

令和元年9月10日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10933

研究課題名(和文) 実験的肺高血圧に対する亜硝酸依存性NO合成機構の賦活による治療

研究課題名(英文) Treatment with NO-dependent activated nitrite in experimental pulmonary hypertension

研究代表者

張 尔泉 (Zhang, Erquan)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30456727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：左 右シャントを伴う先天性心疾患、ARDS、新生児遷延性肺高血圧、膠原病、肺線維症、特発性肺動脈高血圧症などでは、肺動脈圧の上昇から右心不全を来し、治療に難渋する。慢性低酸素暴露肺高血圧ラットに対して、 $\text{KNO}_3$ を用いての肺動脈血管病変の抑制効果について調べた。平均肺動脈圧と右心室肥大は低酸素暴露では有意に上昇、低酸素暴露肺高血圧症モデルができた。平均肺動脈圧、平均肺動脈血圧/平均動脈血圧、右心室肥大など結果では、低酸素暴露により有意に上昇したが、 $\text{KNO}_3$ の投与により抑制が認められなかった。 $\text{KNO}_3$ は慢性低酸素暴露肺高血圧症に対して抑制効果が認められなかった、続いて検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の学術的意義では、硝酸イオン・亜硝酸イオンを摂取するとNOSに依存しない、NO生成が高まることが期待できる。硝酸・亜硝酸・NO系による、肺高血圧発症抑制効果を調べるため、実験的肺高血圧ラットに硝酸イオン水・亜硝酸イオン水を経口投与し、硝酸、亜硝酸の体内動態とNO生成(リサイクルされたNO)を調べ、肺高血圧と肺動脈血管病変の発生・進展に対する抑制効果を明らかにし、血管内膜の細胞性・線維性増殖への影響を調べる。社会的意義は、亜硝酸イオン( $\text{KNO}_3$ )の慢性低酸素肺高血圧症に対する抑制効果があれば、肺高血圧症に対する新し治療法ができ、コストも安くなる。

研究成果の概要(英文)：Treatment of pulmonary arterial hypertension is difficult. The major causes of PAH are right heart failure caused by congenital heart disease with left-right shunt, ARDS, neonatal persistent pulmonary hypertension, collagen disease, pulmonary fibrosis, idiopathic pulmonary arterial hypertension, etc. Inhibitory effects of  $\text{KNO}_3$  was investigated in pulmonary arteries of chronic hypoxia-induced hypertension rats. Mean pulmonary arterial pressure and right ventricular hypertrophy were significantly increased by hypoxic exposure, resulting in hypoxic-induced pulmonary hypertension model. Results such as mean pulmonary arterial pressure (mPA), mean pulmonary arterial pressure / mean arterial blood pressure (mPA / mAP), and right ventricular hypertrophy (RVH) were significantly increased by chronic hypoxia-induced hypertension, but inhibition of  $\text{KNO}_3$  was not observed. Suppressive effect of  $\text{KNO}_3$  that were not obtained on chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension should be further examined.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：pulmonary hypertension

## 1. 研究開始当初の背景

左一右シャントを伴う先天性心疾患、ARDS、新生児遷延性肺高血圧、膠原病、肺線維症、特発性肺動脈高血圧症などでは、肺動脈圧の上昇から右心不全を来し、治療に難渋する。長期的には、肺高血圧血管の器質的変化——①本来、血管平滑筋を持たない末梢肺動脈での筋性化、②すでに存在する中膜の血管平滑筋の肥大・増殖、③叢（そう）状病変（plexiform lesion）——の発生抑制と正常への回復が求められる。申請者らはこれまで、慢性低酸素暴露肺高血圧ラットおよびモノクロタリン誘起肺高血圧ラットを用いて、肺高血圧血管病変の発生抑制効果について、NOSの発現を高める操作が必ずしも、肺高血圧の発症を抑制するわけではないことを報告してきた：NO吸入(Am J Physiol. 272:H517-48,1997; Chest 125, 2247-52,2004)、NO前駆物質L-アルギニン(Circulation 96:689-97, 1997)、ANP遺伝子導入(J Thorac Cardiovasc Surg 136:142-9, 2008)、eNOS活性を高める薬としてレチノイン酸((Circ J 74:1696-703,2010))、トロンボモジュリン(J Anesth. 28:26-33, 2014)、炎症反応に介在する転写因子 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の拮抗薬である pyrrolidine dithiocarbamate (Chest 132; 1265-74, 2007)、iNOS阻害薬(Lung 185; 303-8,2007)。つまり、NOSに依存しないNO生成を高めることも必要である。

肺高血圧実験モデルの限界として、モノクロタリンモデルや慢性低酸素曝露モデルにおける肺高血圧血管病変は、上述の①、②の変化に止まり、人の肺高血圧で発生する③のような内膜病変（血管内腔の内膜増殖による狭窄・閉塞や、さらに進行した線維性狭窄・閉塞）が発生しない。最近、新しい肺高血圧モデルとして、血管内皮増殖因子の阻害薬（Sugen）を1回投与した後、3週間の低酸素曝露を行い再び大気下にもどすと内膜病変を伴う肺高血圧が発生することが発見された（Sugenモデル）。つまり、Sugenモデルは、重症の肺高血圧血管病変——肺血管内膜の細胞性・線維性増殖を起すモデルである。申請者らは、すでに同モデルを確立している（Circulation 128:A14611(2013)。この病変発生に対して、NO-cGMP系の腑活化が抑制効果を示すかは未解決である（動物モデルが無かったので検討されていない）。

体内でNOは、一酸化窒素合成酵素（NOS）により、酸素とBH<sub>4</sub>存在下にL-アルギニンがL-シトルリンになる際に発生する。つまり、酸素の存在が必要である。言い換えると虚血状態では、L-アルギニンとNOSがあってもNOの産生が低下する。一方、NOSに依存しない、硝酸—亜硝酸—NO系による。

## 2. 研究の目的

吸入NO(一酸化窒素)や体内で産生されたNOは、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>となり腎から排泄さ

れる。一方最近、体内で、 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  へとリサイクルされ、 $\text{NO}$  が再生する反応の役割が注目されている。体内で L アルギニン由来の  $\text{NO}$  産生が低下した病態では、体外から硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) や亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) を投与し、NOS (一酸化窒素合成酵素) に依存しない  $\text{NO}$  産生を高めると、肺高血圧のような、血管内皮の NOS 機能が低下している病態の新規治療や栄養管理となり得る。本課題では、硝酸-亜硝酸- $\text{NO}$  系による、肺高血圧発症抑制効果を調べるため、実験的慢性低酸素誘起肺高血圧ラットに硝酸イオン水・亜硝酸イオン水を経口投与し、①硝酸、亜硝酸の体内動態と  $\text{NO}$  生成 (リサイクルされた  $\text{NO}$ ) を調べ、②肺高血圧と肺動脈血管病変の発生・進展に対する抑制効果を明らかにし、③血管内膜の細胞性・線維性増殖への影響を調べる。

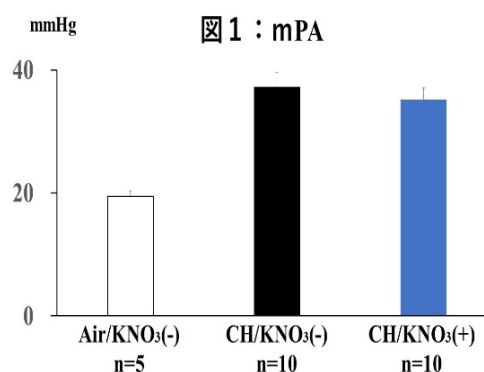
### 3. 研究の方法

6 週齢 SD ラット 30 匹注文し、(1) Air/ $\text{KNO}_3(-)$ 群(n=5) : room air で 14 日間飼育 + 生食投与、(2) CH/ $\text{KNO}_3(-)$ 群(n=10) : 低酸素暴露で 14 日間飼育 + 生食投与、(3) CH/ $\text{KNO}_3(+)$ 群(n=10) : 低酸素暴露で 14 日間飼育 +  $\text{KNO}_3$  投与、3 群に分けた。低酸素暴露前 2 日から  $\text{KNO}_3$  を 90mM/L で水に溶かして、給水瓶で飲ませた。実験的肺高血圧ラット (慢性低酸素暴露肺高血圧ラット) を用いて、硝酸イオン水・亜硝酸イオン水を経口投与を行った。

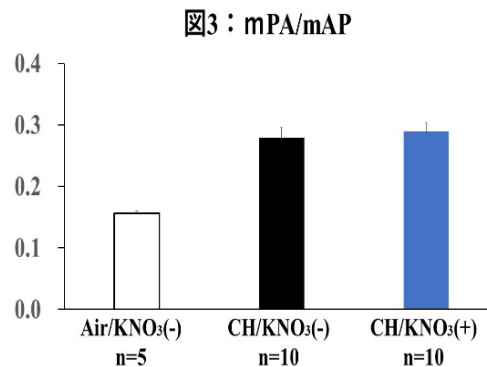
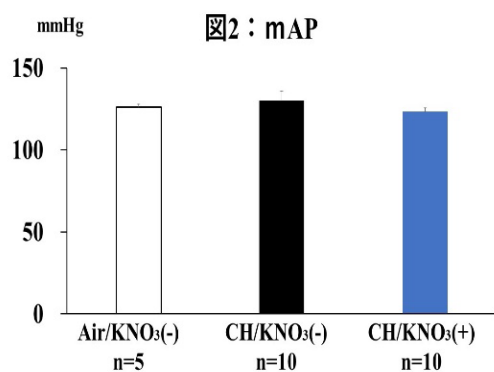
慢性低酸素暴露 14 日目で、ソムノペンチル 45mg/Kg 腹内注射麻酔下で、右頸動脈に動脈カテーテルを挿入し、右頸静脈に肺動脈カテーテル (内径 0.31mm、外径 0.64mm) を挿入した。次の日、ラット覚醒下で動脈圧と肺動脈圧 (AP 620G, Nihon Kohden, Japan) を測定し、開胸して、右心室を切り、肺動脈にチューブを挿入し、70mmHg の圧でバリウムを注入し、10%ホルマリンに 3 日間固定し、スライドを作製し、右心室肥大と血管組織変化について調べる。

### 4. 研究成果

(1) 平均肺動脈圧 (mPA) (図 1) : Air/ $\text{KNO}_3(-)$  群の平均肺動脈血圧は  $19.4 \pm 0.9$ mmHg に比べて、CH/ $\text{KNO}_3(-)$  群で  $37 \pm 2.5$ mmHg、有意に上昇したが、 $\text{KNO}_3$  の投与により CH/ $\text{KNO}_3(+)$  群で  $35 \pm 1.9$ mmHg、明らかに抑制されなかった。

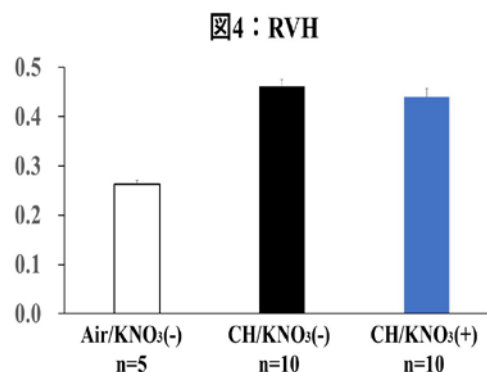


(2) 平均動脈血圧 (mAP) (図2) : 平均動脈血圧は Air/KNO<sub>3</sub>(-)群、CH/KNO<sub>3</sub>(-)群と CH/KNO<sub>3</sub>(+)群の3群間に有意差認められなかった。



(3) 平均肺動脈血圧/平均動脈血圧 (mPA/mAP) (図3) : Air/KNO<sub>3</sub>(-)群の平均肺動脈血圧と平均動脈の比は  $0.16 \pm 0.01$  に比べて、CH/KNO<sub>3</sub>(-)群で  $0.28 \pm 0.02$ , 有意に上昇したが、KNO<sub>3</sub> の投与により CH/KNO<sub>3</sub>(+)群で  $0.29 \pm 0.02$ , 明らかに抑制されなかった。

(4) 右心室肥大 (RVH) (図4) : Air/KNO<sub>3</sub>(-)群の右心室肥大  $0.26 \pm 0.01$  に比べて、CH/KNO<sub>3</sub>(-)群で  $0.46 \pm 0.02$ , 有意に上昇したが、KNO<sub>3</sub> の投与により CH/KNO<sub>3</sub>(+)群で  $0.44 \pm 0.02$ , 明らかに抑制されなかった。



(5) 体重の変化 : KNO<sub>3</sub> 投与群と非投与群の間に経時的に体重の変化は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 2 件)

- (1). Enokiya T, Zhang E, Ikemura K, Muraki Y, Iwashita Y, Iwamoto T, Imai H, Maruyama K, Okuda M. Effect of lipid emulsion infusion on paliperidone pharmacokinetics in the acute overdose rat model: A potential emergency treatment for paliperidone intoxication. *Eur J Pharm Sci.* 2017 Nov 15;109:217-222.
- (2). Sasagawa S, Nishimura Y, Sawada H, Zhang E, Okabe S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Mitani Y, Maruyama K, Tanaka T. Comparative

Transcriptome Analysis Identifies CCDC80 as a Novel Gene Associated with Pulmonary Arterial Hypertension. Front Pharmacol. 2016 Jun 7;7:142.

(学会発表) (計 2 件)

- (1) 張尔泉、鈴木都月、丸山淳子、横地歩、澤田博文、丸山一男. 慢性低酸素誘起肺高血圧症に対するアロプリノールによる発症抑制. 麻酔 (2017) Vol.66 P.67. (抄録) 第 66 回日本麻酔科学会 (神戸)
- (2) 張尔泉、王碩林、丸山淳子、横地歩、澤田博文、丸山一男. モノクロタリン誘起肺高血圧症に対するフェブキシソスタットによる発症抑制効果. 麻酔 (2016) Vol.65 P.56. (抄録) 第 66 回日本麻酔科学会 (福岡)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：丸山 一男

ローマ字氏名：(Maruyama Kazuo)

所属研究機関名：三重大学

部局名：大学院 医学系研究科 麻酔集中治療学

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：20181828

研究分担者氏名：澤田 博文

ローマ字氏名：(Sawada Hirohumi)

所属研究機関名：三重大学

部局名：大学院 医学系研究科 麻酔集中治療学

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：30362354

研究分担者氏名：丸山 淳子

ローマ字氏名：(Maruyama Junko)

所属研究機関名：鈴鹿医療科学大学

部局名：医用工学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50263017