

平成17年度自治医科大学大学院医学研究科 研究奨励賞研究成果報告

原発性肺高血圧症に対する炎症制御療法の開発

地域医療学系専攻 3年 伊藤 孝幸

1. 背景

近年、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の病態進展において炎症反応の重要性が注目されている。抗炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -10は、肺動脈の炎症増殖反応を多面的に制御することにより肺高血圧症を改善する可能性がある。

2. 目的

炎症および免疫反応による副作用が少なく、長期発現が可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、IL-10の体内発現によるモノクロタリン (MCT) 誘発性肺高血圧症の進展抑制とその機序解析を試みた。

3. 方法

IL-10およびGFP発現 AAV ベクターを、3週令の Wistar ラットの右腿に単回筋注し、正常対照群、MCT 単独投与群、GFP ベクター+MCT 投与群、IL-10ベクター+MCT 投与群の4群 (各 n=5) を作成した。後者の3群に対し7週令時に MCT (30mg/kg) を皮下注し、11週令時に種々の評価を行った。また、致死量の MCT (45mg/kg) 投与した群 (各 n=8) を作成し、生存率に及ぼす影響を調べた。

4. 結果

評価時の IL-10群における血清 IL-10濃度は有意に上昇していた。IL-10群では GFP 群と比較して、平均肺動脈圧、右室/(左室+中隔)比、末梢肺動脈の中膜肥厚度、肺組織抽出液中の IL-6および TGF- β 1濃度が低下していた。また、これらの指標の改善度は、血清 IL-10濃度と関連していた。さらに IL-10群において、免疫組織学的評価による肺動脈周囲マクロファージ浸潤 (ED-1抗体) および肺動脈平滑筋増殖 (PCNA 抗体) の抑制と、生存率の有意な改善が認めら

れた。

5. 考察

AAV ベクターを用いた IL-10の持続的体内発現により、MCT 誘発性肺高血圧症の肺動脈リモデリングとその基盤にある炎症増殖反応が抑制され、生存率が改善した。また、本法により重篤な副作用は生じなかった。本研究の結果は予防投与によるものであったが、治療プロトコルで効果を証明できれば、IL-10を用いた炎症制御療法が PAH の新たな治療戦略となる可能性がある。

摂食中枢 NPY ニューロンによる摂食亢進・抑制ホルモンの受容と情報統合の機構

人間生物学系専攻 3年 河野 大輔

1. 目的・背景

視床下部弓状核ニューロペプチド Y (NPY) ニューロンは、摂食亢進に重要な役割を果たしている。空腹時において NPY mRNA の発現量は著明に上昇しており、また、NPY の脳室内投与は強い摂食亢進を引き起こす。NPY ニューロンは種々の中枢性および末梢性の摂食・代謝調節情報を受容している。摂食亢進物質グレリンは食前に血中濃度が上昇し、グレリンの脳室内投与により摂食が亢進する。グレリンによる摂食亢進は NPY 受容体拮抗薬によって阻害されることから、グレリンによる摂食亢進は NPY ニューロンを介していると考えられる。一方、脂肪細胞から産生される摂食抑制物質レプチンは、脳を介して摂食抑制を起こし、レプチン受容体は NPY ニューロンに豊富に発現していることから、レプチンによる摂食抑制のかんりの部分が NPY ニューロンを介していると考えられる。グレリンとレプチンは、NPY ニューロンへの作用を介して生理的な摂食調節に関与していると考えられるが、それらの

NPY ニューロンに対する単独および相互作用は十分に解明されていない。そこで本研究では、グレリン、レプチンのNPY ニューロンに対する直接作用とシグナル伝達機構及びそれらの相互作用を解析することを目的とした。

2. 方法

成熟ラットより弓状核ニューロンを単離し、fura-2蛍光画像解析により細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を測定し、灌流下にホルモンなどを添加し細胞活性の変化を調べた。 $[Ca^{2+}]_i$ の測定後、抗NPY抗体を用いた免疫染色を行ってNPYニューロンを同定し、反応性細胞に占めるNPYニューロンの割合を調べた。

3. 結果

グレリン (10^{-12} M– 10^{-8} M) は、濃度依存性に弓状核ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を増加させ、グレリン 10^{-10} M は35%の弓状核ニューロンを活性化した。グレリン応答性弓状核ニューロンの約80%はNPY免疫陽性であった。グレリンによる弓状核ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、アデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、ホスホリパーゼCおよびN型 Ca^{2+} チャネルの阻害剤によって阻害された。グレリンに $[Ca^{2+}]_i$ 増加応答を示したNPYニューロンの約45%がレプチン (10^{-12} M) の共添加により抑制された。レプチンによるグレリン誘導性 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の抑制は、PI3キナーゼとホスホジエステラーゼ3の阻害剤によって阻害された。一方、MAPキナーゼ、 K_{ATP} チャネルおよびSTAT3の阻害剤はレプチンによる抑制作用を変化させなかった。

4. 考察

グレリンは、弓状核NPYニューロンを直接活性化し、その機序にはアデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼA、ホスホリパーゼC、N型 Ca^{2+} チャネルが関与している。一方、レプチンは、グレリンによるNPYニューロンの活性化を抑制し、その機序はPI3キナーゼおよびホスホジエステラーゼ3が関与している。グレリン、レプチンによるNPYニューロンの正、負の制御と、それらに関わるシグナル伝達機序は、摂食・代謝調節に重要な役割を果たしていると示唆される。

心不全における慢性炎症と酸化ストレス —臨床研究を基盤とした新規治療法の開発—

地域医療学系専攻3年 去川 睦子

1. 目的

近年、動脈硬化、高血圧や心不全などの心血管病変において、慢性炎症や酸化ストレスの関与が示唆されている。我々はこれまでに、心不全患者の検体を用いて、炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-6と酸化ストレスマーカーである8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ がBNPと相関して重症心不全患者で上昇しており、また入院後治療による症状改善に伴って減少することを明らかにし、心不全において炎症や酸化ストレスの亢進が病態の発症や進展に関与している可能性を指摘した。しかし、これらを標的とした心不全治療の可能性については十分に検討されていない。IL-10は、種々の炎症性サイトカインを抑制するほかに、内皮機能の改善や平滑筋細胞増殖の抑制などの多面的な作用を有することから、心血管病変を改善することが期待される。本研究では、ダール食塩感受性ラットにおいて、単回投与で長期安定発現が可能な1型アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いてIL-10を生体内で発現させ、心不全に対する抗炎症療法の効果を検討した。

2. 方法

治療群としてAAV-1 rat IL-10 (n=10)、コントロール群としてAAV-1 GFP (n=10)をそれぞれ 1×10^{12} g.c./body ずつ、5週令ダールラットの前脛骨筋に単回、筋注した。6週令より高食塩負荷を開始し、血圧、心エコー、臓器重量、心筋組織所見、生存率について検討した。

3. 結果

ベクター投与14週後の治療群の血中IL-10濃度は 986 ± 278 pg/ml と高値であった。血中TNF- α 濃度、心組織中TGF- β 濃度はIL-10群で有意に低下した。血圧は治療群で有意に低下し、血圧上昇抑制効果は血中IL-10濃度と高い相関を示した。心エコー上、治療群において、肥大型である11週令では左室肥大が、心不全期である19週令では左室収縮能低下および左室径拡大が有意に抑制されていた。心・肺重量は治