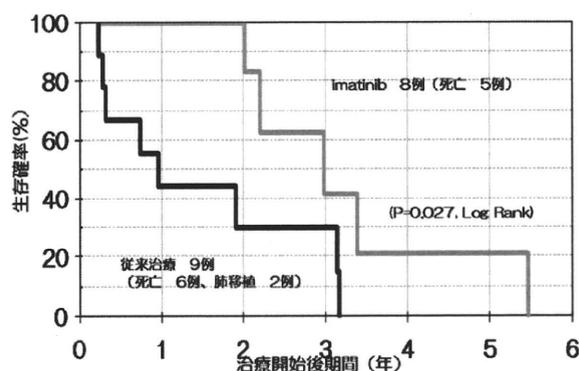
B. 研究方法

PGI2持続静注により肺うっ血・水腫を来し酸素化の悪化を起こし、PVOD・PCHが疑われた17例のうち、同意取得の出来た10例に対しイマチニブ100mgから投与開始し、2週後以降に可能であれば増量、最大投与量は400mgとした。イマチニブ投与例では静注PGI2は漸減・中止し、他のPAH治療薬に関しては継続した。イマチニブの投与を行えなかった例に関しては静注PGI2も含めて一般的なPAH治療を継続した。なお本研究は、当院倫理委員会における承認のもと実施された（承認番号H18-臨研-48）。

C. 研究結果

1例でイマチニブ投与により腎機能の可逆性の悪化を認め、投与継続できなかった。また1例では入院翌日に右心不全の悪化から経皮的心肺補助が必要となり、同意は得られていたもの

の、イマチニブの投与には至らなかった。残る8例ではイマチニブの継続投与が可能で平均維持投与量は300mg（200～400mg）であった。うち4例は右心不全のため死亡し、強皮症を元疾患とする1例は化膿性胆管炎を併発し死亡した。右心不全で死亡した4例中1例はPVOD、1例はPCHであることが剖検により確定した。治療開始からの生存期間は平均 3.26 ± 0.62 年（中央値 2.98 ± 0.83 年）であった。イマチニブ非投与例では6例が右心不全のため死亡、2例が生体部分肺移植を受けた。右心不全で死亡した6例中2例はPVOD、2例はPCHであることが剖検により確定した。また生体部分肺移植を受けたうち1例はPVOD、1例はPCHであることが摘出肺の病理診断により確定した。治療開始からの生存期間（平均 1.49 ± 0.43 年（中央値 0.96 ± 0.35 年））はイマチニブ投与例に比し有意に短かった（下図）。



D. 考察

イマチニブがPVOD・PCHに対して有効であったとする症例報告は散見されるが、まとまった症例数における検討は、我々の知る限り本報告が世界初である。PVOD・PCHは血管増殖性

疾患であるが故に、本来悪性腫瘍の治療薬であるイマチニブが有効であったと思われる。他方、平均生存期間の延長は、悪性腫瘍がイマチニブに対して耐性を獲得するとされている期間である2年間とちょうど同じであり、本疾患群においてもイマチニブに対して耐性を獲得している可能性が否定できず、今後更なる検討を要する。

E. 結論

イマチニブはPVOD・PCHに対して一定の効果を有する事が明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①著者②タイトル③雑誌名④巻・号・年
- ⑤ページ数

①Miura A, Nakamura K, Kusano K, Matsubara H, Ogawa A, Akagi A, Oto T, Murakami T, Ohtuka A, Yutani C, Ohe T, Ito H

②Three-dimensional structure of pulmonary capillary vessels in patients with pulmonary hypertension

③Circulation

④121・19・2010

⑤2151-2153

① Miura R, Nakamura K, Miura D, Miura A, Kajiya M, Hisamatsu K, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Matsubara H, Ohe T, Ito H.

② Cytokine reducing effect of azelnidipine in human peripheral blood mononuclear cells.

③ Pharmaceutical Society of Japan

④ 33・7・2010

⑤ 1148-1151

① 重歳 正尚、宮地 克維、松原 広己

② 新しい治療薬の展望 -タダラフィル、アンブリセンタン、トレプロスチニル、イマチニブなど-

③ 最新医学

④ 65・8・2010

⑤ 1772-1778

2. 学会発表

- ①学会名②演者名③演題

①第58回日本心臓病学会学術集会

②溝口 博喜、松原 広己、宗政 充、宮地 克雅

③慢性肺血栓栓塞性肺高血圧症に対する最新の治療

①第58回日本心臓病学会学術集会

②西崎 真里、松原 広己、宗政 充、溝口 博喜

③エポプロステノール持続静注療法中の肺動脈性肺高血圧症患者における運動時の血行動態変化と運動耐容能の規定因子についての検討

H. 知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

病理解剖を施行した肺静脈閉塞症 3 例の検討

研究分担者 佐藤 徹 杏林大学医学部循環器内科 教授

研究要旨：

生前診断が難しく、短期間に進行性で予後不良な肺静脈閉塞症の特徴的な臨床所見を見い出すため、病理解剖で当疾患と診断が確定した 3 例の臨床所見を特発性肺動脈性肺高血圧症の臨床所見と対比して検討した。3 例中 2 例が男性で平均年齢は 56 歳で発症から死亡までの期間は 3 年 9 ヶ月であった。エポプロステノール持続静注による肺うっ血の悪化、CT で小葉間隔壁の肥厚、スリガラス陰影、中等度の縦隔リンパ節腫大、運動負荷試験ではエルゴメータ 0 Watt で著明な低酸素血症、DLCO の低値が特発性肺動脈性肺高血圧症と異なる点であった。

A. 研究目的

肺静脈閉塞症 (PVOD) は特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) の約 1/10 の頻度で発症する稀な疾患で、進行が早く予後不良で有効な治療法がない。診断も極めて難しいため、今回、過去 10 年間に経験し病理解剖で診断が確定した PVOD 3 例の臨床所見を解析して、早期診断に寄与する所見を検討した。

B. 研究方法

各症例の病歴、診察所見、血液検査所見、胸部レントゲン写真、心電図、心エコー所見、肺血流シンチ、CT、MRI、心臓カテーテル検査、肺機能、について検討した。

(倫理面への配慮)

各症例とも家族から病理解剖およびそれを使用した臨床研究の承諾を文書で取得した。

C. 研究結果 (各所見につき症例 I、II、III の順に示す) 年齢、性別は 51 歳男性、70 歳男性、46 歳女性で、発症から死亡までの期間は 1 年 10 ヶ月、5 年 6 ヶ月、4 年であった。エポプロステノール持続静注による肺うっ血、低酸素血症の悪化は全例でみられた。CT では全例で小葉間隔壁の肥厚、スリガラス陰影、中等度の縦隔リンパ節腫大を認めた DLCO は症例 II で 32%、症例 III で 34% であった。肺血流シンチグラムでは症例 III で肺末梢に多発性陰影欠損を認めた。運動負荷試験ではエルゴメータ 0 Watt における SpO₂ が症例 II で 75%、症例 III で 78% まで低下した。当疾患と最も鑑別を必要とする特発性肺動脈性肺高血圧症と比較して、これらの所見が異なっていた。

D. 考察

PVOD は、女性の発症が圧倒的に多く 30 歳代がピークの IPAH とは異なって男女差がなく、発症年齢も 50 歳以上が少なくない。エポプロステノールが使用できるようになった 2000 年以降の IPAH の予後は治療の進歩により、5 年生存が 70% を超えるようになったが、PVOD の予後は 1 年生存が 20% と言われた頃と変わっていない。CT で特徴的な所見を呈し、DLCO が低く、労作時にかんがりの低酸素血症を示し、IPAH と異なる特徴とされている。今回は病理解剖で PVOD と確定診断された 3 症例の臨床所見を検索し、以上の特徴を有することを確認した。今後は PVOD の症例を集積して類型分類を行い治療にも生かせれば有益であろう。特に肺動脈病変の合併の度合いが臨床所見からわかれば、どの程度エポプロステノールを併用してよいかを推測できる。

E. 結論

病理解剖で確定診断された PVOD 3 例の臨床所見を解析し、従来から報告されている諸所見を有していることを確認した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐藤 徹: 浮腫を主訴に来院した慢性肺疾患をもつ 70 歳男性/ むくみの診かた「例で読み解く浮腫診療」編集: 松尾 汎
文光堂 (東京), 32-38, 2010

- 2) 佐藤 徹: 肺動脈性肺高血圧症の診断方法
循環器内科 67-5: 475-481, 2010
- 3) 佐藤 徹: 肺塞栓症
Medicina 47-8:1409-1414, 2010
- 4) 佐藤 徹: 序説: 肺高血圧症の概念、分類、
治療戦略、予後
治療学 44-8:5-10, 2010
- 5) 佐藤 徹、京谷晋吾、松原広巳、国枝武義:
肺高血圧症治療の進歩
治療学 44-8: 85-93, 2010
- 6) 片岡雅樹、佐藤 徹: Churg-Strauss 症候群に
肺高血圧を合併した症例
治療学 44-8:99-100, 2010
- 7) 佐藤 徹: 肺高血圧症の最新診療早わかり
最新医学 65-8:6-11, 2010
- 8) 佐藤 徹: 軽症肺動脈性肺高血圧症の臨床経過
Therapeutic Research 31-10:1421-22, 2010
- 9) 佐藤 徹: 肺高血圧症の治療を振り返って
心臓 42-11:1403-1404, 2010
- 10) 佐藤 徹: 肺高血圧症の概念と定義
医薬ジャーナル 46-12:73-76, 2010
- 11) 佐藤 徹: プロスタサイクリン誘導体
Heart View 15-1:52-58, 2011
- 12) 坂田好美、佐藤 徹: 肺高血圧における心機能心
エコー 12-2:132-145, 2011

H. 研究成果による特許権等の知的財産権の
取得状況 なし

肺高血圧症の病態における血管内皮機能および Rho キナーゼの役割

—モノクロタリン肺高血圧ラットでの検討—

研究分担者 白井 幹康 国立循環器病研究センター・心臓生理機能部長

研究要旨：SPring-8 放射光高解像度微小血管造影法を用いて、肺小動脈(100~500 μ m 径)の血管内皮と Rho キナーゼの機能を、モノクロタリン肺高血圧(PH)ラット群と対照ラット群間で比較・検討した。アセチルコリン(ACh)に対する血管拡張は、PH ラット群で有意に低下したが、ニトロプルシド(SNP)に対する拡張応答には差がなかった。Rho キナーゼ阻害薬(ファスジル)は、両群で同程度の血管拡張を起こしたが、PH ラット群でのみ 100~150 μ m 肺小動脈の再開通を引き起こした。モノクロタリン PH 病態における、血管内皮と Rho キナーゼの機能の重要性が示唆された。

A. 研究目的

肺高血圧症病態における血管内皮と Rho キナーゼの機能の役割を、PH ラットモデルで明らかにする。

は両群で同程度の血管拡張を起こしたが(矢印)、PH ラット群でのみ 100~150 μ m 肺小動脈の再開通を引き起こした(白サークル)。

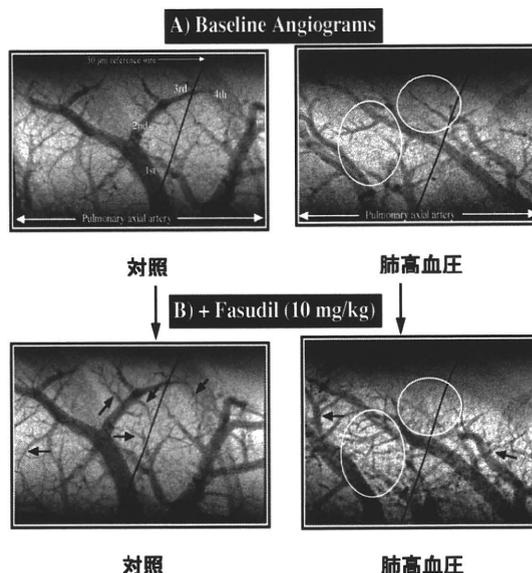
B. 研究方法

Spring-8 放射光微小血管造影法で、麻酔下ラット肺小動脈(100~500 μ m 径)の薬剤に対する血管応答を可視化し、PH ラット群(10匹)と対照ラット群(10匹)間で比較した。使用薬剤は、血管内皮依存性血管拡張物質である ACh (3 μ g/kg/min iv)、NO ドナーである SNP (5 μ g/kg/min iv)、Rho キナーゼ阻害薬であるファスジル(10mg/kg iv)。肺高血圧症誘発にはモノクロタリン(60mg/kg ip)を用いた。

本研究は国立循環器病研究センター倫理委員会で承認済みである。また、実験動物に対しては国立循環器病研究センター動物実験指針に沿って、動物愛護の配慮を行った。

C. 研究結果

ACh による血管拡張は PH ラット群で有意に低下したが、SNP による拡張応答は群間で差がなかった。図のように、ファスジ



D. 考察 E. 結論

PH ラットでは、肺小動脈の内皮依存性血管拡張物質に対する応答は低下したが、NO ドナーに対する血管平滑筋の拡張能は正常であったことから、内皮依存性拡張物質の分泌低下が推測された。また、平滑筋の Rho キナーゼは 100 μ m 前後の肺細動脈で機能過剰となり、肺血流分布の異常を引き起こすことが示唆された。

G. 研究発表 (論文)

1. Schwenke DO, Pearson JT, Sonobe T, Ishibashi-Ueda H, Shimouchi A, Kangawa K, Umetani K, Shirai M. Role of Rho Kinase Signaling and Endothelial Dysfunction in Modulating Blood Flow Distribution in Pulmonary Hypertension. *J Appl Physiol* 110:901-8,2011.
2. Schwenke DO, Pearson JT, Kangawa K, Cragg PA, Shirai M. Exogenous ghrelin accentuates the acute hypoxic ventilatory response after two weeks of chronic hypoxia in conscious rats. *Acta Physiol* 200: 279-287, 2010.
3. Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Sata Y, Shirai M, Sugimachi M. Large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels inhibit vagal acetylcholine release at the rabbit sinoatrial node. *Auton. Neurosci.* 156:149-151, 2010.
4. Akiyama T, Yamazaki T, Kawada T, Shimizu S, Sugimachi M, Shirai M. Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in catecholamine release from *in vivo* rat adrenal medulla. *Neurochem. Int.* 56(2):263-269, 2010.
5. Shimouchi A, Nose K, Shirai M. Analysis of Breath and Skin Gases Emanating during Exercise using an Original Biogas Sampling System connected to an Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometer. *IEEE Sensors J.* 10 (1): 85-91, 2010.

H. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況
なし

肺動脈由来血管平滑筋細胞の培養法の確立とそれを用いた肺高血圧症の病態解析

研究分担者 平野 賢一 大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科 助教

研究要旨

肺高血圧症は種々の原因により生じるが、いずれも現時点では、完治が困難であり、生命予後が悪く、ADLも低下させる難病である。今年度は、肺動脈由来血管平滑筋細胞（以下、PA-SMC）の培養法を確立し、慢性血栓性塞栓性肺高血圧症（以下、CTEPH）、肺動脈性肺高血圧症（以下、PAH）症例由来のP-SMCの表現型を解析した。CTEPH由来のPA-SMCは、細胞の胞体が大きく、増殖能が低下していた。また、*in vitro* アポトーシスが観察された。Cell kineticsの検討から、細胞の遊走能が低下していること、細胞から小粒子様の構造物の産出されることが観察された。一方、PAH由来PA-SMCは、細胞増殖能が高く、*in vitro* アポトーシスは認めなかった。Cell kineticsでは、細胞の遊走能、分裂能が高いことが示された。以上から、肺高血圧症由来の培養PA-SMCの表現型は、その原因疾患により多様であり、培養PA-SMCを用いた細胞生物学的解析は、肺高血圧症の病態解明に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

肺高血圧症は、種々の原因により生じるが、いずれも現時点では、完治が困難であり、生命予後が悪く、ADLも低下させる難病である。今年度は、種々の肺高血圧症由来、肺動脈血管平滑筋細胞（以下、PA-SMC）の培養法を確立し、その表現型を解析することにより、肺高血圧症の病態を考察することをその目的とした。

B. 研究方法

1) 対象

以下、3群において、PA-SMCを培養した。
慢性血栓性閉塞性肺高血圧症（以下、CTEPH）
13例、
原発性肺動脈性肺高血圧症（以下、PAH）
2例、
非PH剖検例（以下、Control） 3例。

2) 方法

肺動脈血栓内膜除去術或いは肺移植や剖検の際に肺動脈を得て、**explant** 法にて細胞を単離、**non-coating** 培養皿上で、血管平滑筋細胞増殖用メディアウム（プレートキット **SmGM-2: hEGF, insulin, hFGF-B, FBS** 含有。Lonza)にて培養し、実験に供した。

3) 評価項目

細胞形態（光学顕微鏡）
細胞増殖能（BrdU取り込み）、
in vitro アポトーシス（Cleaved caspase-3）
Cell kinetics

（倫理面への配慮）

本研究は、国立循環器病研究センター倫理委員会における承認を受けた。患者からは文書による承諾を得た。

C. 研究結果

1) 細胞形態

光学顕微鏡を用いて観察したところ、CTEPH, PAH, ControlいずれのPA-SMCも紡錘形を呈した。CTEPH由来PA-SMCは、胞体は他2群のPA-SMCより、大きかった。また、細胞表面に小顆粒様、小粒子様の構造物が多く観察された。これは、継代を重ねるごとに増加した。また、3群いずれのPA-SMCもα-SMactin、myosin heavy chain陽性。Factor VIII陰性であり、培養した細胞はSMCの免疫学的特徴を有していることを確認した。

2) 細胞増殖

細胞は同一プロトコールで継代、6 ウェル培養皿から開始し、subconfluent になった時点で、継代、必要に応じて順次スケールアップした。

CTEPH 由来 PA-SMC は、培養開始当初から増殖が遅く全症例において Passage (PS) 4 から 8 程度で増殖が停止した。

一方、PAH 由来 PA-SMC は、増殖が早く PS 10 以上への継代が十分に可能であった。

Control PA-SMC は、上記両群の中間の増殖能を示した。

さらに、DNA 合成能を検討するため BrdU の取り込みを測定した。PAH 由来 PA-SMC は、他 2 群に比べて有意な高値を示し。

CTEPH 由来 PA-SMC は、Control PA-SMC に比し、BrdU の取り込みが低い傾向を示した。

3) *In vitro* アポトーシス

Cleaved caspase-3 を細胞免疫組織学的に検討した。PAH 由来 PA-SMC では、*in vitro* アポトーシスは認めなかった。CTEPH 由来 PA-SMC では、Control PA-SMC の数十倍の細胞でアポトーシスが観察された。この結果は、TUNNEL 法でも同様であった。

CTEPH 由来 PA-SMC における細胞増殖低下、継代が困難な理由として、この *in vitro* アポトーシスがその一因と考えられる。

4) Cell kinetics

国立循環器病研究センター細胞生物学 三浦浩一先生、同 望月直樹先生の御協力を得て Cell kinetics を観察した。

PAH 由来 PA-SMC は、細胞増殖、細胞遊走活性が高いと考えられた。一方、CTEPH 由来 PA-SMC は、細胞増殖や遊走活性が低いと考えられた。また、光学顕微鏡で観察された小顆粒様、小粒子様の構造物は、細胞表面から産生されていることが明らかになった。

D. 考察

肺高血圧症は、種々の原因により生じ、その病態は多様である。PAH では、PA-SMC の増殖による肺動脈狭小化がその主たる病態と考えられている。今回の検討では、PAH 由来 PA-SMC は、細胞増殖能が高く、*in vitro* アポ

トーシスも認めなかった。このことは、PAH の病態に深く関連しているものと推察する。

一方、CTEPH の病態は、いまだ不明な点が多い。今回、年齢、性、原因が多様な 10 症例以上の CTEPH 症例由来 PA-SMC のすべてにおいて、(1) 細胞増殖が遅いこと、(2) 細胞表面から小粒子が産生されること、が、共通して認められた。今回、得られた情報をもとに、さらに詳細に細胞生物学的検討することで、CTEPH の病態の解明に貢献できるのではないかと考えている。

E. 結論

PA-SMC 培養法の一つを確立した。培養 PA-SMC の表現型は、原因疾患により多様であった。肺高血圧症の病態を考察する上で、本法は有用であると考えられる。次年度は、肺静脈閉塞症由来 P-SMC の検討を、機会を得て行いたいと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

肺静脈閉塞症についての病理病態解明と診断基準確立のための研究

研究分担者 坂尾 誠一郎 千葉大学医学部呼吸器内科助教

研究要旨：

肺静脈閉塞症（PVOD）や慢性肺血栓塞栓症（CTEPH）の一部病態など、shear stress が関与しないと思われる肺高血圧症（PH）の病態において、血管内皮細胞（EC）の分化転換（endothelial-mesenchymal transition; EnMT）が関与するかを調べた。特に肺高血圧症の血管リモデリング部位に存在する筋線維芽細胞（MFb）と EC との相互作用に着目した。現状では希少症例の PVOD から細胞分離することは困難なため、今回の実験では CTEPH の中枢血栓から MFb を分離し、*in vitro* において EC との相互作用を確認した。両細胞の共培養において、EC の EnMT が確認された。また Autophagy の経路やミトコンドリアを中心とした代謝経路にも変化がみられた。今後の課題としては、PVOD における内皮細胞で同変化が存在するかを *in vivo* および *in vitro* 両面で確認したい。

A. 研究目的

肺静脈閉塞症（PVOD）は、肺高血圧症（PH）を生じる疾患である。その病態の主座は肺静脈であり、肺動脈性肺高血圧症（PAH）の肺動脈と大きく異なる（文献 1）。PAH における血管リモデリングには shear stress が大きく関与するが（文献 2）、PVOD には shear stress が関与しないと思われる。同様に shear stress が関与しない PH 疾患に慢性肺血栓塞栓症（CTEPH）の一部病態がある。それは中枢が血栓により完全閉塞したその末梢血管障害である（文献 3）。両者には shear stress の関与しない共通する血管リモデリングの機序が存在するかもしれない。また、肺高血圧症全般に血管リモデリング部位には筋線維芽細胞（MFb）が存在する。同様に PAH では、血管内皮細胞（EC）の関与は重要である（文献 4）。ここで我々は、shear stress が関与しない PH 疾患におけるリモデリングには、MFb と EC の相互作用、特に分化転換（endothelial-mesenchymal transition; EnMT）が重要ではないかとの仮説を立てた。この研究の目的は、同仮説を証明することである。

1. Mandel J, Mark EJ, Hales CA. Pulmonary veno-occlusive disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162:1964-73.

2. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, et al. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J* 2005; 19: 1178-80.

3. Galie` N, Kim NHS. Pulmonary microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:571-576.

4. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Cool CD, et al. VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34+ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells. *FASEB J* 2007; 21: 3640-52.

B. 研究方法

まず、血栓内膜摘除術を施行したCTEPH患者の摘出血栓より細胞を分離した。初代培養にて増殖してきた細胞を、クローニングシリンダーにて2種類に分離した。形態学的、および免疫染色により、それらを筋線維芽様細胞(MFLCs)と内皮様細胞(ELCs)とした。免疫染色には、内皮細胞のマーカーであるFactor VIII、平滑筋細胞のマーカーである α -SMA、desmin、間葉系細胞のマーカーであるvimentinなどを使用した。

分離されたMFLCsが、正常肺末梢動脈血管内皮細胞(PMVECs)にどのような影響を与えるかを調べた。コントロール細胞として、肺癌手術施行時に摘出された正常肺動脈から分離した肺動脈線維芽様細胞(PAFLCs)を用いた。

まず、MFLCsおよびPAFLCsを無血清培地にて48時間培養し、それらをconditioned mediumとして、PMVECsの培地とした。48時間後正常培地に交換し、さらに48時間培養後細胞変化を確認した。同時に、Cell culture insertsを用いて、MFLCsまたはPAFLCsとPMVECsの共培養を行った。細胞変化を確認する方法として、まずEnMTを同定するため、内皮細胞マーカー (Factor VIII) および平滑筋細胞マーカー(α -SMA)にて免疫染色を施行した。加えて、変化する遺伝子群を正確に定量するためPCR array解析を施行した。この手法は、マイクロアレイをPCRによって定量化したものである。RNAの発現変化をより正確に定量でき、細胞機能ごとにその関連遺伝子を同時に84種類定量可能である。今回我々はAutophagy PCR arrayとEndothelial cell biology PCR arrayを用いた。またAutophagyのkey蛋白であるLC3を免疫染色で確認した。加えて、代謝経路の変化を確認するため、ミトコンドリアおよびSOD2を免疫染色で確認した。

Autophagyの系はmTORにより制御されているが、その働きを抑制するRapamycinが、これらの細胞形態変化にどのように影響するかを確認した。

倫理面への配慮については、本研究は患者を対

象とした基礎研究であり、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則、ならびに本邦における法的規制要件を遵守して実施した。手術検体を頂く患者さんからは、事前にインフォームドコンセントを行い、書面による承諾を得た。この研究は千葉大学医学部の倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

PMVECsをMFLCsによるconditioned mediumで処理すると細胞の形態変化が確認された。コントロールに比し、正常内皮細胞の持つ敷石状の形態が変化し、細胞は紡錘形となった。また内皮細胞のマーカーであるFactor VIIIの発現が低下し、平滑筋細胞のマーカーである α -SMAの発現が確認された。またそれらを同時に発現する細胞も確認できた(図1)。また共培養実験でも同様の結果が確認された(図2)。

図1

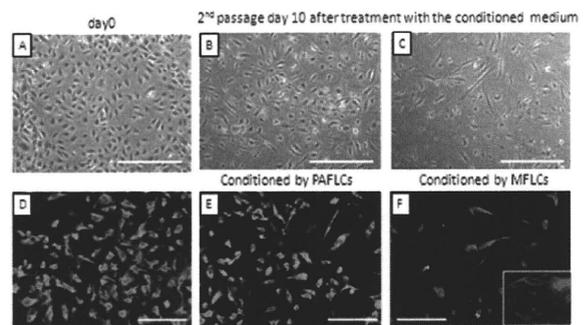
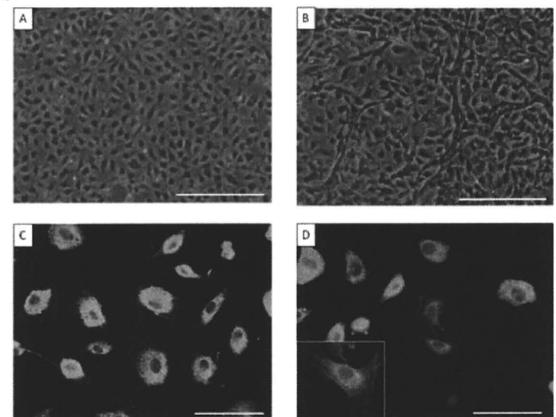
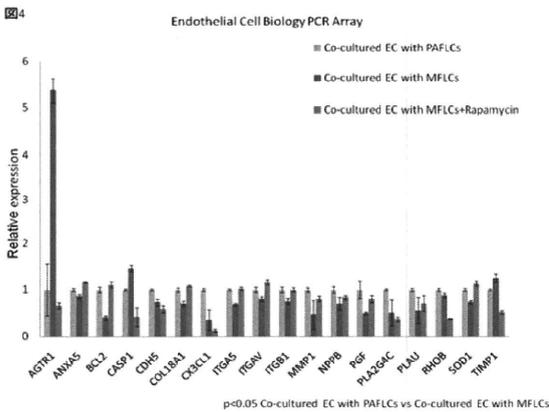
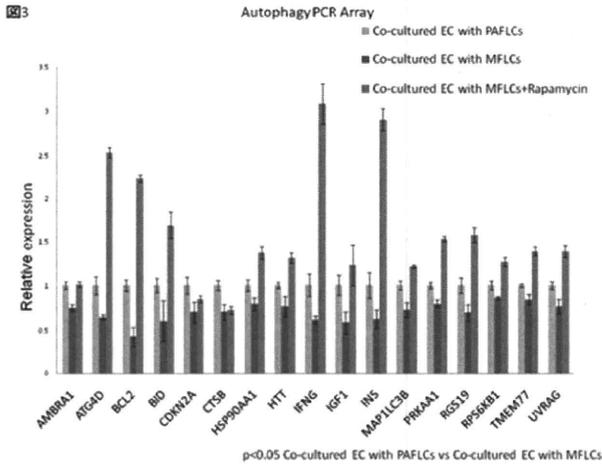


図2

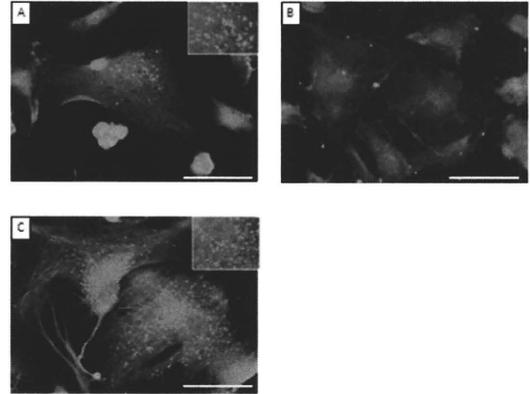


PCR array実験では、Autophagy PCR array (図3) とEndothelial cell biology PCR array (図4) において、様々な遺伝子が増加した。そしてそれらの遺伝子変化はRapamycinにより抑制された。



PMVECsにおけるAutophagyのkey蛋白であるLC3の発現は、コントロールに比しMFLCsとの共培養で低下していた。しかしRapamycinの処理によりその発現は回復した (図5)。

図5



同様に、コントロールでみられたミトコンドリアの繊維状構造も、MFLCsとの共培養でその構造が崩壊した。しかしRapamycin処理にてその構造が回復した (図6)。またSOD2の発現もMFLCsとの共培養でその発現が低下したが、やはりRapamycin処理にて改善した (図7)。

図6

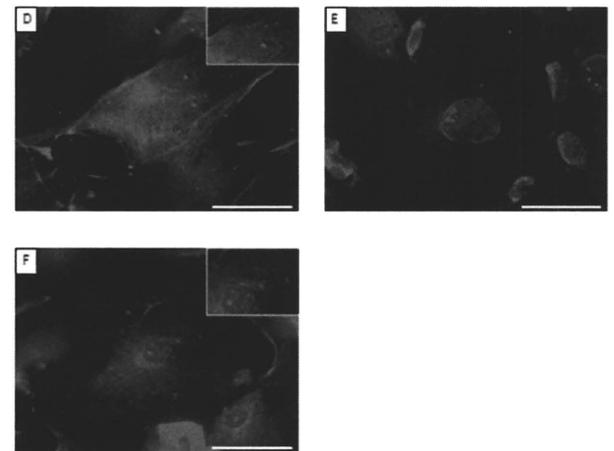
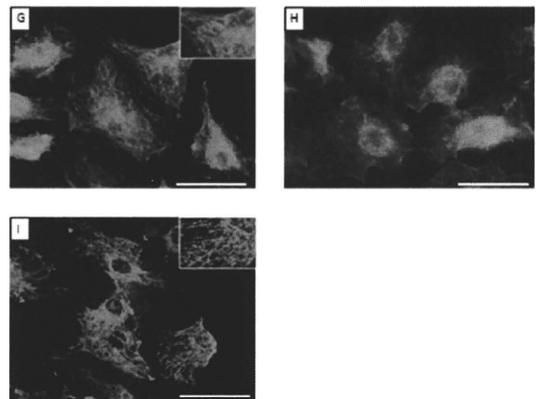


図7



D. 考察

今回、MFLCsからの因子がEnMTを誘導した。EnMTの誘導には、TGF β やRASのカスケードが関与するが、今回の実験ではどのような因子が関与したかは確認できなかった。今後の課題としてそれらを解明する必要がある。

またRapamycinはmTORを抑制するため、Autophagyの系を亢進させたのは予測される結果であったが、同薬剤がどのようにミトコンドリアの形態異常を回復させ、SOD2の減少を回復させたかは不明である。しかし、mTORはストレス反応で誘導される遺伝子発現を抑制しており、RapamycinがmTORを抑制したことで、それらの遺伝子発現を誘導した可能性もある。SOD2もこれらの遺伝子の一因である。

E. 結論

今回の実験で我々は、PMVECsとMFLCsとの相互作用を確認した。MFLCsから誘導される因子は、PMVECsに対してEnMTを誘導し、Autophagyの系を変化させ、ミトコンドリアにおける代謝経路に関与する可能性を確認した。今回の実験はあくまでもin vitroの実験であり、in vivoの病態を直接証明したものではないが、このような間葉系細胞間の相互作用がshear stressを介さないリモデリングに重要ではないかと示唆された。今後の課題としては、PVODにおける内皮細胞で同変化が存在するかをin vivoおよびin vitro両面で確認したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakao S, Tatsumi K. The Effects of Antiangiogenic Compound SU5416 in a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension. *Respiration*. 2011;81(3):253-261.

2. Sakao S, Tatsumi K. Vascular remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension: multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities. *Int J Cardiol*. 2011;147(1):4-12.

3. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or Irreversible Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43(6):629-34.

4. Chen Z, Nakajima T, Tanabe N, Hinohara K, Sakao S, Kasahara Y, Tatsumi K, Inoue Y, Kimura A. Susceptibility to chronic thromboembolic pulmonary hypertension may be conferred by miR-759 via its targeted interaction with polymorphic fibrinogen alpha gene. *Hum Genet*. 2010;128(4):443-52.

5. Ikari J, Tanabe N, Tatsuno I, Yamanaka M, Sakao S, Tada Y, Kurosu K, Kasahara Y, Takiguchi Y, Tatsumi K. ACTH deficiency and PGI(2) therapy in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol*. 2011;146(3):449-50.

6. Yano T, Kasahara Y, Tanabe N, Sugiura T, Kitazono M, Yamauchi K, Sakao S, Takiguchi Y, Tatsumi K. Juvenile Pulmonary Hypertension Associated with Fibromuscular Dysplasia. *Intern Med*. 2010;49(22):2487-2492.

7. Amano H, Tanabe N, Sakao S, Umekita H, Sugiura T, Kitazono S, Kitazono M, Kuroda F, Kasahara Y, Tatsumi K. A case of isolated peripheral pulmonary artery branch stenosis associated with multiple pulmonary artery aneurysms. *Intern Med*. 2010;49(17):1895-9.

H. 知的所有権の取得状況

特記なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

PVOD における肺血流シンチグラフィの画像所見の特徴

研究分担者 木曾 啓祐 国立循環器病研究センター放射線部 医師

研究要旨：肺静脈塞栓症(PVOD)における肺血流シンチグラムの所見について解析し、その特徴を明らかにすることを目的とした。PVOD 症例での肺血流シンチグラフィで正常肺血流を示す症例は全くなく、肺動脈性肺高血圧症例とは異なるびまん性の細かい不均一肺血流を示した。特に上肺野の血流低下を 1/2 症例で認めた。慢性肺血栓塞栓症様の多発血流欠損を示す症例も 1 例認められた。今後、診断基準作成には肺血流シンチグラフィ画像の定量化を行い、評価する必要を認めた。

A. 研究目的

肺静脈塞栓症(PVOD)は肺高血圧を呈する疾患の中でも非常に稀で予後不良な疾患であり、さらにその診断は非常に困難で病理解剖により初めて確定診断に至る症例が多い。

そこで今回、病理学的にPVODと診断された患者の肺血流シンチグラムの所見について解析し、その特徴を明らかにする。

B. 研究方法

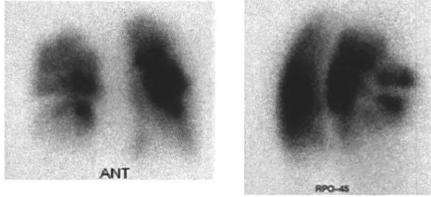
本年度はまず、当院(国立循環器病研究センター)で剖検され、組織学的に診断が確定したPVOD症例5例を対象に、生前施行された肺血流シンチグラフィ所見を視覚的に評価し、他の特発性肺高血圧症(IPAH)・慢性肺血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)などの肺高血圧疾患との画像所見と比較した。なお、肺血流シンチグラフィは東芝社製1検出器型γカメラGMS-9000を用いて、^{99m}Tc標識大凝集性ヒト血清アルブミン(MAA)185MBqを静脈投与し、座位にて6方向(正面・後面・左右側面・左右後斜位)をプリセットカウント(1000キロカウント)で撮影したデータを視覚的に画像評価した。

本研究は国立循環器病研究センター倫理委員会承認済みである。

C. 研究結果

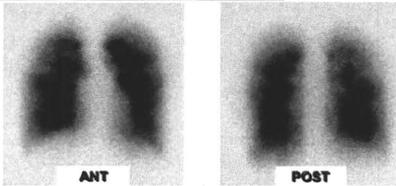
検討症例5例の内、正常な肺血流所見を呈した症例は見られなかった。5例中1例は外側域を中心に多発する楔状の血流欠損を呈し、画像所見上はCTEPHと類似しており両疾患の鑑別は困難であった(図1)。なお、この症例は肺動脈造影検査においても肺動脈の多発狭窄～閉塞が認められており、肺動脈造影所見上もCTEPHとして矛盾しない診断であった。残りの4例は両肺ともにびまん性の血流不均一性を呈していたが、IPAH等の典型例で見られるようなmottled pattern等などの粗大な不均一性は認められず、もっと細かい血流不均一性であった(図2,3)。また、これら不均一性を呈した4症例中2例では前・後面像において外側域全体(特に肺尖部を中心とする上肺野)の血流が中心領域よりも低下して見られた。ただし、これらの所見はあくまでも視覚的評価による傾向・印象であり、他の類似疾患との鑑別に有用といえる特徴的な所見の抽出までには至らなかった。

図 1
PVOD症例の肺血流シンチグラフィー
多発する楔状血流欠損(CTEPH様)パターン



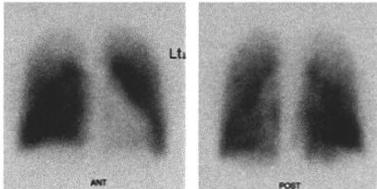
外側域を中心に多発する楔状の血流低下～欠損を認め、CTEPHに典型的な血流異常パターン。なお、この症例は肺動脈造影検査においても肺動脈の多発狭窄～閉塞が認められており、肺動脈造影所見上もCTEPHとして矛盾しない診断で、PVODとの鑑別は困難な症例であった。

図 2
PVOD症例の肺血流シンチグラフィー
びまん性の不均一肺血流パターン



全体的に肺血流は不均一であるが、IPAHに見られるmottled patternのような粗大な不均一性は認められない。

図 3
PVOD症例の肺血流シンチグラフィー
不均一肺血流+上肺野血流低下パターン



全体的に非常に細かい不均一性を呈し、特に上肺野の血流は他領域と比較して低下している。

D. 考察

肺血流シンチグラフィーで用いられるRI薬剤「 ^{99m}Tc -MAA」は径が約 $10\text{--}60\ \mu\text{m}$ に調整された放射性微粒子薬剤で、静脈投与後肺毛細血管系よりサイズが大きいため毛細血管を通過することができずに補足され、微小塞栓となって肺に選択的に集積する。そこで画像化される肺内分布はその領域を流れる肺動脈血流量に比例することから画像診断に用いられている。そこで、純粋に肺静脈側のみが障害されれば血流の不均一性は呈

するものの、他の肺高血圧疾患IPAHやCTEPHと比較するとその不均一性の度合いが軽度であることが予想され、その結果、画像上はより細かい血流不均一性となって描出されていると推察される。ただし、実際の病理所見においてはPVODと診断がついても肺血管の障害部位が動脈領域に及ぶことも多く、組織障害を伴うことも多いなど、病態に多様性が認められることから、必ずしも一定の血流異常としては判断できないと考えられる。このことが、他の肺高血圧疾患との鑑別を困難にしていると考えられる。

今回の検討では視覚的評価のみのため、客観性に乏しい。今後は視覚的印象を定量化するなどの客観化された指標の検討が必要と考えられる。具体的には、不均一性の定量化（ピクセル毎のカウントの標準偏差や変動係数、ヒストグラムの解析など）、部位別血流評価（上・中・下肺野で集積の程度を比較）などがあげられる。共同研究の他施設症例についても評価し、症例数を増やして今後検討していく。

E. 結論

PVODの肺血流シンチグラフィーの異常所見としては、びまん性の血流不均一性が挙げられるが、IPAHやCTEPHと比較してその不均一性は軽度で細かい印象を持つ症例が多かった。しかし、このような所見が他の類似疾患とoverlapするものもあり、診断基準作成には鑑別の精度を上げる必要があり、肺血流シンチでの血流不均一性の定量化等の客観化された指標の検討を要すると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

上記いずれも現時点で発表なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

現時点で該当なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
高木弥栄美 植田初江	肺動脈性肺高血圧症の肺血管リモデリング	治療学	44(8)	901-904	2010
<u>Sakuma M</u> Nakanishi N Shirato K	Mortality from Pulmonary Heart Disease in Japan 1979-2006	Ann Vasc Dis	3(3)	e1-e6	2010
Miura A Nakamura K Kusano K <u>Matsubara H</u> Ogawa A Akagi A, Oto T Murakami T Ohtuka A Yutani C Ohe T, Ito H	Three-dimensional structure of pulmonary capillary vessels in patients with pulmonary hypertension	Circulation	121(19)	2151-2153	2010
<u>佐藤 徹</u>	序説: 肺高血圧症の概念、分類、治療戦略、予後	治療学	44(8)	5-10	2010
<u>Sakao S</u> Tatsumi K Voelkel NF	Reversible or Irreversible Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension	Am J Respir Cell Mol Biol	43(6)	629-634	2010

基礎の up to date 1

肺動脈性肺高血圧症の肺血管リモデリング

高木弥栄美 植田初江

たかぎ やえみ, うえだ はつえ: 国立循環器病研究センター 臨床病理科

● はじめに

肺高血圧症 (pulmonary hypertension: PH) はこれまで負荷時の平均肺動脈圧を考慮に入れて定義されていたが, 2008 年のダナポイントで開催された世界肺高血圧会議において, 安静時平均肺動脈圧 21~24 mmHg を borderline PH, 25 mmHg 以上を manifested PH と定義が変更された¹⁾。また, PH は生理学的に肺動脈性 (前毛細血管性) と肺静脈性 (後毛細血管性) に分類されているが, 特に前毛細血管性 PH のなかでも特発性肺動脈性肺高血圧症 (idiopathic pulmonary arterial hypertension: IPAH), 膠原病, 先天性心疾患, 門脈圧亢進症に伴う肺高血圧症とは病理学的に類似性があり, 臨床病状や治療法も近似していることから一括して肺動脈

性肺高血圧症 (PAH) とよんでいる (表 1)²⁾。また, 1998 年のエビアン分類では肺静脈閉塞症 (PVOD) や肺毛細血管腫症 (PCH)³⁾については, 病変の首座が違うことより別疾患群に分類されていたが, PVOD と PCH はしばしば肺実質における変化や肺動脈内膜線維症や中膜肥厚を呈すること, 生理学的, 臨床的にも共通点が多いことより 2003 年のベニス分類で PAH の 1 群 4 類に入れられ, ダナポイント分類では 1 群として取り扱われることになった。このように PH については病理学的にも種々の背景があり, その治療には病理学的理解が重要である⁴⁾。本稿では, 特に原因が明らかでない IPAH に関しての肺動脈の血管リモデリングについて概説する。

表 1 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病理学的分類 (文献 2 より引用)

1. 肺動脈病変 (腺房動脈内) の分類
 - 中膜肥厚がない肺動脈病変
 - 中膜肥厚, 内膜肥厚 (細胞性, 線維性) を伴った肺動脈病変
 - 求心性層状 (内膜肥厚)
 - 偏心性非層状, 求心性非層状 (内膜肥厚)
 - 叢状 and/or 拡張した病変または動脈炎を伴った肺動脈病変
 - 動脈炎単独の肺動脈病変

* 以上に静脈~細静脈の変化を伴わないこと
2. 動脈病変の有無にかかわらず (さまざまなサイズの静脈の) 閉塞性静脈病変
3. 動脈病変および静脈病変の有無にかかわらず微小肺血管病変が存在する
4. 分類不能

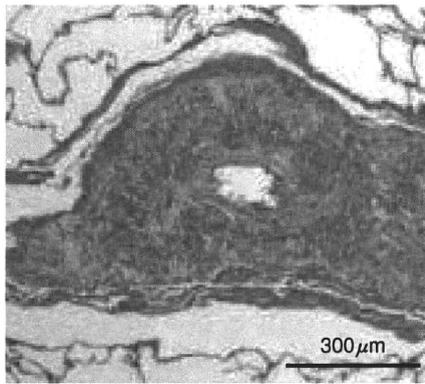


図 1 中膜肥厚
約 500 μm 径の肺動脈で中膜平滑筋の増殖がみられる (H-E 染色)。

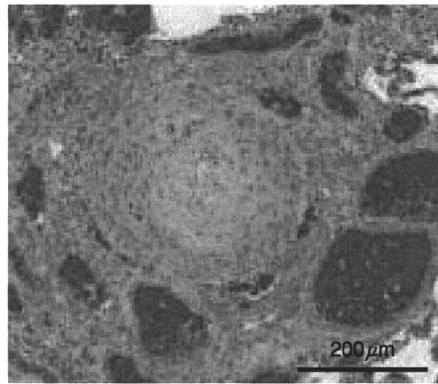


図 2 求心性層状内膜肥厚により閉塞した
内腔
直径 300 μm (H-E 染色)。

● 病態

PAH には血管のリモデリング、血管攣縮、血栓形成が関与している。最近、特に肺動脈のリモデリングが本疾患の主体と認識されてきた⁵⁾。すなわち、肺小動脈の高度な内膜、肺動脈平滑筋や内皮細胞の増殖による肥厚と内腔の狭窄が起こり、肺血管抵抗を増大させ肺高血圧を生じている。

細胞増殖の機序として肺動脈内皮細胞 (pulmonary artery endothelial cells : PAEC) のアポトーシスの亢進や、アポトーシス抑制による肺動脈平滑筋細胞 (pulmonary artery smooth muscle cells : PASMC) の増殖が考えられている。また、内皮においてもアポトーシス抵抗性を獲得することで、肺動脈の内腔の狭窄や閉塞をきたすとの報告がある⁶⁾。

● 病理変化

すべての PH には病因の違いにかかわらず、肺動脈において共通の病理変化がある。すなわち、弾性・筋性動脈の中膜肥厚、内膜肥厚、外膜肥厚などの狭窄病変、複合血管病変としての叢状病変や拡張性病変ならびに血管炎所見などである⁷⁾。これらの肺血管のリモデリングは肺高血圧があれば診断の手がかりにはなるが、PAH の確定診断には限界がある。なぜなら、肺動脈の中膜と内膜肥厚は肺の一部分に非特異的に生じることや、気道もしくは間質疾患や腫瘍

など肺高血圧症の有無に直接関係しなくても二次的に生じることがある。ここで、前述の肺高血圧における重要な病理学的変化を示す。

1 中膜肥厚

中膜肥厚は、血管壁を構成するさまざまなタイプの種類の細胞の増殖とアポトーシス間のアンバランスの結果生じると考えられている。血管拡張因子 (プロスタサイクリン, NO) と血管攣縮因子 (エンドセリンなど) のアンバランスが血行動態に影響を及ぼす。また、本来平滑筋のない末梢の小肺動脈にも平滑筋線維が増加している (図 1)。主に筋性動脈の中膜において、平滑筋細胞が肥厚、増殖し結合組織や弾性筋組織が末梢血管に拡大してくる (muscularization)。

2 内膜肥厚

内膜肥厚は求心性層状 (concentric laminar)、偏心性非層状 (eccentric non-laminar)、求心性非層状 (concentric non-laminar) の構成細胞の優位性により 3 タイプに分けられる。

a 求心性層状 (concentric laminar) 内膜肥厚 (図 2)

求心性層状内膜肥厚は電子顕微鏡や免疫組織染色により線維芽細胞・筋線維芽細胞・平滑筋細胞などのさまざまな線維・細胞で肥厚している。最近の報告で、上皮細胞と線維芽細胞が平滑筋細胞に変化する可能性があることがわかってきており、形態学的変化の過程を示していると考えられる⁸⁾。特に叢状病変との関連が強い