

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20790979

研究課題名(和文) 先天性心疾患に合併する肺高血圧症に対する血管内皮増殖因子と低酸素誘導因子の影響

研究課題名(英文) the effect of vascular endothelial growth factor and hypoxia induced factor-1 to the high flow pulmonary hypertension with congenital heart disease.

研究代表者 徳永 千穂 (TOKUNAGA CHIHÔ)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：30451701

研究成果の概要(和文)：高肺血流性肺血管病変の進行には高肺血流の shear stress による内皮細胞障害の関与が疑われる。肺高血圧症における内皮細胞障害のマーカーである VEGF(血管内皮細胞増殖因子)濃度および高肺血流性肺高血圧ラットにおける高感度放射光微小血管撮影法を用いた肺動脈造影と肺血流 velocity を測定した。術前血清 VEGF 値は疾患群で $157.4 \pm 35.4 \text{ pg/ml}$ であったが、コントロールは $43.0 \pm 22.9 \text{ pg/ml}$ であり有意な上昇を認めた。高肺血流性肺高血圧ラットにおいて肺動脈の velocity は中枢側では $111.5 \pm 23.5 \text{ mm/sec}$ (mean \pm SE)、末梢側では $71.7 \pm 23.2 \text{ mm/sec}$ であったがコントロールは中枢側 $117.0 \pm 13.5 \text{ mm/sec}$ 、末梢側 $9.4 \pm 2.6 \text{ mm/sec}$ であり、高肺血流性肺高血圧ラットでは末梢側の velocity の有意な上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：Congenital heart disease with high pulmonary flow is frequently complicated by the development of irreversible pulmonary hypertension. Endothelial cell injury by increased shear stress may play a key role to induce intimal and medial hypertrophy and increase vascular resistance. We analyzed the plasma VEGF (vascular endothelial growth factor) in patients with pulmonary hypertension. The plasma VEGF level in pulmonary hypertension was significantly increased compared with control ($157.4 \pm 35.4 \text{ pg/ml}$ vs. $43.0 \pm 22.9 \text{ pg/ml}$, mean \pm SE). Also we performed the pulmonary angiography in high flow pulmonary hypertension model rat by using synchrotron radiation micro-angiography (SRMA) to measure the pulmonary flow velocity and shear stress. The velocity of proximal pulmonary artery in pulmonary hypertension rat was $111.5 \pm 23.5 \text{ mm/sec}$ and $111.5 \pm 23.5 \text{ mm/sec}$ in control. Although, the velocity of distal pulmonary artery in pulmonary hypertension rat was significantly increased as $71.7 \pm 23.2 \text{ mm/sec}$ compared with control as $9.4 \pm 2.6 \text{ mm/sec}$. This result suggests that higher pulmonary artery velocity may affect the endothelial cell injury and increase vascular resistance. Further evaluation about endothelial cell injury and VEGF level at the pulmonary tissue will be performed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総 計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：心臓血管外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺高血圧、血管内皮細胞増殖因子、低酸素誘導因子、先天性心疾患

1. 研究開始当初の背景

先天性心疾患に合併する肺高血圧症は体-肺シャントによる増加した肺血流量と shear stress が肺血管抵抗の増加を引き起こすことに起因すると考えられている。また、治療が行なわれない場合には、病理組織学的には肺最小動脈のびまん性狭窄と閉塞を認めこれにより血管抵抗がさらに増加し肺血管障害が進行すると推測される。この肺血管病変の進行のメカニズムには高肺血流の shear stress による内皮細胞障害が関与しており、さらには先天性心疾患にしばしば合併するチアノーゼによる組織低酸素がさらにその進行を促進する因子となっている可能性が高いと推測される。しかしながらその詳細はいまだ明らかではない。このため高肺血流による shear stress と内皮細胞障害の相互関係の解明は高肺血流性肺高血圧症発生のメカニズムの解明につながり、さらには先天性心疾患に合併する難治性肺高血圧症の治療の一助になると考えた。

2. 研究の目的

内皮細胞障害のマーカーである VEGF (血管内皮増殖因子) の値の推移を高肺血流量肺高血圧症において調査する。さらにこれらのマーカーと高肺血流性肺高血圧症の重症度との相関関係を調べ、肺高血圧症の進行度を評価する新たな指標となりうるかを評価する。

3. 研究の方法

肺高血圧を合併した先天性心疾患児(心室中隔欠損、両大血右室起始症、房室中隔欠損症、大血管転移症など)の術前および術直後、第1病日、第7病日に0.5mlの動脈採血を行い、血漿を分離し-80℃で保存した。サンプル数

を得た時点で、血清 VEGF の測定を Quantikine enzyme linked immunoabsorbent assay kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いておこなった。サンプルは triplicate して計測し、その平均値を測定値とした。

さらにより詳細な高流量性肺高血圧症と血管内皮細胞障害の関連を調べるため、腹部大動脈下大静脈シャントを作成した高肺流量性肺高血圧症モデルラットを作製した。そして高エネルギー加速器研究機構放射光施設 (PF-AR) (つくば市、茨城県)における放射光由来 X 線源と NHK 放送技術研究所提供の高感度 HARP 受像管、ハイビジョンシステムを使用した高感度放射光微小血管撮影法を用いて肺動脈造影を行った。放射光は 6.5 GeV の高エネルギー電子シンクロトロンより偏向磁石を用いて分離される広帯域、高輝度、高指向性の特徴を有する電磁波であり分光器 (シリコン結晶) に対し 13 度の角度で反射させることにより、光子エネルギー

33.3 KeV の高輝度な単色 X 線に変換される。この単色 X 線を用いて肺動脈造影を行った。さらに、肺を透過した単色 X 線は、NHK 放送技術研究所の協力のもとに高感度 HARP 受像管を用いて結像し、従来の CCD カメラに比してより解像度の高い画像を得た。

まず全身麻酔下にオス高肺血流性肺高血圧ラット (Wistar rats :Charles River, Yokohama, Japan) の右外頸静脈より 24G 静脈留置針を挿入しヨード濃度 30% 非イオン性造影剤を使用し肺動脈造影を行った。コントロールには開腹のみ行いシャントを作成していない、sham ラットを用いた。

肺動脈造影は右肺で行い主肺動脈、下葉上動

脈および胸膜下細肺動脈における造影された血管の density の変化を、画像処理ソフト ImageJ を用いて解析し、主肺動脈、下葉上動脈および胸膜下細肺動脈における造影剤の first pass までに要した時間をその距離で除したもののから主肺動脈-下葉上動脈および下葉上動脈-胸膜下細肺動脈の Velocity を算出した。さらにラット心臓および肺を摘出、保存し、組織染色を行い、肺細動脈組織の構造変化と流量、shear stress との相互関係を調べることとした。

4. 研究成果

術前肺高血圧であった、先天性心疾患 7 例で術前および術直後、第 1 病日、第 7 病日の血清を採取し血中 VEGF 濃度を quantikine enzyme linked immunoabsorbent assay kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。術前血清 VEGF 値は疾患群で術前値 $157.4 \pm 35.4 \text{ pg/ml}$ であった。これに対してコントロールは $43.0 \pm 22.9 \text{ pg/ml}$ であり有意に術前 VEGF 値の上昇を認めた ($p < 0.05$)。また術後の経過では術直後には $71.5 \pm 17.6 \text{ pg/ml}$ 、第 1 病日 $194.31 \pm 38.6 \text{ pg/ml}$ 、第 7 病日 $386.7 \pm 85.2 \text{ pg/ml}$ であり術直後 VEGF 値と第 7 病日間にのみ有意差を認めた。これより、肺高血圧を伴う先天性心疾患では術前血清 VEGF 値はコントロールより上昇しており、術前の肺高血圧状態を反映している可能性があることがわかった。しかし、VEGF 値は術後にむしろ上昇しており、これは手術による全身の炎症の惹起の影響などがあると考えられた。また、術後肺動脈圧は術前にくらべ低下するが、短期的には血清 VEGF 値の値はこれを反映しづらいのではないかと推察された。

より詳細な高肺血流量性肺高血圧症と shear stress の関係を調査するため、高肺流量性肺高血圧症モデルラットを作成し肺動脈造影

を行った。

前述した方法により算出された肺動脈の velocity は高肺血流量性肺高血圧ラット ($N=7$) においては中枢側 (主肺動脈-下葉上動脈間) では $111.5 \pm 23.5 \text{ mm/sec}$ (mean \pm SE) であり、末梢側 (下葉上動脈-胸膜下細肺動脈間) では $71.7 \pm 23.2 \text{ mm/sec}$ であった。これに対してコントロールは中枢側 (主肺動脈-下葉上動脈間) では $117.0 \pm 13.5 \text{ mm/sec}$ 、末梢側 (下葉上動脈-胸膜下細肺動脈間) では $9.4 \pm 2.6 \text{ mm/sec}$ であり (Fig 1)、コントロール群に比して高肺血流量性肺高血圧ラットでは中枢側では velocity に差はなかったが末梢側での velocity は有意に上昇していた。 ($p < 0.05$) これより高肺血流量性肺高血圧症においては末梢肺動脈の velocity が上昇し、より shear stress のかかる状態となっていることが推察された。これらの末梢肺動脈の velocity および shear stress 上昇が不可逆性肺高血圧症においてもたらさされる肺動脈内膜肥厚の程度とどのように関連するか、今後凍結及びホルマリン包埋肺標本を用いて病理学的に評価する予定である。また内皮細胞障害の評価のために、血清 VEGF 濃度および免疫染色による肺組織内 VEGF の評価を行う予定となっている。また、この高感度放射光微小血管撮影法を用いることによってラットのような小動物における肺動脈造影が可能となったことは特筆すべき技術開発であり、今後は高肺血流量性肺高血圧ラットにおける肺動脈 shear stress への薬物治療の効果の評価にも役立つと考えられ、臨床応用につながる重要な技術となる可能性があるといえる。

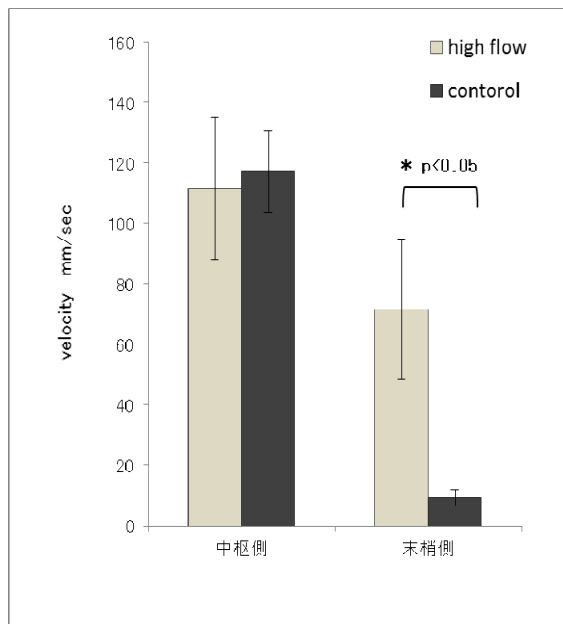


Fig1, 肺動脈中枢側及び末梢側 velocity



Fig2, 高感度放射光微小血管撮影法を用いたラット肺動脈造影

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

①Imazuru T, Matsushita S, Hyodo K, Tokunaga C, Kanemoto S, Enomoto Y, Watanabe

Y, Hiramatsu Y, Sakakibara Y, Erythropoietin enhances arterioles more significantly than it does capillaries in an infarcted rat heart model,

International Heart Journal, 査読あり、50巻、2009年、801-810

②Matsushita S, Hyodo K, Imazuru T, Tokunaga C, Sato F, Enomoto Y, Hiramatsu Y, Sakakibara Y, The minimum coronary artery diameter in which coronary spasm can be identified by synchrotron radiation coronary angiography, European Journal of Radiology, 査読あり 68S: S84-S88, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 千穂 (TOKUNAGA CHIHO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：30451701