

青黛に合併する肺高血圧症の病態探索研究

研究協力者 片岡雅晴 慶應義塾大学医学部循環器内科 講師

研究要旨：

青黛における肺高血圧症合併のメカニズムを調査するために、ラットを用いた動物実験を実施した。青黛含有飼料で飼育されたラットは右室肥大を認めた。また、VEGF 受容体拮抗薬を飼育開始時に投与することによって、肺高血圧症が有意に惹起され、右室肥大も増大した。青黛含有飼料で飼育されたラットでは、CYP1A1 の発現量が亢進しており、青黛による CYP1A1 活性化による肺高血圧症の合併が示唆される結果であった。

共同研究者

袴田陽二（日本獣医大学）

平出貴裕（慶應義塾大学）

寺谷俊昭（慶應義塾大学）

査後に心臓を摘出し、右室を切り離して重量を測定し、右室肥大の程度を評価した。また、肺を摘出しホルマリン固定後に病理切片を作成し HE 染色にて肺動脈中膜肥厚の程度を評価した。

また、青黛は indigo を多く含有しており、indigo は AhR を介する CYP1A1 シグナル経路に作用することが報告されている。従来、肺高血圧症ラットモデルの作成では、VEGF 受容体拮抗薬(SUGEN)を単回皮下注射以後 3 週程度の低酸素環境下で飼育した後に、さらに常酸素下で 10-13 週飼育することで作成されるモデルが一般的である。この従来モデルの肺において AhR を介して CYP1A1 シグナル経路が活性化しており、CYP1A1 が肺高血圧症発症において重要な役割を果たすことが注目されている(Dean A, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2018)。よって、青黛による肺高血圧症合併が CYP1A1 を介する機序によるものかを調査するために、青黛含有飼料で飼育されたラットの肺組織の CYP1A1 発現量を計測した。

さらに、この CYP1A1 を介して、より簡便な新規肺高血圧モデルの作成にも挑戦を試みるため、SUGEN 単回皮下注射後に常酸素下にて 8 週間の青黛含有飼料で飼育したモデルで、カ

A. 研究目的

青黛は炎症性腸疾患の治療薬として画期的な可能性を秘めているが、臨床的に一部の患者で肺動脈性肺高血圧症を合併することが報告されている(Nishio M, Eur Heart J. 2016)。肺動脈性肺高血圧症は肺動脈圧の上昇から右心不全を合併する難病指定疾患であり、今後の青黛の炎症性腸疾患治療薬としての発展においては、肺動脈性肺高血圧症の副作用克服が必須である。よって、本研究では、青黛における肺高血圧症合併のメカニズムを in vivo 動物実験をメインとして基礎的に検証することが目的である。

B. 研究方法

4 週齢の雄 Fischer344 ラット(体重 100-110g)を、青黛を含有した飼料を用いて常酸素下にて 12 週間飼育した(青黛 600mg/kg/day)。肺高血圧症の評価のために心臓カテーテル検査を実施した。カテーテル検

テーテルや病理学的評価も実施した。

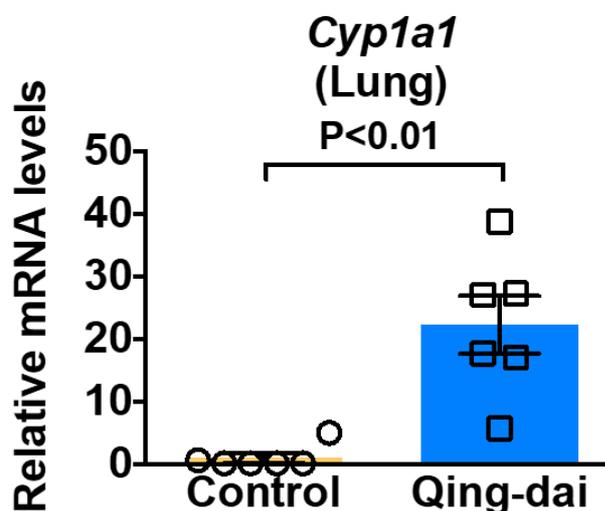
(倫理面への配慮)

動物実験の実施にあたっては、慶應義塾大学および共同研究機関の日本獣医大学にて、実験計画書に基づいた動物実験倫理委員会の研究実施承認を受けている。

C. 研究結果

4週齢の雄 Fischer344 ラットを、青黛を含有した飼料を用いて常酸素下にて12週間飼育した際のカテーテル検査では、肺高血圧症の血行動態の指標である右室収縮期圧は、上昇傾向にはあったものの統計的に有意ではなかった。しかし、右室肥大の指標である右室:体重比(RV/BW)および右室:左室と心室中隔比(RV/LV+S)については、有意な上昇を認めた。また、病理学的な解析においては、肺動脈中膜肥厚を有意に認めた。

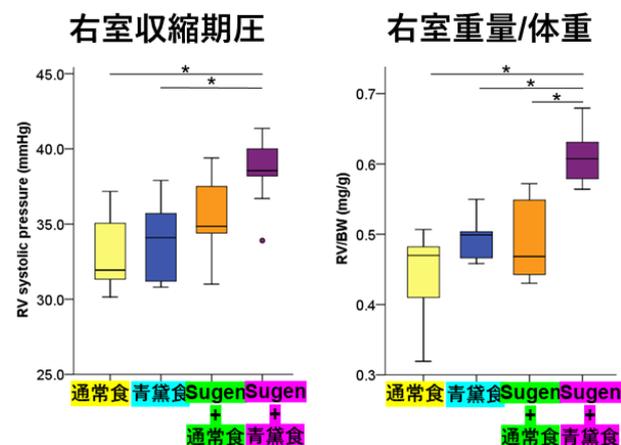
また、肺組織から RNA 抽出後に CYP1A1 の mRNA レベルの発現量を定量的 PCR 法にて測定したところ、CYP1A1 が通常飼料にて飼育されたラット肺に比べて、青黛含有飼料飼育ラット肺では、約 20 倍以上に上昇していることが明らかとなった(図 1)。



【図 1: 青黛(Qing-dai)含有飼料で12週間飼育したラットの肺における CYP1A1 発現量】

さらに、CYP1A1 を青黛により強く活性化す

ることによる、従来に比べてより簡便な(低酸素チャンバーの不要でより短期間で可能な)新規肺高血圧症モデル開発が可能かどうかを調べるため、SUGEN 単回皮下注後に常酸素下で8週間飼育した。カテーテル検査において青黛含有飼料飼育ラットよりもさらに右室収縮期圧が上昇しており、通常ラットに比べて統計的にも上昇の程度は有意であり、肺高血圧症が作成されることを確認した。右室肥大の指標である RV/BW や RV/LV+S も、さらに有意な上昇をしていた(図 2)。また、病理学的解析でも肺動脈中膜肥厚がより強く出現することが確認された(図 3)。



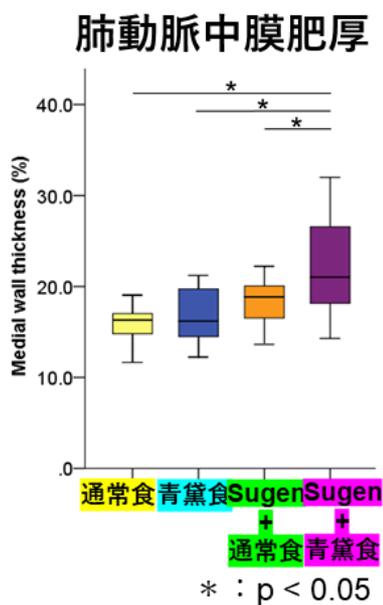
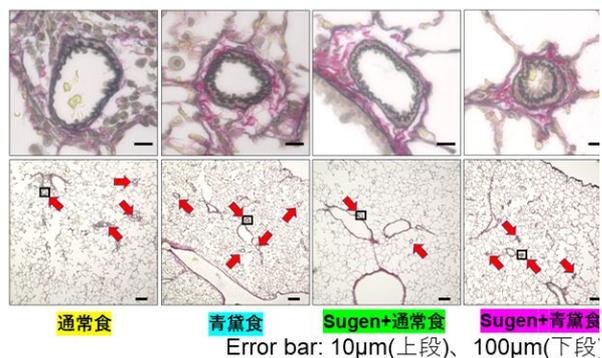
【図 2: VEGF 受容体拮抗剤(SUGEN)単回皮下注後に青黛含有飼料で8週間飼育したラットにおけるカテーテルデータ値と右室肥大】

D. 考察

炎症性腸疾患治療での青黛による臨床的な肺高血圧症合併のメカニズムを調査するために本研究を実施した。本研究では、ラットにおいて、青黛が肺での CYP1A1 発現を亢進すること、青黛が肺動脈中膜肥厚を誘発すること、さらに、SUGEN と組み合わせる相乗効果により肺高血圧症が有意に作成されることが実証された。本研究は、少なくとも CYP1A1 を介する作用が青黛による肺高血圧症合併のメカニズムの一つとして重要であることを解明したとともに、SUGEN を組み合わせることでの従

来よりも簡便な新規動物モデルの開発にも寄与する価値がある。

今後は、臨床的に実際に青黛治療によって肺高血圧症を発症する炎症性腸疾患の患者群が、どのような生物学的な背景を有しているか、その生物学的な背景が、今回のラット研究で得られた知見とどのように繋がるかをより詳細に研究していく必要があると考える。青黛が炎症性腸疾患治療において有効であることは重要であり、青黛を治療法として排除するのではなく、青黛治療が可能な適切な患者群(肺高血圧症を合併するリスクが低い患者群)を適切に見極めるといふ個別化医療を目標とすべきと考える。



【図 3: SUGEN 単回皮下注後に青黛含有飼料で 8 週間飼育したラットにおける肺の病理像(上段)と肺動脈中膜肥厚の定量化(下段)】

E. 結論

ラットを用いた基礎研究を実施し、青黛による肺高血圧症合併の機序として CYP1A1 経路が重要であること、青黛がラットでも再現性をもって肺血管に障害をもたらすことが実証された。今後の炎症性腸疾患治療における臨床的な個別化医療の実現に向けては、本研究を基盤として今後も永続的な取り組みが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

未発表

2. 学会発表

未発表

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし