



# Reduced Hypoxic Pulmonary Vascular Remodeling by Nitric Oxide from the Endothelium

尾崎, 正憲

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2203

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002203>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【72】

氏 名・(本 籍) 尾崎 正憲 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博い第1310号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成13年3月31日

【学位論文題目】

**Reduced Hypoxic Pulmonary Vascular Remodeling by Nitric Oxide from the Endothelium**

(慢性低酸素曝露性肺血管再構築の血管内皮由来一酸化窒素(NO)による抑制)

審 査 委 員

主査 教授 横山 光宏

教授 中村 肇 教授 八木 直人

教授 中村 俊一

## [緒言]

肺高血圧症は、肺動脈圧の上昇と肺血流量の増加などによって引き起こされる肺血管再構築、さらに機械的ストレスの増加によってもたらされる右室肥大によって特徴づけられ、その多くが慢性閉塞性肺疾患や心不全の末期において出現し、予後を規定する重要な病態である。病因については未だ不明であるが、低酸素はそれ自身が肺血管の攣縮を生じ、肺動脈圧を上昇させ、肺血管平滑筋細胞の増殖・肥大ならびにコラーゲンやエラスチンなどの細胞外基質の産生を促し、肺血管再構築を生じる。さらに、血管内皮から産生される多くの血管作動性物質は、血管の収縮弛緩反応のみならず、細胞増殖を促進あるいは抑制する作用を合わせ持ち、これら物質の肺血管床に対する作用の不均衡が肺血管再構築に大きな影響を及ぼす。

内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)から産生される一酸化窒素(NO)は、強力な血管拡張作用を有し肺血管トーンスの制御に重要な役割を果たしている。しかし、慢性的な内因性 eNOS 由来 NO の過剰産生が肺血管構造や肺高血圧症に及ぼす影響については不明である。

我々の研究室において作成した eNOS 過剰発現マウスは、血管内皮においてその発現の増加を認め、直接的な血管拡張作用により体血圧の低下を示す。また、肺における eNOS の発現および活性の著明な増加を認めており、今回我々は、慢性的な血管内皮由来 NO 過剰産生が肺高血圧症に及ぼす影響を慢性低酸素曝露性肺高血圧モデルを用いて検討した。

## [方法]

eNOS 過剰発現マウスとその同胞の野生型マウスを用い、正酸素(室内気)または 10%低酸素を 3 週間曝露した。また、内因性 NOS を阻害する目的で N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を両群に飲水投与させ、各酸素下で 3 週間飼育した。3 週間後、肺の eNOS 蛋白発現と NOS 活性をそれぞれ、Western blot 法及び [<sup>3</sup>H]-L-arginine から [<sup>3</sup>H]-L-citrulline への変換反応により測定し、肺内 cyclicGMP (cGMP) レベルと血中・肺組織中のエンドセリン-1

(ET-1)レベルを Enzyme Immunoassay を用いて測定した。血行動態の評価は、観血的に体血圧・心拍数をモニターし、同時に肺動脈圧の指標として右室収縮期圧を麻酔下開胸下に右室を直接穿刺し測定した。経気道的に肺を灌流固定した後、肺の凍結切片を作製し、ヒト  $\alpha$ -smooth muscle actin とマウス誘導型 NOS (iNOS) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。肺血管再構築の評価は、元来平滑筋を伴わない肺胞・肺胞管レベルでの末梢肺動脈の筋性化率と筋性化動脈の中膜肥厚度を定量的に測定した。

### 〔結果〕

正酸素下での肺における eNOS 蛋白レベルは、野生型マウスに比し eNOS 過剰発現マウスにおいて著明な増加がみられ、低酸素曝露により両群ともに軽度増加した。同様に、NOS 活性、cGMP レベルも eNOS 過剰発現マウスにおいて野生型マウスに比し著明に増加していたが、低酸素曝露による有意な変化は両群ともに認めなかった。一方、iNOS の発現は免疫染色では認められず、 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性 NOS 活性も低値であった。

右室収縮期圧は、正酸素下で両群ともに約 23mmHg と差を認めなかった。慢性低酸素曝露により野生型マウスの右室収縮期圧は約 10mmHg 上昇したのに対し、eNOS 過剰発現マウスでは約 4mmHg の上昇に過ぎず、有意に肺高血圧は抑制された。一方、L-NAME を投与した二群では、正酸素・低酸素下ともに右室収縮期圧は 40mmHg 以上に上昇し、両群間の圧較差は消失した。さらに、肺動脈圧の上昇に起因して生じる右室肥大を右室/体重比と右室/(左室+心室中隔)比により評価したところ、慢性低酸素曝露による右室肥大の進行も eNOS 過剰発現マウスにおいて有意に抑制された。

組織学的に肺血管再構築の評価を行った。正酸素下では両群ともに 80 $\mu\text{m}$  以下の肺動脈の 8 割以上が非筋性血管で占められており、二群間に差は認めなかった。慢性低酸素曝露により筋性化血管の出現は著明に増加したが、eNOS 過剰発現マウスでの出現率は野生型マウスに比し有意に抑制された。一方、L-NAME 投与により両群

ともに末梢肺動脈の筋性化はさらに促進されたが、二群間における筋性化血管出現率に差は認められなかった。次に、筋性化動脈における中膜肥厚の程度を 80um 以下、80-150um、150um 以上の各血管径毎に比較検討した。慢性低酸素曝露により両群ともに筋性化動脈の中膜は、1.5 倍から 2 倍に肥厚したが、eNOS 過剰発現マウスでは 80um 以下の筋性動脈において有意に肥厚の程度は抑制された。L-NAME を投与した二群では、L-NAME 非投与群に比しさらに中膜肥厚は促進されたが、末梢肺動脈筋性化率と同様に二群間での差は消失した。

肺高血圧症の病態の発症・進展に、血管作動性物質、特に ET-1 の産生増加が関与していることが報告されているため、血中ならびに肺組織中 ET-1 レベルを測定した。正酸素下では両群間に血中・肺の ET-1 レベルに差を認めず、慢性低酸素曝露により両群ともに血中・肺 ET-1 レベルは増加したが、その程度に差は認めなかった。

#### [考察]

慢性的な低酸素曝露性肺高血圧症の病態では肺動脈の攣縮、肺動脈圧の上昇に引き続いて、肺血管の非可逆的な再構築が生じ肺高血圧症の病態の悪化につながる。これまでに、慢性的な内因性 NO の過剰産生が肺高血圧症に対して及ぼす影響について検討した報告はなく、本研究では eNOS 過剰発現マウスにおいて内因性 NO の過剰産生が、低酸素性肺高血圧、特に肺血管再構築にどのような影響を及ぼすかを検討した。

肺動脈圧の指標である右室収縮期圧は、野生型マウスでは慢性低酸素曝露により著明に上昇したが、この上昇は eNOS 過剰発現マウスで有意に抑制され、L-NAME の投与によって両群の圧較差は消失した。肺における eNOS の発現・NOS 活性・cGMP レベルは何れも eNOS 過剰発現マウスにおいて著明に増加しており、この eNOS 過剰発現マウスにおける降圧作用は eNOS 由来の NO による cGMP を介した血管平滑筋弛緩作用が重要な役割を果たしている

と考えられた。

慢性低酸素曝露性肺高血圧症では、末梢肺動脈での傍細胞の血管平滑筋への分化、血管平滑筋細胞の増殖・肥大と細胞外基質の増生を特徴とした非可逆的な血管再構築を生じる。eNOS 過剰発現マウスは野生型マウスに比し、これらの肺血管再構築は有意に抑制され、L-NAME の投与によって両群間の組織変化の差は消失した。NO の血管平滑筋細胞に対する増殖抑制作用がその機序として重要であるが、eNOS 由来 NO の直接的あるいは cGMP を介した増殖抑制効果が挙げられる。さらに、肺高血圧症では、肺動脈圧の上昇によって増加した血管内圧や shear stress が、血管平滑筋細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の流入や増殖に関連した遺伝子発現を刺激するとされており、eNOS 過剰発現マウスではこの機械的ストレスが減少していたことも、肺血管再構築の抑制につながったものと考えられる。

一方、肺高血圧症の病態に関わる血管作動性物質として ET-1 は、強力な血管収縮作用・血管平滑筋細胞の増殖促進作用を有し、NO と拮抗的に作用することが報告されているため、我々は eNOS 過剰発現マウスにおける ET-1 の関与について検討した。しかし、慢性低酸素下における血中・肺組織中 ET-1 レベルは両群間で有意差はなく、NO の血管病変抑制作用に ET-1 の関与は否定的であった。

本研究では、eNOS 由来 NO の過剰産生により、慢性低酸素性曝露性肺高血圧症（肺動脈圧の上昇・肺血管再構築の抑制・右室肥大）の抑制が実証された。今後、eNOS 発現の増加あるいは内因性 NO の産生増加を目指した治療が肺高血圧治療の有効な手段と成り得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1311 号	氏 名	尾崎 正憲
論文題目	Reduced Hypoxic Pulmonary Vascular Remodeling by Nitric Oxide from the Endothelium 慢性低酸素曝露性肺血管再構築の血管内皮由来 一酸化窒素(NO)による抑制		
審査委員	主 査 横山 光宏 副 査 中村 肇 副 査 八木 直人 副 査 中村 俊一		
審査終了日	平成 12 年 11 月 29 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

肺高血圧症は、肺動脈圧の上昇と肺血流量の増加などによって引き起こされる肺血管再構築、さらに機械的ストレスの増加によってもたらされる右室肥大によって特徴づけられ、その多くが慢性閉塞性肺疾患や心不全の末期に出現し、予後を規定する重要な病態である。病因については未だ不明であるが、低酸素はそれ自身が肺血管の攣縮を生じ、肺動脈圧を上昇させ、肺血管平滑筋細胞の増殖・肥大ならびにコラーゲンやエラスチンなどの細胞外基質の産生を促し、肺血管再構築を生じる。さらに、血管内皮から産生される多くの血管作動物質は、血管の収縮弛緩反応のみならず、細胞増殖を促進あるいは抑制する作用を合わせ持ち、これら物質の肺血管床に対する作用の不均衡が肺血管再構築に大きな影響を及ぼす。

内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)によって産生される一酸化窒素(NO)は、強力な血管拡張作用を有し肺血管トーンスの制御に重要な役割を果たしている。しかし、慢性的な内因性eNOS由来NOの過剰産生が肺血管構造や肺高血圧症に及ぼす影響については不明である。

我々の研究室において作成したeNOS過剰発現マウスは、血管内皮においてその発現の増加を認め、直接的な血管拡張作用により体血圧の低下を示す。また、肺におけるeNOSの発現および活性の著明な増加を認めており、我々は、今回慢性的な血管内皮由来NO過剰産生が肺高血圧症に及ぼす影響を慢性低酸素曝露性肺高血圧モデルを用いて検討した。血行動態の評価は、観血的に体血圧・心拍数をモニターし、同時に肺動脈圧の指標として右室収縮期圧を麻酔開胸下に右室を直接穿刺し測定した。経気道的に肺を灌流固定した後、肺の凍結切片を作製し、ヒト $\alpha$ -smooth muscle actinとマウス誘導型NOS (iNOS)に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

以下の研究結果が得られた。

1. 正酸素下での肺におけるeNOS蛋白レベルは、野生型マウスに比しeNOS過剰発現マウスにおいて著明な増加がみられ、低酸素(10%酸素)3週間曝露により両群ともに軽度増加した。同様に、NOS活性、cGMPレベルもeNOS過剰発現マウスにおいて野生型マウスに比し著明に増加していたが、低酸素曝露による有意な変化は両群とも

に認めなかった。一方、iNOSの発現は免疫染色では認められず、 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性NOS活性も低値であった。

2. 右室収縮期圧は、正酸素下で両群ともに約23mmHgで差を認めなかった。慢性低酸素曝露により野生型マウスの右室収縮期圧は約10mmHg上昇したのに対し、eNOS過剰発現マウスでは約4mmHgの上昇に過ぎず、有意に肺高血圧は抑制された。一方、NOS阻害剤 $\text{N}^{\text{w}}$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を3週間投与した二群では、正酸素・低酸素下ともに右室収縮期圧は40mmHg以上に上昇し、両群間の圧較差は消失した。さらに、肺動脈圧の上昇に起因して生じる右室肥大を右室/体重比と右室/(左室+心室中隔)比により評価したところ、慢性低酸素曝露による右室肥大の進行もeNOS過剰発現マウスにおいて有意に抑制された。

3. 組織学的に肺血管再構築の評価を行った。正酸素下では両群ともに80 $\mu\text{m}$ 以下の肺動脈の8割以上が非筋性血管であり、二群間に差は認めなかった。慢性低酸素曝露により筋性化血管の出現は著明に増加したが、eNOS過剰発現マウスでの出現率は野生型マウスに比し有意に抑制された。一方、L-NAME投与により両群ともに末梢肺動脈の筋性化はさらに促進されたが、二群間における筋性化血管出現率に差は認められなかった。次に、筋性化動脈における中膜肥厚の程度を80 $\mu\text{m}$ 以下、80-150 $\mu\text{m}$ 、150 $\mu\text{m}$ 以上の各血管径毎に比較検討した。慢性低酸素曝露により両群ともに筋性化動脈の中膜は、1.5倍から2倍に肥厚したが、eNOS過剰発現マウスでは80 $\mu\text{m}$ 以下の筋性動脈において有意に肥厚の程度は抑制された。L-NAMEを投与した二群では、L-NAME非投与群に比しさらに中膜肥厚は促進され二群間での差は消失した。

4. 肺高血圧症の病態の発症・進展に、血管作動性物質、特にエンドセリン (ET-1) の産生増加の関与していることが報告されているため、血中ならびに肺組織中ET-1レベルを測定した。正酸素下では両群間に血中・肺のET-1レベルに差を認めず、慢性低酸素曝露により両群ともに血中・肺ET-1レベルは増加したが、その程度に差は認めなかった。

本研究はeNOS過剰発現マウスを用いて内因性NOの過剰産生が、慢性低酸素性肺高

血圧にどのような影響を及ぼすかを検討したものであるが、従来ほとんど行われなかった慢性低酸素性肺高血圧で認められる肺動脈圧の上昇、肺血管再構築および右室肥大が内因性NO過剰産生によって抑制されるという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。