

論文の内容の要旨

論文題目 Diverse Contribution of Bone Marrow-derived Cells to Vascular Remodeling Associated with Pulmonary Arterial Hypertension and Arterial Neointimal Formation

和訳 肺高血圧時の病的に肥厚した肺動脈と、新生内膜の増殖した体血圧系の動脈硬化病変においてそれぞれ認められる血管リモデリングの過程に対する、骨髓由来細胞の関与の相違

指導教員 永井良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

佐原 真

肺高血圧は一般に原発性(特発性)と二次性に分類されるが、二次性肺高血圧に分類される疾患の中には、その病理組織学的特徴や治療への反応性という面において原発性肺高血圧症とよく類似したものが多くあることが知られている。最新の世界保健機関(WHO)による肺高血圧の分類では、発症機序の相似性に基づいて、これらの疾患をまとめて肺動脈性肺高血圧症(Group I)と呼んでいる。この肺動脈性肺高血圧症には、原発性肺高血圧症の他、膠原病関連肺高血圧、先天性心内(左→右)シャントによる肺高血圧、HIV 感染症由來の肺高血圧、および新生児肺高血圧症なども含まれる。肺動脈性肺高血圧症は肺血管抵抗と肺動脈圧の進行性の上昇により、右心不全から死に至らしめる治療不応性の難治疾患である。肺動脈性肺高血圧症の病因は上記の

ように様々であるが、病理組織学的には病初期の肺血管において、持続的な血管収縮、中膜平滑筋細胞の増殖による構造的変化、および血栓像が高率に認められ、これらが誘因となって、広範に及ぶ肺動脈の病的肥厚や肺微小血管の閉塞が生じるものと想定されている。さらに肺動脈性肺高血圧症の最も初期においては、肺血管内皮細胞の傷害およびその機能異常が以後に続く一連の病態の引き金になっている、との有力な仮説も立てられている。

近年の多くの報告によると、骨髓(由来)細胞が様々な組織の傷害後の修復や病的再構築(リモデリング)に関与することが示唆されており、再生医学や新たな治療ターゲットの面から組織幹細胞とともに注目を集めている。血管病に関しても主に体血圧系の動脈において、血管内皮傷害後の内膜修復や、その反対に血管リモデリングによる動脈硬化病変形成に骨髓由来細胞が深く関与する、との研究報告が多數ある。体血圧系の動脈硬化病変に対するこれらの多くの知見とは対照的に、肺高血圧時に病的リモデリングを来たした肺動脈の硬化病変において骨髓由来細胞がどのように関与するか、言い換えば肺循環系に対して骨髓由来細胞が血管内皮保護的(抗動脈効果的)に作用するか、あるいは逆に動脈硬化促進的に作用するかについてはほとんどよくわかっていない。これらを明らかにすることが、依然不明な点が多く残されている肺動脈性肺高血圧症の病態生理の解明や、新たな治療法の開発につながる考え、以下の研究を企画し、遂行した。

骨髓由来細胞による血管リモデリングへの関与を検討するため、最初に骨髓キメララットの作成を行った。致死量(14-15Gy)の放射線を照射された野生型のSprague-Dawleyラットに、GFPトランスジェニックラット(Sprague-Dawley ラット background)から採取した骨髓細胞(5,000万個/匹)を静注して骨髓置換を行い、骨髓由来細胞(血球系細胞など)のみ緑色の蛍光を発するキメララットを用意した。この方法による骨髓置換率は、平均±標準偏差(以下同じ)で $89.0\pm6.8\%$ (range: 72.9–97.7%; n = 35)と高率であった。以後の骨髓キメララットを用いる実験において

は、骨髓置換率が85%以上のもののみ使用した。

これら骨髓キメララットに対して、肺血管内皮を選択的に傷害し、続いて炎症・中膜肥厚を惹起して肺高血圧を引き起こす毒性物質(ピロリジンアルカロイド)の monocrotaline (60 mg/kg)を経腹膜的に投与した(MCT 群)。別の群は最初に片肺部分(右肺の前および中葉)切除術を先行して行い、その1週間後に同量の monocrotaline を投与した(MCT+USP 群)。さらに別の一群は片肺部分切除術のみ施行した(USP 群)。

このように当実験においては、肺高血圧の動物(ラット)モデルとして monocrotaline 誘発性(および肺部分切除誘発性)肺高血圧モデルを選択した。肺高血圧の動物実験用モデルとしては、低酸素誘発性肺高血圧モデルまたは monocrotaline 誘発性肺高血圧モデルが使用されることが多い。高地居住者や慢性閉塞性肺疾患などのような、肺胞低酸素状態が慢性肺高血圧を惹起し得ることはよく知られている。しかしこの低酸素誘発性タイプの肺高血圧は、発症機序として肺血管の収縮が第一義的であり、原発性肺高血圧症を中心とする肺動脈性肺高血圧症とは発症機序において異なる点が多い。実際に先のWHOによる分類でも、低酸素関連肺高血圧症は肺動脈性肺高血圧症とは別に分類されている。また、低酸素誘発性肺高血圧と monocrotaline 誘発性肺高血圧を比較した動物実験では、肺高血圧の進行や肺血管の病的リモデリングの程度において後者の方が著明であったとの報告もある。Monocrotaline は肝で代謝された後、近接する肺循環系に流れ込んで肺血管内皮を傷害し、病的血管リモデリングを誘発して致死的な肺高血圧を引き起こす。肺血管内皮の機能異常が、ヒトにおける肺動脈性肺高血圧症の重要な誘発因子であると考えられていることを考慮すると、病態的に monocrotaline モデルの方が低酸素モデルよりも(ヒトの)肺動脈性肺高血圧症に近いと考えられる。従って、monocrotaline 誘発性肺高血圧モデルを当実験において採用した。またこれらのモデルとは別に肺部分切除術が、残存肺における相対的血流増

加由來の shear stress 増加により肺血管に病的リモデリングを起こし、肺高血圧を誘発することも知られている。最近の研究で、この肺部分切除術と monocrotaline を組み合わせたモデルにおいて、monocrotaline 単独群と比較してより高度な肺高血圧と肺血管の病的リモデリングを認めるとの報告があるため、当実験においてこれらの併用も試みた (MCT+USP 群)。

Monocrotaline 投与から4週間後、経静脈的に挿入したポリエチレンカテーテルにより肺動脈圧の代用となる右室収縮期圧を測定したところ、正常対照群に比し MCT 群、MCT+USP 群とともに著明に上昇しており (正常対照群: 20.4 ± 2.4 mm Hg; MCT 群: 50.1 ± 5.2 mm Hg, $p < 0.01$ vs. 正常対照群; MCT+USP 群: 58.8 ± 5.4 mm Hg, $p < 0.01$ vs. 正常対照群および $p < 0.05$ vs. MCT 群)、それと同時に MCT 群、MCT+USP 群とともに著明な右室肥大を伴っていた。USP (単独) 群においても軽度な肺高血圧が認められた (30.0 ± 3.9 mm Hg, $p < 0.05$ vs. 正常対照群)。特に MCT 群および MCT+USP 群の肺組織標本においては、血管周囲に多數のマクロファージ (GFP 陽性) の浸潤を伴い著明に中膜の肥厚した肺細動脈が認められた。これら二群における、病的リモデリングを来たした肺細動脈の内皮細胞 (CD31 陽性) と中膜平滑筋細胞 (α -SM アクチン陽性) のなかに骨髓由来と考えられる GFP 陽性細胞 (緑色) がどの程度の割合で存在するかを、蛍光二重免疫染色法で調べた。傷害肺細動脈において、CD31 陽性内皮細胞中に占める GFP/CD31 二重陽性内皮細胞の割合は、MCT 群と MCT+USP 群を合わせて $1.5 \pm 0.7\%$ と少なかつたが、 α -SM アクチン陽性中膜平滑筋細胞中に占める GFP/ α -SM アクチン二重陽性平滑筋細胞の割合は二群合わせて $0.11 \pm 0.12\%$ とさらに僅かであった。以上の結果は、これらのラット肺高血圧モデルの病的肺血管床に対して、骨髓由来細胞が流血中を介して定着して、肺細動脈内皮細胞あるいは同中膜平滑筋細胞に形質転換する所見に乏しいことを示唆する。即ち、骨髓由来細胞が病的な肺循環系に対し、血管保護的あるいは動脈硬化促進的に作用する所見のいずれも乏し

いと考えられた。

一方、上述の骨髓キメララットの別の群に対して、上記肺障害(MCT+USP)に加えてその大腿動脈をワイヤーの血管内挿入により機械的に傷害するモデルを作成した。ワイヤー傷害から4週間後、傷害された大腿動脈には新生内膜の増殖による著明な肥厚病変が認められ、病変部の新生内膜や中膜は α -SM アクチン陽性平滑筋細胞で占められた。この機械的傷害大腿動脈の肥厚病変における、 α -SM アクチン陽性平滑筋細胞中に占める GFP/ α -SM アクチン二重陽性平滑筋細胞の割合は $15.4 \pm 10.3\%$ と高率であった ($p < 0.01$ vs. 病的肺細動脈)。即ち、骨髓由来細胞が平滑筋様細胞への形質転換を介して、体血圧系の動脈硬化病変形成に一部関与していることが強く示唆された。

次に上記実験系における放射線照射による影響を排除するためと、老齢なものと比してより広範な可塑性を有するとされる幼若な骨髓細胞を使用する目的で、次の実験を行った。最初に6か月齢の老齢野生型ラットに対して片肺部分切除と monocrotaline (60mg/kg) の経腹膜的投与を施行した。次にこれらのラットを4群に分け、そのうち3群に monocrotaline 投与から 1, 7, 14, 21 日目に、幼若な(4-6週齢) GFP トランスジェニックラット由来の骨髓細胞を 1匹あたり 1,000万、1,000万、1億個をそれぞれ静注した(計4回静注)。残りの1群は骨髓細胞の代わりに同容量の PBS を静注した。Monocrotaline 投与から4週間後、これら4群のいずれにおいても、著明な右室収縮期圧の上昇、右室肥大、および肺細動脈の肥厚が同様に認められた。生存曲線解析では、monocrotaline 投与から6週間後にはどの群も生存率は 20% 以下と不良であり、群間差は認められなかつた。幼若な骨髓細胞を静注された群では、流血中や肺組織においてその静注された骨髓細胞(GFP 陽性)が時々認められたが、病的にリモデリングした肺動脈に定着して、血管内皮細胞や中膜平滑筋細胞に形質転換している所見は(1億個/回、計4回輸注された群においても) 皆無

であった。以上の結果から、放射線非照射の老齢肺高血圧ラットに対して投与された幼若な同種骨髓細胞は、それらラットの不良な肺血行動態や生存率の改善に寄与せず、また肺血管リモデリングにも関与しないことが示された。

上記の異なる実験系から、骨髓由来細胞が体血圧系の動脈硬化病変とは異なり、肺高血圧時の肺血管リモデリングに対して積極的に関与しないことが示唆されたため、この背後にある機序を考察した。肺組織を詳細に観察すると、monocrotaline 投与により、特に径が100 μm 以下の肺細動脈や肺毛細血管において血栓性閉塞が時間経過とともに高頻度に認められた。小肺細動脈における血栓性閉塞は、ヒトの肺動脈性肺高血圧の肺組織像においてもしばしば認められる所見である。また肺組織切片に対しTUNEL染色を施すと、リモデリングした肺細動脈の内皮細胞の一部にアポトーシスを示している所見が、monocrotaline 投与後の時間経過とともに増加して認められた。Monocrotalineによる傷害肺を電子顕微鏡で観察すると、血栓閉塞された肺毛細血管内皮細胞に、典型的なアポトーシス像(核クロマチンの濃縮、核の分断化、細胞質の圧縮等)が認められた。以上のような、アポトーシスを含む肺血管内皮傷害とそれに続く肺微小血管床における広範な血栓性閉塞は、著明な肺血管抵抗の増大を生み、血栓閉塞部より近位の肺細動脈に高度な圧負荷をかけると考えられる。中型の近位肺細動脈にはたとえ直接的な傷害がなくても、末梢からの圧負荷増大に対して中膜の肥厚で反応することが想定される。このような体血圧系の動脈硬化病変とは異なる、肺血管床における病的血管リモデリングの過程が、骨髓由来細胞の各血管リモデリングへの関与の相違を説明するかもしれない。

この研究は次のように結論づけられる。流血中の骨髓由来細胞は、体血圧系の動脈における機械的傷害後の新生内膜増殖には自身も関与するが、monocrotaline と肺部分切除術により誘発される肺高血圧時の肺動脈リモデリングにはほとんど関与しない。このような両血管系のリモデリ

ングに対する骨髓由来細胞の関与の相違は、それぞれの動脈硬化病変形成のプロセスの違いが影響しているようである。