

< Editorial Comment >

トランスレーショナルリサーチとゲノム医学の時代の肺高血圧モデル研究

三重大学小児科 三谷 義英

小垣論文<sup>1)</sup>は、従来比較的困難であった肺血流増加のみでラットにおいて肺高血圧と血管病変を誘発するシステムを構築し、さらに ACE がそれらの変化に必須である事を示した。小児循環器医が日常診療で問題と考える病態を再現するモデル作成の試みは、想定する生体因子が病変形成に必須であることの証明を可能にし、治療ターゲットを同定する上で重要なアプローチである。実際その系を新たに確立し、病態形成に必須な因子として ACE を薬理的に証明し得た事は意義深い。本 Editorial Comment では、肺高血圧モデル作成の経緯、最近の話題と動物モデル作成の小児肺血管医学研究における今日的意義につき述べる。

**肺高血圧モデル作成の試み：低酸素、モノクロタリン、肺血流増加、やせ薬**

慢性低酸素 (hypobaric hypoxia) 暴露肺高血圧モデル<sup>2)</sup>は、そもそも高所 (high altitude) で見られるヒトないし動物の肺高血圧のモデルであるが、慢性肺疾患に伴う肺高血圧にも類似する。低酸素性肺動脈収縮が比較的種に関わらず認められるのに対し、肺血管病変を伴う慢性肺高血圧には種差があり、ブタないし牛で強く誘発され、犬ないし羊ではあまり誘発されない。ラット、マウスでは圧上昇、血管病変共に強く誘発され、安価、手軽であり血行動態の評価も可能である為、肺高血圧モデルとして繁用される。ラットでは通常 380 mmHg の hypobaric な負荷 (10 日~3 週間) が一般的で、これは 5500 m の高地在住に相当する<sup>3)</sup>。近年遺伝子改造マウスが肺高血圧研究に多用され、低酸素暴露肺高血圧モデルのマウス化も一つの流れと言える。

モノクロタリン<sup>3)</sup>は、*Crotalaria spectabilis* と呼ばれるマメ科の植物の種に見られる pyrrolizidine alkaloid で、ラットで一回皮下注 (60 mg/kg) により 8 日頃から有意な血管病変が圧上昇に先だって出現し、以後 14 日までに有意な肺高血圧がみられる。投与後早期には、内皮障害に伴う血管透過性亢進、内弾性板の断裂が見られ、遅れて出現する血管病変、圧上昇と伴にマクロファージ、マスト細胞の浸潤が見られる。経過は進行性で、3~4 週から心不全を伴い自然死する。モノクロタリンの効果に種差があり、マウス、うさぎ、ハムスターなど他の動物は抵抗性で、これはモノクロタリンは肝で活性型に変化した後に効果があり、その酵素がラット以外では弱い事が原因と推測されている。早期の内皮障害/内弾性板の断裂、平滑筋の増殖、マクロファージ/マスト細胞の関与、進行性の経過から原発性肺高血圧類似 (HIV 感染ないし膠原病に続発する例も含めた) のモデルと考えられる。

肺血流増加型先天性心疾患に伴う肺高血圧のモデル<sup>2,5)</sup>として、小垣論文<sup>1)</sup>で触れられた様に、これまでブタ、犬などを中心になされた試みとしては、一側肺切除、大腿動静脈短絡、腹部大動脈下大静脈吻合などは、単独では圧上昇、血管病変を誘発することは一般に困難で、大動脈肺動脈短絡でそれらが可能な例が報告される。ラットでも、一側肺切除、大動脈下大静脈吻合単独で圧上昇、血管病変を誘発されず、BT 短絡で圧上昇を認めた報告<sup>6)</sup>はあるが、詳細な末梢肺血管病変は報告されておらず、また手技的にも熟練を要する。そこで小垣らは一側肺動脈結紮、腹部大動脈下大静脈短絡を併用する事により、圧上昇と血管病変を誘発する事にラットで成功し、今後その定量的解析、機序の解明が期待される。

最近の話題として、内臓肥厚モデルとやせ薬のモデルがあげられる。従来試みられた肺高血圧動物モデルでは、肺血管病変は中膜肥厚、肺小動脈の筋性化であり、臨床的に重要な内臓肥厚は伴わず Heath and Edwards 分類 I 度の病変と考えられる。Botney ら<sup>6)</sup>は、肺動脈の内臓病変は、原発性肺高血圧の内臓病変ないし高度肺高血圧例での動脈硬化性病変 (frank atherosclerosis) として見られる事から、肺動脈の内臓病変誘発には内皮障害に加え体循環血流が重要と考え、モノクロタリン投与による内皮障害に片肺切除ないし BT 短絡を追加し、肺動脈の内臓肥厚を伴う肺高血圧モデルの作成した。今後の内臓病変を伴う肺高血圧モデルとして注目される。

原発性肺高血圧発症の疫学的危険因子の中で最も重要であるやせ薬に関し、古くは 1960 年代後半にヨーロッパで問題となった aminorex、最近では 1990 年代に欧米で問題となった dexfenfluramine が、'原発性'肺高血圧

の頻度を 20~30 倍増加すると報告された<sup>2\*)</sup>。これまで、いくつかの種の動物でそれらの投与ないし慢性低酸素暴露併用で肺高血圧作成の試みがなされたが、不成功であり、原発性肺高血圧は 1 例/100 万人/年と稀であるため、臨床的には何らかの遺伝素因の関与が疑われた。そこで我々は、モノクロタリン投与モデルに dexfenfluramin を投与すると、逆に肺高血圧が抑制される事を見出した<sup>7)</sup>。さらにラットで dexfenfluramin はカリウムチャネル抑制、エラスターゼ活性化<sup>7)</sup>など肺高血圧増悪因子を促す事が知られ、同時に何らかのラットでの抑制機構の存在が推測され、その欠損がヒトで肺高血圧発症の誘因となる可能性が想定された。最近、家族性ないし散発性原発性肺高血圧の原因の一つに TGF beta superfamily に属する bone morphogenetic protein 受容体 2 型 (BMPR 2) の mutations が報告された<sup>8\*)</sup>。BMPR 2 を介する系は細胞増殖抑制系と考えられ、やせ薬投与ラットモデルで存在が疑われた肺高血圧抑制系の可能性があり現在検討している。

### 動物モデル研究の今日的意義

ヒトにおける病態を解析しそれに基づく治療法を考えるにあたり、ヒトで得られた observational なデータないし個々の因子の関連 (association) を示唆する生化学/薬理学/病理学的データに基づき、動物モデルの作成と遺伝子発現の解析が行われる。さらに個体/臓器への遺伝子導入実験ないし分子細胞生物学的実験を行い、個々の事象/遺伝子発現の cause-effect を個体/細胞レベルで知る事ができる (図 1A)。またエンドセリン拮抗剤、プロスタサイクリンの様に動物モデルでの知見に基づき臨床応用される事もある。しかし現在の肺高血圧モデル研究の問題点は、1 つは小垣論文<sup>1)</sup>の指摘する様に肺高血圧研究にあたり我々小児循環器臨床医の臨床現場でのニーズを十分満足するものではない事である。そう言う意味で小垣らの試みの様に、関心疾患を simulate する動物モデル作成は、益々重要となると考えられる。第 2 点は、動物モデルの解析がヒトの疾患の理解にどの程度意味を持つかは古くからの重要な課題であり、この点以下の最近の動向は興味深い。

2000 年秋以後の話題として、先に述べた PPH 原因遺伝子の一つとして BMPR 2 の mutations の発見が挙げられ<sup>8\*)</sup>、肺高血圧の病態研究が数段階進みつつあると同時にさらなる疑問を問いかけた。原因遺伝子 (の一つ) の発見は、遺伝子診断ひいては予防医学、個別化医療と遺伝子治療の可能性を開くと言われる (図 1C)。「Genotype と PPH の phenotype を結ぶ」病態の解明はこの領域に投げかけられた血管生物学的課題であり、これに基づき、簡易な発症前診断法、遺伝子/薬物治療ターゲットの同定などが期待される (図 1C)。BMPR 2 は受容体遺伝子であるが、その下流の転写因子として Smad が知られ、またその抑制系として Smad 6 がありこれは shear stress で活性化され<sup>9\*)</sup>、小垣が示した先天性心疾患に伴う肺高血圧と関連があり、今後細胞内シグナル研究が重要となる。また肺高血圧動物モデルで重要な因子を、ヒトの genotype と関連づける方法として、遺伝子多型が重要になる (図 1B)。現在小垣の着目した ACE の遺伝子多型と慢性閉塞性肺疾患合併 PH の関連が報告されており<sup>10)</sup>、低酸素肺高血圧で ACE 阻害剤が有効である所見をヒトに結び付けるものであるが、今後 single nucleotide polymorphism (SNP) などによりその発展が期待される。先天性心疾患に伴う肺高血圧の遺伝素因として Down 症候群は興味深い。2000 年 5 月に第 21 番染色体の塩基配列の決定の報告がなされた<sup>11)</sup>。225 の遺伝子が同定され、Down syndrome critical region 近傍に SOD 1, Ets 2, AML 1 など関連深い遺伝子が示され、Down 症候群の phenotype との関連で着目される。Down 症候群では 21 番染色体上の遺伝子容量が増加 (gene dose effect) する遺伝子も知られ (図 1B)、実際 SOD 1, Ets 2 のトランスジェニックマウスは Down 様 phenotype を示す<sup>12)13)</sup>。これらの遺伝子は先天性心疾患の肺高血圧との関連から興味深く、特に AML 1 は実験的肺高血圧で重要な平滑筋エラスターゼの発現に関連する転写因子で、我々もその細胞内シグナルを検討中である<sup>14)</sup>。小垣らの様な肺血流増加モデルにおいても、遺伝子改造マウスなどを用いて遺伝素因を加味したモデル研究も今後重要と思われる。また最近の話題として血管の発生に必須な因子が発生工学的的方法により明らかとなった事があり、VEGF-Flt 1, Flk 1, Angiopoietins-Tie 2, Ephrin-Eph receptor などが報告された<sup>15)</sup>。小児科で重要な血管の発達も出生後の発育期の PPH、先天性心疾患に伴う肺高血圧を含む肺血管病変形成に関わり得るが、この領域は、今後「発達と病態形成」の面から興味深い。

### 結 語

「トランスレーショナルリサーチとゲノム医学」の時代における肺高血圧モデル研究の動向と今日的意義を述べた。現在の様な生命科学全盛の時代であるからこそ、デジタルデバイドならぬ「バイオ」デバイドは広がる

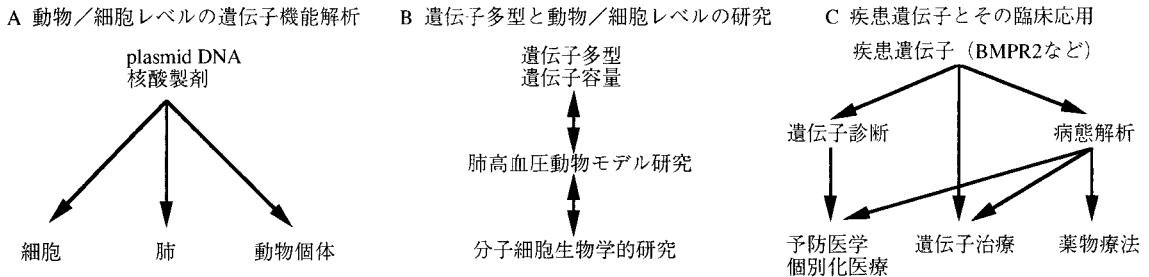


図1 トランスレーショナルリサーチとゲノム医学の時代の肺高血圧モデル研究

ばかりで、この研究領域で臨床医の役割は重要である。実際のアプローチとしてこれまで内因性血管作動物質が特に注目されてきたが、現在のゲノム医学は、疾患遺伝子/遺伝素因、血管の発生/発達、小児期血管病の臨床と基礎研究を結び付ける上で一層重要である事を示唆する。小垣論文は、小児血管医学研究が、臨床の場と同様に老年医学領域とは異なった血管病の側面、ヒトの生物学を明らかにする可能性を考えさせ、小児循環器臨床医にとって、肺循環、特有な血流刺激、疾患の遺伝性、個体の発達が重要な研究領域である事を再認識させる。

## 文 献

- 1) 小垣滋豊, 佐野哲也, 三輪谷隆史, 北 知子, 松下 亨, 岡田伸太郎: 高肺血流による肺高血圧モデルラットの作成: アンジオテンシン変換酵素阻害剤投与の影響. 日本小児循環器学会雑誌, 2001; 17: 29-34
- 2) Reeves JT, Harget J: Experimental models of pulmonary hypertension: Pulmonary hypertension. New York, Futura, 1984, pp 361-392
- 3) Mitani Y, Maruyama K, Sakurai M.: Prolonged administration of L-arginine ameliorates chronic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in rats. Circulation. 1997 Jul 15; 96 (2): 689-97
- 4) Mlczoch J: Drugs and dietary-induced pulmonary hypertension: Pulmonary hypertension. New York, Futura, 1984, pp 341-360
- 5) Rabinovitch M: Mechanisms of pulmonary hypertension in chronic high flow states: Pulmonary vascular physiology and pathophysiology. New York, Marcel Dekker, 1989, pp 469-512
- 6) Botney MD: Role of hemodynamics in pulmonary vascular remodeling: implications for primary pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Feb; 159 (2): 361-364
- 7) Mitani Y, Rabinovitch M et al: Dexfenfluramine induces weight loss but pulmonary hypertension and paradoxically prevents its development following monocrotaline injection in Sprague Dawley rats (in revision)
- 8) Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA: Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. Am J Hum Genet. 2000 Sep; 67 (3): 737-744
- 9) Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, Ward K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Newman J, Wheeler L, Higenbottam T, Gibbs JS, Egan J, Crozier A, Peacock A, Allcock R, Corris P, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC: Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. J Med Genet. 2000 Oct; 37 (10): 741-745
- 10) van Suylen RJ, Wouters EF, Pennings HJ, Cheriex EC, van Pol PE, Ambergen AW, Vermelis AM, Daemen MJ: The DD genotype of the angiotensin converting enzyme gene is negatively associated with right ventricular hypertrophy in male patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jun; 159 (6): 1791-1795
- 11) Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schilhabel M, Schudy A: The DNA sequence of human chromosome 21. The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. Nature. 2000 May 18; 405 (6784): 311-319
- 12) Avraham KB, Schickler M, Sapoznikov D, Yarom R, Groner Y: Down's syndrome: abnormal neuromuscular junc-

- tion in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase. *Cell*. 1988 Sep 9 ; 54 ( 6 ): 823 829
- 13 ) Sumarsono SH, Wilson TJ, Tymms MJ, Venter DJ, Corrick CM, Kola R, Lahoud MH, Papas TS, Seth A, Kola I : Down 's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets 2 transgenic mice. *Nature*. 1996 Feb 8 ; 379 ( 6565 ): 534 537
- 14 ) Mitani Y, Zaidi SH, Dufourcq P, Thompson K, Rabinovitch M : Nitric oxide reduces vascular smooth muscle cell elastase activity through cGMP-mediated suppression of ERK phosphorylation and AML 1 B nuclear partitioning. *FASEB J*. 2000 Apr ; 14 ( 5 ): 805 814
- 15 ) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J : Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000 Sep 14 ; 407 ( 6801 ): 242 248
-