

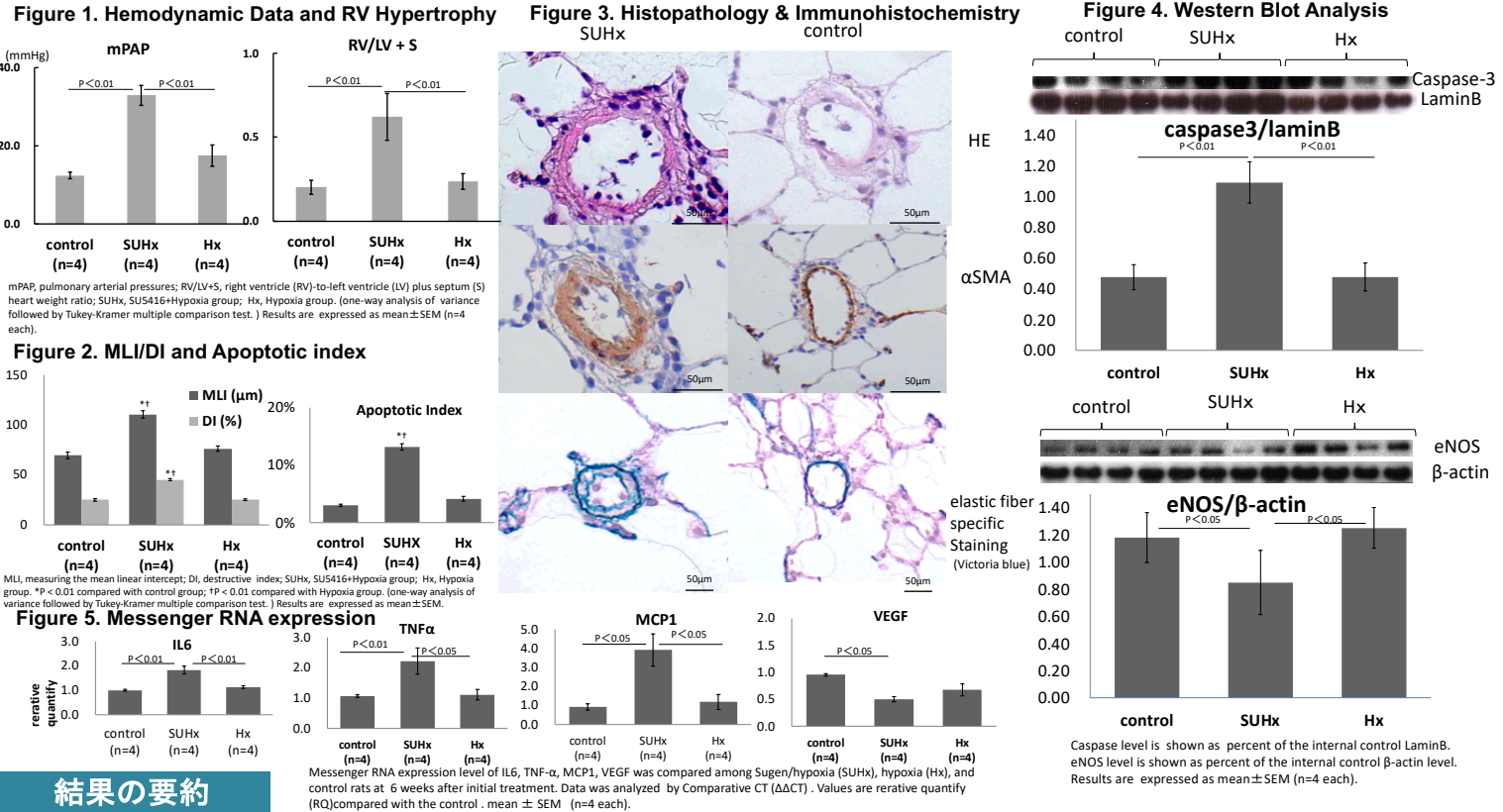
背景

- 呼吸器疾患に伴う肺高血圧(pulmonary hypertension; PH)はニース分類の第3群に分類され(PH-lung, WHO group 3) その合併は予後不良因子である[*Eur Respir J* 2012;39:945-955]。
- 過去の報告では血管内皮成長因子阻害薬(vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor blocker)であるSu5416はラット肺において肺気腫を生じることが報告され[*J Clin Invest* 2000;111:1311-1319]、一方でSu5416が低酸素ラットモデルにおいて第1群の肺動脈性肺高血圧症に類似したPHを惹起することが示されている[*Circulation* 2010;121(25):2747-2754]。
- 本研究の目的はSu5416/低酸素曝露により肺気腫を伴う肺高血圧ラットモデルを確立することである。

方法

- 使用動物**  
雄 Sprague-Dawley ラット (n=12, 4wk ; Charles River laboratories, Yokohama, Inc.) をコントロール、低酸素曝露 (Hx)、Su5416+低酸素曝露 (SUHx) の3群に分けた。ラットにSu5416(20mg/kg)を皮下注射 (day 1, 8 and 15)、低酸素下に飼育した。(15%、6週間) 初回のSu5416皮下注射から6週後に血行動態測定、及び解剖を行った。全ラットが血行動態測定、解剖時まで生存していた。
- 血行動態測定**  
ラットはベントバルビタールで麻酔、気管切開、挿管し常酸素下で血行動態を測定した。開胸後、23G留置針を用いて右室からポリビニルカテーテルを挿入し、Power Labにて右室圧と肺動脈圧をモニタ、記録した。解剖時、右室/左室+中隔比 (RV/LV+septum)を計測した。
- Western Blot**  
肺の細胞質蛋白におけるeNOS/β-actinの発現、核蛋白における cleaved Caspase-3 / LaminB の発現についてそれぞれ検討した。
- 病理組織、免疫染色**  
左肺に0.5%アガロースを25cmH<sub>2</sub>O 下に注入し、10%ホルマリンで48時間固定した。パラフィン包埋し、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色、弾性繊維染色を行った。免疫染色は α-smooth muscle actin (α SMA, Abcam), cleaved Caspase-3 (Cell Signaling Technology)を使用した。気腫の開大についてmean linear intercept (MLI)、determining the destructive index (DI)を測定した。アポトーシスの指標として、Apoptotic Index (AI)を計算した。(1検体当たり10視野ずつ撮影し(×400)、cleaved Caspase-3 陽性核を計測し割合を算出した。)
- Real-time RT-PCR 解析**  
Total RNA を肺組織から NucleoSpin® RNA Plus(Qiagen)を用いて抽出した。real-time PCR の定量を StepOne Real Time PCR System を用いた。TaqMan® Gene Expression Assays はすべてデザイン済のプローブを用いた。18srRNA を内在性コントロールとした。

結果



結果の要約

- 血行動態測定**  
SUHx ラットは有意な平均肺動脈圧の上昇 (33 ± 12 mmHg vs. 16 ± 8 mmHg, P < 0.01) 及び右室/左室+中隔比の増加 (0.71 ± 0.05 vs. 0.20 ± 0.06, P < 0.01)を認めた。
- 病理組織、免疫染色**  
SUHx ラット肺は有意な気腫の開大を認め、Apoptotic Indexは高値であった。肺動脈病変は主に中膜平滑筋層の肥厚(Heath-Edwards分類 I 度)が観察された。group 1 PHにおいて特徴的である叢状病変は認められなかった。
- Western Blot**  
SUHx ラット肺のcleaved-caspase3の蛋白発現は有意に亢進していた。一方でeNOSの蛋白発現は低下していた。
- Real-time RT-PCR 解析**  
複数の炎症性サイトカイン(IL6, TNFα, MCP1)の遺伝子発現が亢進していた。一方でVEGFの遺伝子発現はcontrol群と比較して低値であった。

討論

- Su5416はラット肺に気腫を形成し、caspase3の発現が亢進していることが報告されており本動物モデルでも同様であった。[*J Clin Invest* 2000;111:1311-1319]。
- 慢性低酸素曝露下(O<sub>2</sub>15%, 6週間)においてSu5416ラットはアポトーシスを伴う肺気腫形成と、軽度の肺高血圧所見を呈した。叢状病変を伴わない点はヒトの第3群 PH病理所見に類似していた。
- 本研究でみられたeNOS蛋白の発現低下、VEGF遺伝子発現の低下によって肺組織のアポトーシスが惹起されたと考えられた。

結論

- ラットにおけるVEGF受容体の阻害は肺高血圧と肺気腫形成に関与する。
- 本動物モデルが第3群PH動物モデルとして確立できるよう、更なる検討を進めたい。