

博士論文

間歇的低酸素誘発性肺高血圧における M1 マクロファージによる 肺高血圧発症抑制機構の発見

永 井 恒 志

間歇的低酸素誘発性肺高血圧における
M1 マクロファージによる肺高血圧発症抑制機構の発見

所属

慶應義塾大学医学部法医学教室

東京大学医学部附属病院検査部

指導教員 矢富 裕

申請者 永井 恒志

要旨

In sleep apnea syndrome (SAS), intermittent hypoxia (IH) accompanying sympathoadrenal activation induces repeated episodes of hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) during sleeping periods, which contributes to pulmonary arterial hypertension (PAH). However, the prevalence of PAH is low and severity is mostly mild in SAS patients, and generally mild or no right ventricular hypertrophy (RVH) is reported in IH-exposed animals. The question then arises as to why PAH is not a universal finding in SAS if repeated hypoxia of sufficient duration causes cycling of HPV. In the present study, we used rats exposed to IH at a rate of 3min cycles of 4-21% O₂ for 8 h/d for 6 weeks for a SAS model. In IH-rats, heart rate and blood pressure were significantly high compared to these in control rats, however, neither PAH nor RVH was observed after 6 weeks of IH exposure. In IH-rats, urine concentration of catecholamine was extremely high compared to the control, indicating the activation of sympathoadrenal signaling in IH. IH stimulation induced the migration of circulating monocytes into the lung and differentiation of the migrating monocytes into M1 macrophages with upregulation of β_3 AR and iNOS. The pulmonary M1 macrophages secreted nitric oxide via activation of β_3 AR/iNOS pathway and dilated small pulmonary arteries to cause strong attenuation of HPV. Moreover, chronic treatment with

β_3 -blocker or clodronate induced PAH development without pulmonary arterial hypertrophy. These findings suggest that the repeated HPV is a chief cause of the pathogenesis of PAH in IH and that the circulating monocyte-derived pulmonary M1 macrophages prevent PAH progression by attenuating HPV via β_3 AR/iNOS signaling.

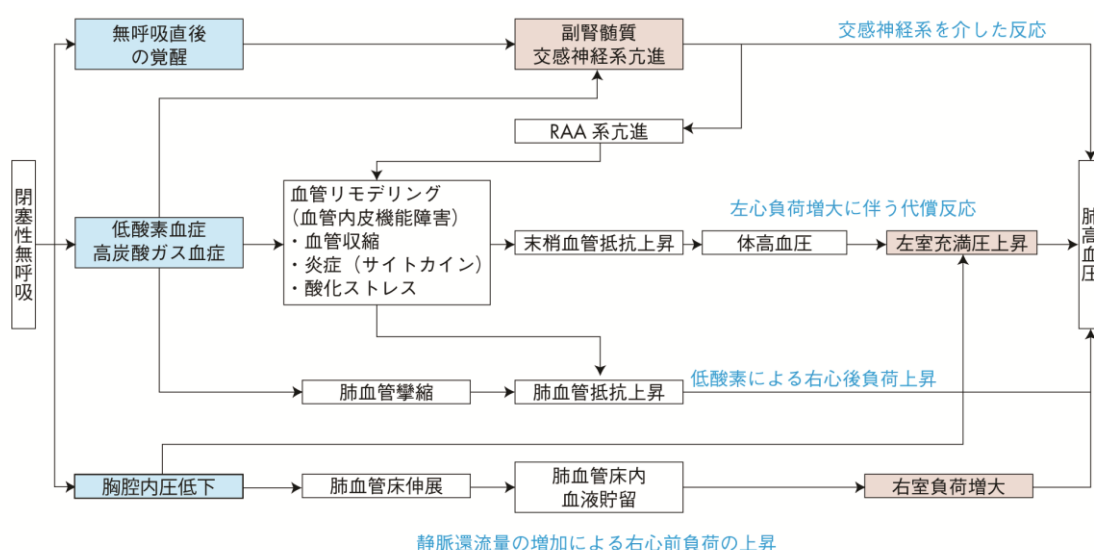
第 I 章 序文

睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome, SAS) は睡眠時に 10 秒以上の呼吸停止、すなわち無呼吸を繰り返す症候群である。SAS は高血圧、心筋梗塞、脳梗塞などの心血管系障害の独立した危険因子であるだけでなく突然死の危険因子でもあり、中等症から重症の SAS の死亡率は対照群に比較して有意に高い(1)。法医学分野においても、高度肥満や睡眠時に激しい鼾のある者や SAS と臨床診断された患者が睡眠中に突然死した剖検例が報告されているおり、SAS の病態に関心が集まっている(2, 3)。

ところで SAS の合併症の一つとして肺高血圧が挙げられる。近年の臨床報告によると SAS 患者における肺高血圧の合併率は 20~40%程度と見積もられており、SAS 患者でも肺高血圧を合併する場合としない場合とがある(4, 5)。肺高血圧を合併する場合、SAS の予後は不良になりうると考えられている(6)。また法医学分野では SAS による突然死には右心負荷の関連性が指摘されており、右心負荷は肺高血圧に起因する可能性がある(2)。そのため SAS における肺高血圧の発症機序、および肺高血圧の有無を決定する因子の解明が急務である。

現在のところ SAS による肺高血圧発症に寄与する主な病態として低酸素血症、胸腔内圧低下、無呼吸直後の覚醒の 3 つが考えられている (図 1) (1, 6)。SAS 患者は夜間就寝中に頻回の気道閉塞に伴い間歇的低酸素 (intermittent hypoxia, IH)

血症を繰り返す。その結果、一過性の肺動脈圧上昇を反復しながら漸次進行性に平均肺動脈圧が上昇する現象が観察されている。この一過性の肺動脈圧上昇は低酸素性肺血管収縮（hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV）によるものと推測されるが確認はされていない（図2）(7)。



OSA患者においては、低酸素血症、胸腔内圧の変動、交換神経活性化などの様々な要因が関連して、肺動脈圧上昇を生じている。

図1 SASに合併する肺高血圧で考えられている発症機序

SASに合併する肺高血圧の原因として、(間歇的)低酸素血症、胸腔内圧低下、無呼吸直後の覚醒の3つが重要と考えられている。Circulation Journal Supplement II. 2010;74:963より引用改変(6)。

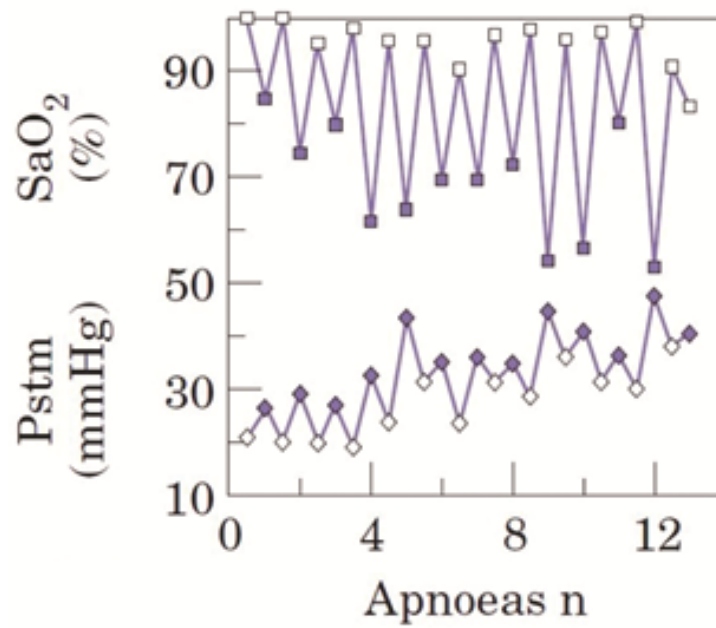


図2 SAS患者における睡眠時の間歇的低酸素血症と付随する肺動脈圧変化
 睡眠中の低酸素血症に一致した一過性の肺動脈圧上昇が認められる。肺動脈圧が基線に戻る前に再上昇すると平均肺動脈圧は持続的に上昇していく。SaO₂ : arterial oxygen saturation, Pstm : systolic transmural pulmonary artery pressure. The European Respiratory Journal. 1994;7(12):2192 より引用改変(7)。

また SAS 患者に対して急性低酸素曝露を行うと、健常者と比較して肺動脈圧の上昇率が高いことが実験的に確かめられている。この反応性亢進は 4 か月間の持続陽圧呼吸療法 (continuous positive airway pressure, CPAP)により消失し、かつ日中の平均肺動脈圧を低下させるとの報告がある(8)。そのため、IH が肺高血圧の発症に寄与していると一般に考えられている(4, 9)。

こうした臨床研究の結果から、動物実験では IH 曝露動物が「SAS モデル」として世界的に使用されてきた。過去における小動物（ラット、マウス）を使用した IH 研究において、肺高血圧あるいは右室肥大に関しては、これを「認める」とするものと「認めない」とするものの両方がある(10-18)。したがって SAS 患者での報告と同様に、IH 曝露動物においても肺高血圧が必ずしも発症するわけではない。そこで我々は独自に開発した IH 曝露装置を用いて、7 週齢のラットを 1 週間から 8 週間まで種々の期間で IH 曝露し、肺高血圧あるいは右室肥大を呈するか予備実験したところ、いずれの期間でも有意な肺高血圧を生じなかった。しかしながら過去の文献で肺高血圧を生じたとの結果が複数あることも考慮すると、IH では肺高血圧の発症を抑制する機構が推定され、この機構が何らかの原因で機能しない場合に肺高血圧に至る可能性がある。そこで我々は IH における肺高血圧の発症抑制機構の存在を想定し、その解明を研究課題とした。

ところで従来、低酸素性肺高血圧の研究は専ら慢性低酸素(chronic hypoxia,

CH)曝露動物で行われてきた。CH 曝露動物では肺高血圧は多くの場合、中等度から高度であり、肺血管中膜肥厚が主要な原因であることが判明している。IH も低酸素曝露であることから、IH 誘発性肺高血圧の発症機序は CH 誘発性肺高血圧と類似していると推定されている(19)。この肺血管中膜肥厚に関して近年、マクロファージとの関連性が注目されている。ラットに対する CH 曝露では血中単球の肺血管周囲への集簇と共に高度の肺血管中膜肥厚を認めた(20)。また、マウスに対する CH 曝露では曝露2日目をピークとする肺マクロファージの持続的増加を認め、これらのマクロファージは M2 型であることが分かった。この M2 マクロファージが肺血管平滑筋の増生に重要な役割を果たすことが *in vitro* および *in vivo* の実験により確かめられた(21)。これらの結果から、CH 曝露では M2 マクロファージが肺高血圧発症に極めて重要な役割を担うことが明らかになった。一方、IH における肺高血圧へのマクロファージの関与については報告がない。

IH とマクロファージの関連性については、*in vitro* の実験で RAW264.7 マクロファージを IH 曝露すると誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) がマクロファージに発現するとの論文がある(22)。iNOS は M1 マクロファージマーカーであることから、IH 曝露下では M1 マクロファージに分化する可能性がある。その点で CH 曝露と IH 曝露とでは誘導されるマクロファージのサブタイプが異なる可能

性がある。

また IH と CH における交感神経活性化の程度の違いに着目した。IH では交感神経の活性化が知られており、IH 曝露ラットに対して急性低酸素曝露を行うと、カテコラミン分泌が著しく亢進するが、CH 曝露ラットではそうした反応は生じない(23)。β 受容体 (β-adrenergic receptor, βAR) はマクロファージにも発現しているため(24, 25)、IH 刺激で放出されたカテコラミンがマクロファージの βAR を刺激すると考えられる。

これに関連した興味深い現象として、慢性的にラットの心筋細胞をノルアドレナリンで刺激すると β₃AR の発現が mRNA、タンパクともに増加するとの報告がある(26)。同様の現象はネコの心不全モデル(27)、ヒトあるいはマウスにおける敗血症モデル(28)、ラットにおける streptozotocin 誘発性 1 型糖尿病モデル(29)の心筋細胞でも認められ、高カテコラミン血症による持続的な刺激が β₃AR の発現を促進したと考えられている(26)。また β₃AR の刺激によってマウスの心筋細胞における iNOS 発現と NO 合成が増加し、心機能が改善するという(30)。β₁AR と β₂AR が肺のマクロファージに発現することは知られているが(24, 25)、β₃AR が発現するとの報告はない。しかし上記の研究報告から、IH 刺激による高カテコラミン血症が肺内のマクロファージに β₃AR を発現させ、IH 刺激自体あるいはカテコラミンによる β₃AR 刺激により発現した iNOS を介して、M1 マクロフ

マクロファージが一酸化窒素 (nitric oxide, NO) を合成分泌する可能性がある。NO は主要な血管拡張因子であり、NO 吸入は HPV を抑制するとの報告があることから (31)、IH 刺激が肺のマクロファージにおける β_3 AR/iNOS 経路を介して肺血管を拡張し HPV を抑えると考えられる。その結果、肺高血圧の発症が抑制される可能性がある。

この仮説を検証するために、IH 曝露ラットでの肺におけるマクロファージの数やサブタイプ (M1 か M2 か)、また β_3 AR や iNOS の発現程度を調べた。また、IH 曝露ラットを大型放射光施設 SPring-8 に持ち込み、肺微小血管造影で HPV を種々の薬剤投与下で評価した。加えて、IH 誘発性肺高血圧に対するこれらの影響を評価するために、clodronate 間歇投与によりマクロファージを消失させたモデル、あるいは持続的に β_3 AR 阻害薬を投与したモデルで、肺高血圧の程度を評価した。

第Ⅱ章 方法

1. 動物モデルと IH 曝露条件

本研究は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受けたものである（承認番号：医-P09-042、医-P10-140（医-H11-153））。本実験では6週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット（系統 Cjr : CD (SD), SPF）を Charles River Laboratories (Kanagawa, Japan)から購入し、1週間の馴至後、低酸素曝露を開始した。動物飼育室は実験全期間を通じて、許容温度 21~25℃、許容湿度 40~75%、照明時間 12 時間（午前 6 時~午後 6 時まで点灯）に設定されている。独自に作成した密閉式プラスチック製低酸素曝露チャンバー（270^D×440^W×190^Hmm）に 7 週齢ラットを 3 匹入れ、窒素ガスと空気をタイマー制御された電磁弁を介して交互に流入する IH 装置を新たに開発した（図 3）。

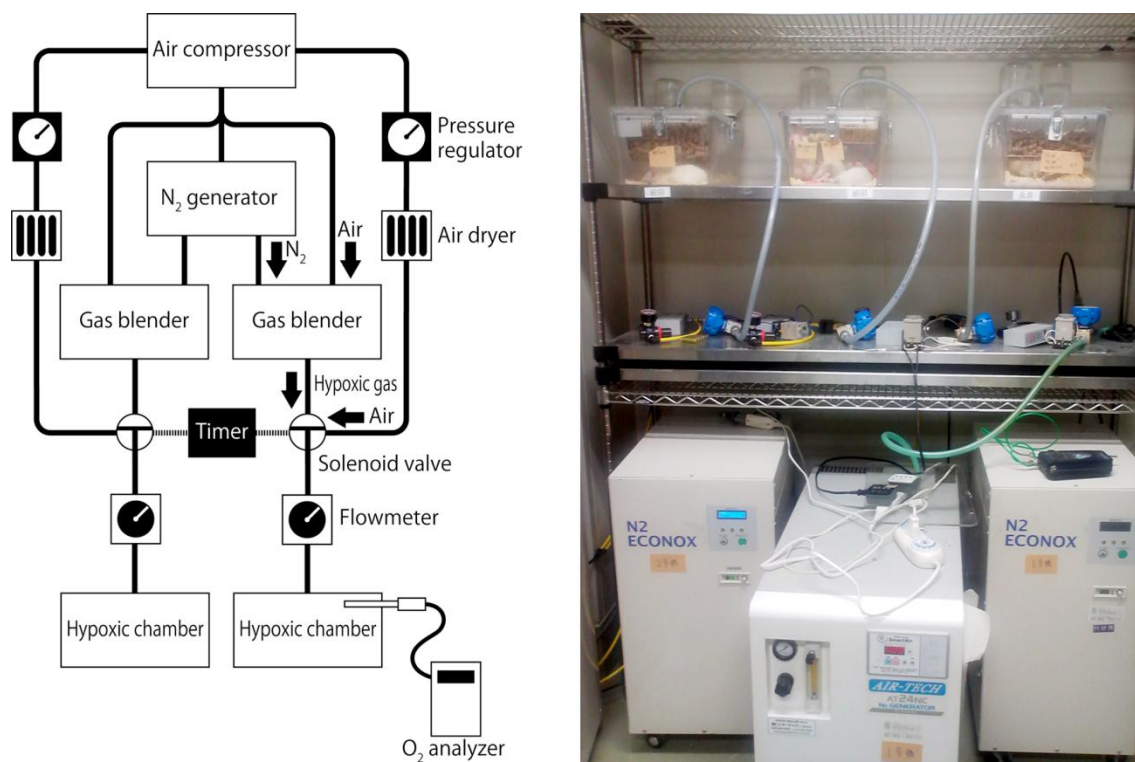


図3 IH 曝露装置

(左図) 2 チャンバー方式の IH 曝露装置の全体図。エアーコンプレッサーと窒素ガス発生装置から送られる空気と窒素ガスはブレンダーで混合される。それぞれの流量を調整することで低酸素チャンバーに送り込む低酸素ガス濃度を自由に設定できるようにした。本研究ではガスブレンダーには空気を送らず、窒素ガスのみを送った。低酸素ガス(窒素ガス)と空気はタイマーで制御された電磁弁に接続され、設定時間毎に交互に低酸素チャンバーに送気される。本実験では 90 秒交代に固定した。(右図) IH 曝露装置の実際。下段に窒素ガス発生装置、中段にタイマー・電磁弁・除湿機・流量計、上段に低酸素チャンバーを配置している。エアーコンプレッサーは写真の左外側に並んでいる。International Journal of Clinical and Experimental Physiology 2014;1:307-310.より引用(32)。

対照群は 3 匹を同じサイズの通常の飼育チャンバーに入れ、低酸素チャンバーの隣に設置した。窒素ガス (N_2 99.9%) は工業用窒素ガス発生装置 (PSA type N_2 generator, ECONOX Ver. 2.10, ECOTS, Osaka, Japan)、空気 (O_2 21%) はスクロール式エアーコンプレッサー (Oil free scroll type, Smart Air SLP-15EBD, ANEST IWATA, Yokohama, Japan) から送気することで永続的にガスを供給できるシステムにした。IH 装置は 2 つのチャンバーを同期して IH 曝露できる 2 チャンバー方式と、1 つのチャンバーのみ IH 曝露できる 1 チャンバー方式を作成した。2 チャンバー方式は 1 台、1 チャンバー方式は 2 台作成した。我々で開発した IH 曝露システムは独自性の高いものとして国際英文誌に別途発表を行った(32)。

文献によると肺高血圧を合併している SAS 患者の起床時あるいは日中の PaO_2 は肺高血圧を合併していない SAS 患者よりも有意に低く、これらの結果は低酸素の強さが肺高血圧発生に関与していることを示唆する(33, 34)。過去の文献を比較してみると、SAS 患者で肺高血圧を合併している症例における PaO_2 は 66 ~90mmHg であるが(5) (表 1)、齧歯類は低酸素に対してヒトよりも耐性が非常に高いことを考慮すると、ラットによる肺高血圧を焦点とした IH 実験としては過去の齧歯類を用いた論文の中から最も強い低酸素条件を選択するのが良いと考えられる。そこで IH で肺高血圧をテーマとする主な論文を列挙してみると、最も強い低酸素刺激条件は 3~5% O_2 であり、ラットでは 1 サイクルは 180 秒

(低酸素化期間 90 秒、常酸素化期間 90 秒) であることが分かった (表 2)。この条件は肺高血圧以外を課題とした SD ラットによる IH 実験においても概ね同じであった (表 3)。そこで我々の IH 装置でこの条件を満たす窒素ガスと空気の流入量をそれぞれ調整した。その結果、窒素ガス (N₂ 99.9%) を流量 14L/分で供給し、空気 (O₂ 21%) を流量 54L/分で供給すると 90 秒毎に 4%と 21%O₂を達成することが分かった (図 4)。それぞれの送気チューブは電磁弁に接続し、電磁弁はタイマーにより 90 秒毎に弁を切り替えると窒素ガスと空気が交互に密閉式チャンバー内に流入する。

Table 1. Prevalence of PHT in OSAs

Study	Sample size	PH prevalence (%)	mPAP (mm Hg)	mPAP in PH	FEV ₁ (% predicted)	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)
Schroeder et al ⁶⁴	22	59	21	25	-	80	-
Tilkian et al ²⁸	12	67	20	23	-	77	41
Fletcher et al ⁶⁵	24	79	28	32	62	66	46
Podszus et al ³⁶	65	20	19	29	-	-	-
Weitzenblum et al ⁵⁴	46	20	16	23	66	73	39
Krieger et al ⁵³	114	19	16	-	65	72	39
Sajkov et al ⁵⁹	27	41	18	23	89	75	41
Laks et al ⁵⁶	100	42	21	29	73	74	45
Chaouat et al ⁵²	220	17	-	-	-	73	39
Sanner et al ⁶¹	92	20	15	22	92	83	36
Bady et al ⁵⁸	44	27	20	28	92	81	41
Sajkov et al ⁶⁰	32	34	18	24	102	78	40
Alchanatis et al ⁵⁷	29	21	17	26	92	90	40
Arias et al ⁶³	23	43	22	28	111	-	40

The values given are for the whole OSA patient group studied (see sample size in column 2) with exception of column 4 where mean pulmonary artery pressure (mPAP) in PH refers to the mean PAP in the subgroup of patients with PHT (ie, mPAP >20 mm Hg).

Abbreviations: PH, pulmonary hypertension; FEV₁, forced expiratory lung volume in one second; mPAP, mean pulmonary artery pressure.

表 1 SAS 患者における肺高血圧合併率と合併例での PaO₂

他の心血管障害を有さない SAS 患者における肺高血圧合併率は 20~40%程度と推定されている。肺高血圧合併例での PaO₂ は 66~90mmHg である。Progress in Cardiovascular Diseases 2009;51:363 より引用(5)。

journal	hypoxic condition	Animal
<i>Hypertension</i> . 1992;19:555-61	(3-5)-21% O ₂ x 60s x 7h x35d	Rat
<i>Respir Physiol</i> . 1999;117:53-8	(7-8)-21% O ₂ x 30s x 8h x35d (5d/w)	Rat
<i>J Appl Physiol</i> . 2001;90:2502-7	10-21% O ₂ x 120s x 8h x28d	Mice
<i>J Appl Physiol</i> . 2005;99:2028-35	5-21% O ₂ x 60s x 12h x35d	Mice
<i>J Appl Physiol</i> . 2008;104:110-8	5-21% O ₂ x 180s x 7h x 14d	Rat
<i>Am J Respir Cell Mol Biol</i> . 2009;40:601-9	10-21% O ₂ x 80s x 8h x 56d (5d/w)	Mice
<i>J Appl Physiol</i> . 2011;111:980-8	5-21% O ₂ x 180s x 7h x 28d	Rat

表 2 肺高血圧をテーマにした IH 論文における IH 条件

肺高血圧を焦点とした実験系で最も強い低酸素条件は 3~5% O₂ であり、近年の論文ではラットでは 180 秒サイクルが主流である。一日の曝露時間は 7~8 時間、曝露期間は 28~35 日程度が多い(10, 12, 15, 16, 35-37)。

journal	hypoxic condition
<i>Neuroscience</i> 2008;154 :1639-47	10-21% O ₂ x 180s x 8h x7d
<i>Am J Physiol Heart Circ Physiol</i> 2007;293:K2971-6	5-21% O ₂ x 180s x 7h x14d
<i>Am J Respir Crit Care Med</i> 2003;1167:1548-53	10-21% O ₂ x 180s x 12h x7d
<i>J Appl Physiol</i> 2001;90:1600-5	(3-5%) x (3-6s)-21% x (15-18s) O ₂ x 30s x6-8h x35d
<i>Hypertension</i> 2001;37:511-5	5-21% O ₂ x 180s x 7-8h x 11d
<i>J Appl Physiol</i> 1999;86:298-305	6.5-21% O ₂ x 60s x 8h x 30d
<i>Hypertension</i> 2005; 45:705-9	5-21% O ₂ x 180s x 7h x 14d
<i>J Appl Physiol</i> 2005;98:1691-6	5-21% O ₂ x 60s x 8h x 35d
<i>J Neurochem</i> 2003;86:1545-52	10-21% O ₂ x 180s x 12h x 14d
<i>J Appl Physiol</i> 2009;106:12-9	5-21% O ₂ x 315s x 8h x 10d
<i>J Appl Physiol</i> 2009;106:259-67	(8.2-10%) - 21% O ₂ x 240s x 8h x 21d
<i>Am J physiol Heart Circ Physiol</i> 2007;293:H2911-8	5-21% O ₂ x 180s x 7h x 14d

表 3 過去の文献における SD ラットを用いた IH 条件（肺高血圧を扱っていない実験）

最も強い低酸素条件は 3~5% O₂ で、1 サイクルは 180 秒、一日 7~8 時間が多い(38-49)。

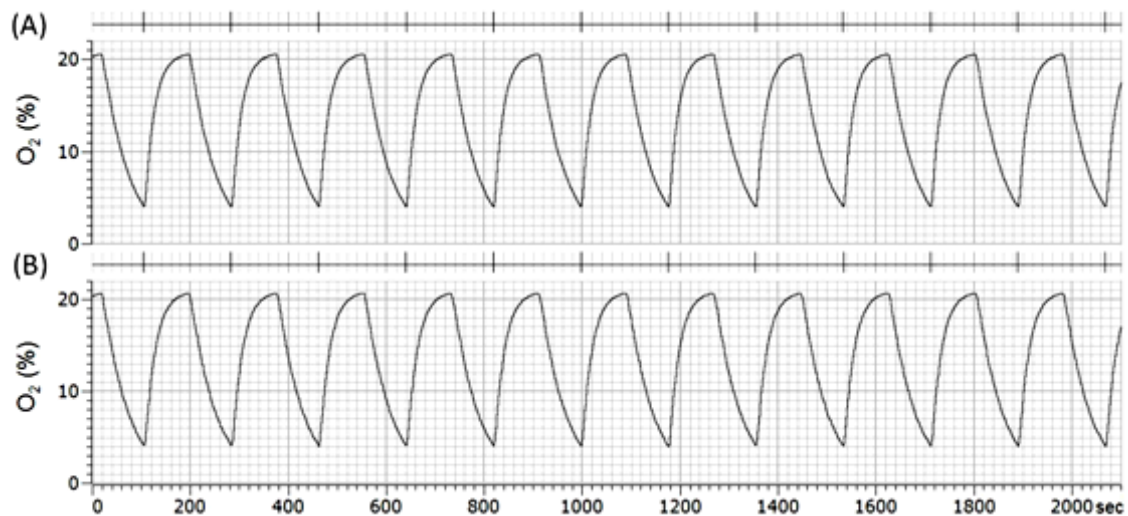


図4 IH曝露中のチャンバー内O₂濃度の変化

90秒毎に4%と21%に達するように調節した。2チャンバー方式では2つのチャンバー内((A)と(B))の酸素濃度は完全に同期している。International Journal of Clinical and Experimental Physiology 2014;1:307-310.より引用改変(32)。

文献によるとIH曝露時間は一日7~8時間であるため、タイマーのコンセントはプログラムタイマーに接続し、毎日午前9時~午後5時(ラットの睡眠期間)の8時間だけ90秒切り替えが起きるようにした。午後5時~翌午前9時まででは空気だけが54L/分で流入するようにした。またIH曝露中のラットの低酸素血症の状態を確認するために、大腿動脈にカテーテルを留置したラットに対してIH曝露を行いながら覚醒下で動脈血ガス分析を行ったところ、4%FiO₂時 PaO₂ 25.4±1.7mmHg、PaCO₂ 17.8±0.7mmHg、pH7.583±0.02、21%FiO₂時 PaO₂ 83.3±8.6mmHg、PaCO₂ 32.4±5.4mmHg、pH7.410±0.02であり、ヒトのSAS症例に比べてかなり強い低酸素血症を起こしていたが、死亡あるいは意識障害を

呈する個体はいなかった (図 5)。IH 曝露期間は、これまでの文献では 5 週間曝露が比較的多いが、確実性を高めるために 6 週間曝露とした (表 2)。最終的に IH 曝露条件は 4%-21%O₂×180 秒サイクル×8 時間/日×6 週間に決定した。なお、餌と水は自由に摂取可能であり、5 日毎に 10 分程度のチャンバー内の掃除を IH 曝露時間が終了する午後 5 時以降に行った。

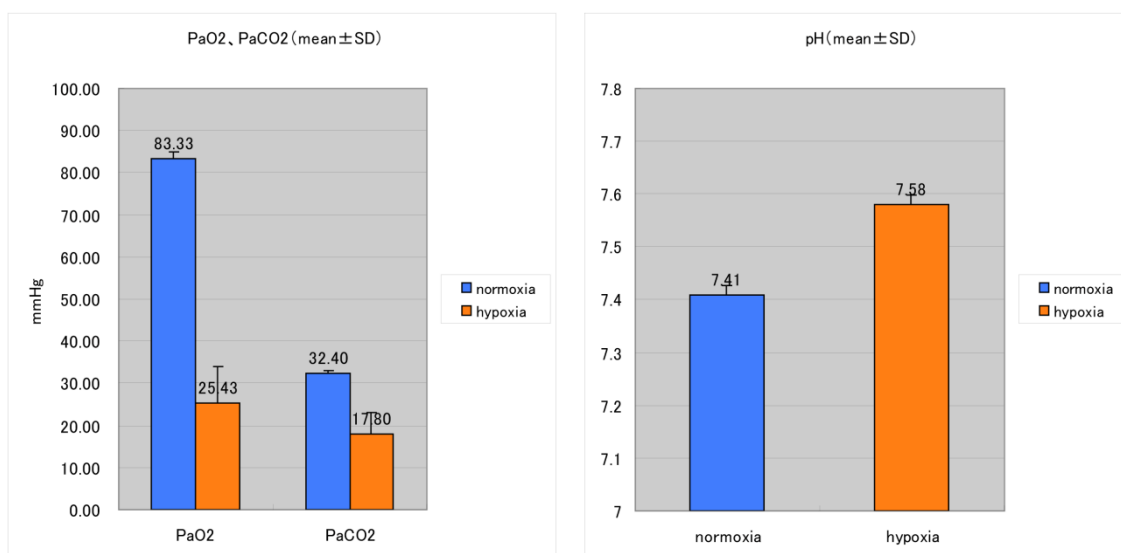


図 5 IH 曝露中のラット動脈血ガス分析結果

FiO₂ 4%まで下がった段階で PaO₂ は 25.43mmHg まで低下するが、FiO₂ 21%に戻った段階で 83.33mmHg に回復する。IH 中は低酸素刺激により過換気になるため PaCO₂ も低下し、pH は 7.58 と呼吸性アルカローシスを呈する (n=3 each, mean ±SD)。

2. 体重、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧の測定

IH 曝露実験の開始前日と IH6 週曝露終了翌日に、対照群と IH 群の体重、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧を測定した。心拍数と血圧はテールカフ法(Softron, Tokyo, Japan)により 1 匹につき 3 回測定し平均値を出した。

3. 24 時間蓄尿による尿中カテコラミン濃度の定量

IH 曝露 6 週間が終了した日の午後 5 時から、IH ラット 5 匹、対照群ラット 5 匹を 1 匹ずつ採尿用代謝ケージ(Natsume, Tokyo, Japan)に入れ、24 時間蓄尿を行った。尿は 2.5 mol/L HCl を 20 μ L 含む採尿用チューブ内に持続的に溜まるようにした。採尿後、カテコラミン 3 分画（ドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン）の濃度を高速液体クロマトグラフィ検査により検出した(SRL Japan, Tokyo, Japan)。

4. clodronate liposome の急性気管内投与

clodronate liposome は単球あるいはマクロファージに貪食されるとアポトーシスを惹起する。clodronate liposome は過去の論文にしたがって以下の通り気管内投与した(50)。IH6 週間曝露後、ラットは pentobarbital(70 mg/kg)腹腔内投与にて麻酔され、無菌操作にて適宜 2% lidocain を滴下しながら前頸部を開け気管を露

出させた。気管に 26 ゲージ針を付けた 1mL シリンジを穿刺し、500 μg の clodronate liposome (Clodrosome, Encapsula NanoSciences, Nashville, TN)を含む 100 μL の生食を自発呼吸にあわせて肺内に拡散するようにゆっくりと注入した。前頸部は無菌の針糸を用いて縫合し、消毒をして意識の回復を確認した。文献によると clodronate liposome を気管内に投与してから 72 時間後に肺マクロファージが最も減少した状態になるという(50, 51)。そこで肺マクロファージの減少を確認するため、clodronate liposome 注入後 3 日目に pentobarbital (70 mg/kg)を腹腔内投与してから大動脈切断にて脱血死させ、摘出した肺を ED-1 抗体にて蛍光抗体法で染色した(方法は後述)。肺マクロファージの減少を確認した後、同様の手技で同ラット群を作成し、clodronate liposome 注入後 3 日置いてから肺血管造影検査を行った。

5. clodronate liposome の間歇的静脈内投与

論文によると clodronate liposome (15 mg/kg)を静脈内に単回投与すると、投与 4 日目まで血中単球は極めて少ない状態に維持されるが、7 日目には正常レベルにまで回復するという(52)。そこで血中単球を持続的に消失させるために、clodronate liposome (15 mg/kg)を尾静脈に IH 曝露前日に 1 回投与し、その後 4 日置きに同様の手技を IH6 週間繰り返した。

6. 蛍光リポソームの間歇的静脈内投与

論文によると蛍光リポソームはマクロファージ取り込み後 10 日でも蛍光発色が維持されるという (53)。そこで 0.4mL の蛍光リポソーム (Fluoroliposome, Encapsula NanoSciences) を含む 1mL の生食を IH 曝露開始前日に尾静脈内投与し、同様の手技を 1 週間毎に IH6 週間の間繰り返した。IH 曝露終了後、IH 群と対照群の肺を摘出し、O.C.T. コンパウンドで包埋した後、液体窒素で急速に凍結した。凍結肺は直ちにクリオスタットで 10 μ m に薄切し、スライドガラスに配置した。そのままの状態ですら蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan) で撮影した。肝臓も同様に観察し、蛍光リポソームを貪食した血中単球像のポジティブ・コントロールとした。

7. β_3 AR 遮断薬の慢性皮下投与

選択的 β_3 AR 遮断薬 SR59230A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を充填した浸透圧式ミニポンプ (Alzet, Palo Alto, CA) を、pentobarbital (70 mg/kg) 腹腔内投与で麻酔したラットの背部上方に IH 曝露開始 3 日前に埋込手術した。これにより IH6 週曝露の期間中、SR59230A を 0.6 mg/day の速度で持続投与した。

8. 放射光を利用した肺微小血管造影検査

放射光による肺微小血管造影検査は大型放射光施設 SPring-8 の生物専用ビームラインである BL28B2 で実施した (図 6)。

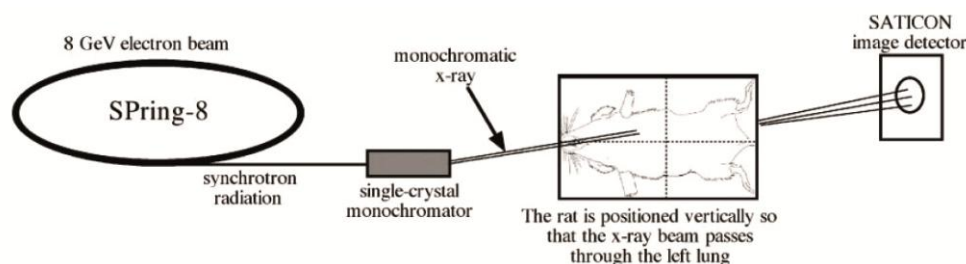


Fig. 1. Simplified schematic diagram showing the experimental setup for pulmonary microangiography in a closed-chest rat model using monochromatic synchrotron radiation at the SPring-8 facilities in Hyogo, Japan.

図 6 SPring-8 での放射光による肺微小血管造影法のシエーマ

蓄積リングから磁力によって抽出された放射光はラットの左上肺を通過して後方のカメラレンズ内へと侵入する。Journal Applied Physiology 2007;102:787 より引用(54)。

造影プロトコールは過去の論文に準拠した(55)。pentobarbital (70 mg/kg)腹腔内投与で麻酔されたラットを透明なアクリル板に仰臥位で固定した。適宜 lidocian2%を滴下しながら気管を露出し、気管切開にて人工呼吸器(SN-480-7, Shinano, Tokyo, Japan)に接続した。換気速度は一回換気量 3~4mL×70 回/分に設定した。次いで右側の大腿動静脈を露出し、体血圧測定用のカテーテルと、生理食塩水や薬物の静脈内投与用のカテーテルを各々挿入した。先端を 30 度曲げた 20 ゲージのアンギオカット・カテーテル(Becton Dickinson Inc., Sandy, Utah)を右頸静脈に挿入し、右心室に先端が来るように留置した。このカテーテルは肺

血管の造影剤注入用カテーテルとして使用した。ラットを固定したアクリル板を起し、放射光が左上肺部を通過し、左肺動脈第二分岐を描出するようにセットした（図7、8）。

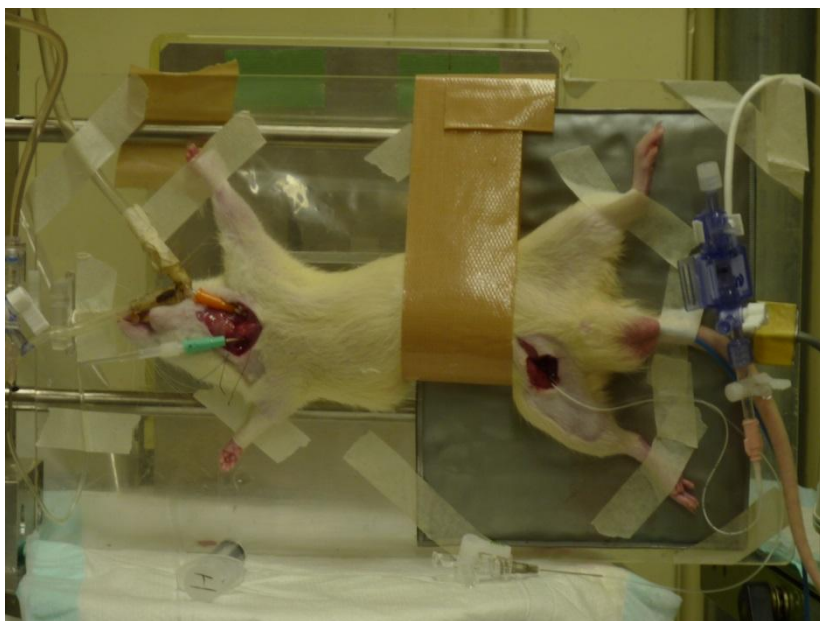


図7 肺血管造影でのラットの状態

アクリルチャンバーで固定され手術の施されたラットを放射光照射ブース内にセットしたところ。

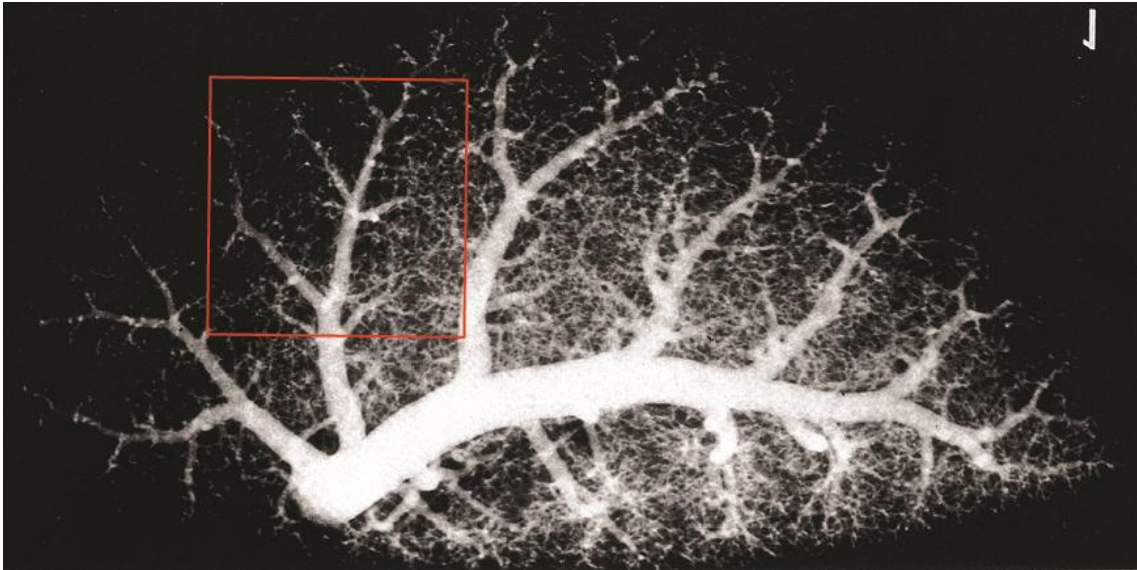


図 8 放射光で描出される領域 (赤枠)

左葉の肺動脈第 2 分岐の末梢を一边 9.5mm の正方形の領域 (赤枠) で描出した。
Anatomy and Embryology 1995;191:474 より引用改変(56)。

挿入したカテーテルは PowerLab system (ADInstruments Colorado Springs, CO) に接続し、大動脈圧を LabChart 7.0 software (ADInstruments) で記録した。造影剤には Iomeron 350 (Eisai Co.Ltd., Tokyo, Japan) を使用し、臨床用造影剤注入装置 (Nemoto Kyorindo, Tokyo, Japan) から 0.4mL/s のスピードで約 2 秒間造影剤をラット右室に注入して造影した。この間に 100 枚の連続画像を撮影した。

まずベースラインとして人工呼吸管理下において吸気ガスが空気の状態で肺血管造影を行った。その後 10 分間待ち、HPV を誘発するために吸気ガスを低酸素ガス (10%O₂) に切り替えて 5 分間吸引させ、再び肺血管造影を行った。次に吸気ガスを空気に戻して 10 分間待ち、HPV の強度に対する β_3 AR の関与を観るために SR59230A を 7.5mg/kg で静脈内投与し 10 分程度待ってから肺血管造影

を行った。さらに 10 分間待ってから低酸素ガスに切り替え、5 分後に肺血管造影を行った (図 9A)。また、 β_3 AR による肺血管拡張作用として β_3 AR の下流に iNOS が位置することを確認するために下記の造影プロトコールを行った。ベースラインと HPV を撮影した後に、中枢神経性の交感神経シグナルを遮断するため hexamethonium bromide (C6, Wako, Osaka, Japan) を 25mg/kg で静脈内投与し、交感神経節を完全に遮断した。投与 10 分後に血管造影を行い、C6 の血管に対する影響を観察した。次に選択的 β_3 AR 刺激薬 CL316243 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) を 100 μ g/kg で静脈内投与し 10 分後に造影を行った。この CL316243 による肺血管拡張作用が事前の NOS 遮断によって消失するか検証するために、汎 NOS 阻害薬 L-NAME (50 mg/kg, i.v., Sigma-Aldrich) あるいは選択的 iNOS 阻害薬 L-NIL (3 mg/kg, i.v., Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を静注してから 10 分後に造影し、さらにその後に CL316243 を静注して同じく 10 分後に造影した (図 9B)。さらに、iNOS による HPV に対する修飾作用を評価するために、別のラット群に対して、L-NIL 静注後に低酸素ガスを曝露して血管造影を行い、L-NIL の有無による HPV の強度の違いを検証した (図 9C)。また、IH6 週間曝露で肺内に集簇するマクロファージの HPV に対する影響を評価するために、血管造影 3 日前に clodronate の気管内投与により肺内マクロファージを減少させたラット群に対して低酸素曝露して HPV の強度を評価した (図 9D)。

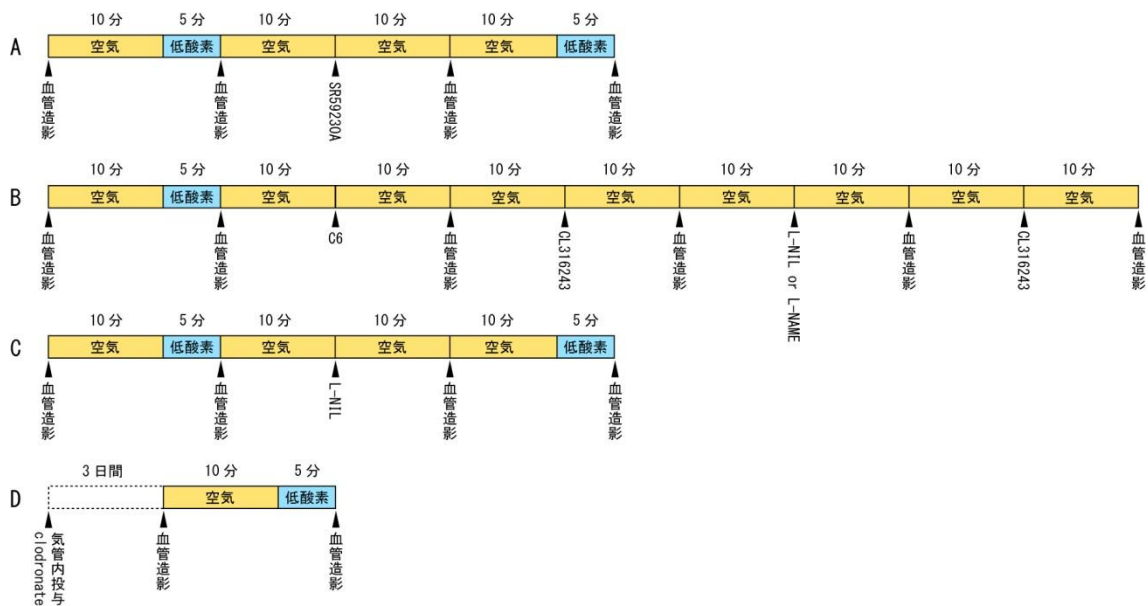


図9 SPring-8で行った肺血管造影プロトコール

A : SR59230A (β_3 AR 遮断薬) の HPV に対する効果を検証した。B : CL316243 (β_3 AR 刺激薬) の血管拡張作用、およびそれに対する L-NIL (iNOS 阻害薬) あるいは L-NAME (汎 NOS 阻害薬) による阻害効果を検証した。C : L-NIL の HPV に対する効果を検証した。D : IH6 週曝露直後に clodronate 気管内投与し、その3日後に HPV の程度を検証した。

9. 肺微小血管造影の画像解析

画像解析は Image Pro-Plus ver. 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) を使用して過去の論文に準じて行った(55)。各血管内径は Image Pro-Plus の line-profile 機能を使用して計測した。血管造影画像右下の幅 $50 \mu\text{m}$ のタングステンワイヤを長さの標準とした。HPV は血管内径によってその強度が異なることが既に分かっているため(55)、過去の論文に準じて肺血管を内径により $100\text{-}200 \mu\text{m}$ 、 $200\text{-}300 \mu\text{m}$ 、 $300\text{-}500 \mu\text{m}$ 、 $500 \mu\text{m}$ 以上の4段階に分け、HPV の程度をそれぞれの区域における収縮率として表示した。 $100 \mu\text{m}$ 以下の微小血管では定量が困難

であるため収縮率は算出しなかったが、描出される血管の本数としてカウントを行った。

10. 血行動態および心重量の評価

IH6 週間曝露後にラットを 3% isoflurane で麻酔し、心エコー検査(ProSound α10, Aloka, Tokyo, Japan)を実施した。肺血管抵抗はドップラーモードを使用して右室流出路血流波形における acceleration time (AcT) / ejection time (ET) で評価した。心エコーが終了した後に続けて右室圧の測定を行った。pentobarbital を 70 mg/kg で腹腔内投与し、人工呼吸管理下で前胸郭を外し心臓を露出した。Advantage PV catheter (Scisence, London, Canada)を右室に穿刺し、右室圧を描出した。データは PowerLab Software (AD Instruments)に記録した。大動脈の切断脱血により死亡させた後に心臓を摘出し、右室、左室の重量を測定した。右室肥大の指標として Fulton's index (右室重量/左室中隔重量比) と右室重量/体重比を用いた。

11. 肺切片の酵素抗体法による染色

IH6 週間曝露後にパラフィン固定肺を 5 μm にスライスしてスライドを作成した。脱パラフィン処理後にスライドをクエン酸三ナトリウム・二水和物溶液に浸して 5 分間電子レンジで加温し抗原賦活した。その後、3%過酸化水素水に 10

分間浸して内因性ペルオキシダーゼを消費枯渇させた。非特異的抗原抗体反応を防ぐためにブロッキングとしてウシ血清アルブミン溶液に 30 分間浸した。その後、スライドを一次抗体として抗 α -SMA 抗体(Sigma-Ardrich)あるいは抗 β_3 AR 抗体(Santa Cruz Biotechnology, California, CA)にそれぞれに曝露して 4°Cの冷蔵庫内で一晩静置した。翌日、PBS で 3 回洗浄し、各一次抗体に適した二次抗体に 30 分間室温で浸した。3 回の洗浄の後にスライドを PBS で希釈した ABC horseradish peroxidase (HRP) reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA)に 30 分間浸した。最後に Peroxidase Substrate Kit AEC (Vector Laboratories)で発色させ、水溶性封入剤で包埋処理した。画像は高解像度デジタルカメラ(DXM 1200F, Nikon, Tokyo, Japan)を搭載した光学顕微鏡(Eclipse E400 microscope, Nikon)でパソコンに投影し、画像解析ソフト(ACT-1 software, Nikon)で画像の保存を行った。

12. 肺血管の形態計測

肺血管中膜肥厚の評価は過去の論文にしたがった(57)。すなわち抗 α -SMA 抗体により酵素抗体法で染色した 50 ~150 μm の肺血管中膜の厚さを測定した。1 匹につき少なくとも 10 個以上の肺血管を無作為に抽出し、計測は Image Pro-Plus ver. 4.1 (Media Cybernetics)で行った。中膜肥厚度 (percent medial wall thickness) は 4 か所の内膜-外膜間距離の平均を最長と最短の外膜-外膜間距離の平均で除し

て百分率で示した。

13. 肺血管における β_3AR の発現量の組織学的定量

組織画像による β_3AR の発現定量は過去の論文にしたがった(58, 59)。Image Pro-Plus ver. 4.1 により赤色染色部を半自動的に選択することで自動的に光学濃度と面積を算出した。発現量は expression level score (ELS) として (選択部の平均光学濃度 - バックグラウンドの平均光学濃度) \times 血管面積に対する赤色染色部の面積比 (%) として表した。

14. 肺切片の蛍光抗体法による染色

脱パラフィン処理後にスライドをクエン酸三ナトリウム・二水和物溶液に浸して 5 分間電子レンジで加温し抗原賦活した。非特異的抗原抗体反応を防ぐためにブロッキングとしてウシ血清アルブミン溶液に 30 分間浸した。その後、一次抗体を添加し 4°C の冷蔵庫内で一晩静置した。翌日、三回の洗浄後に二次抗体に 60 分間浸した。画像は蛍光顕微鏡(BIOREVO BZ-9000, Keyence)で撮影した。使用した一次抗体は抗 ED1 (CD68) 抗体 (AbD Serotec, Oxford, UK) と抗 β_3AR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) である。

15. 気管支肺胞洗浄

IH6週間曝露後にラットを pentobarbital 70 mg/kg の腹腔内投与にて麻酔した後、大動脈切断による脱血法で死亡させた。気管を露出し切開した後、カテーテルを挿入して 5mL の PBS を肺内に注入し、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) として回収した。この作業を 4 回繰り返し、計 20mL の洗浄液を得た。

16. M1、M2 マクロファージのポジティブコントロール作成

LPS 曝露ラット(60)、silica 曝露ラット(61)から回収した肺胞マクロファージをそれぞれ M1、M2 マクロファージのポジティブコントロールとして使用した。前者は、ラットを 3% isoflurane で麻酔し、LPS 10mg/kg を腹腔内投与した後 24 時間経過したところで pentobarbital 麻酔下大動脈切断脱血法にて屠殺し、BALF を 20mL 回収した。後者は、ラットを pentobarbital 70 mg/kg の腹腔内投与にて麻酔した後、26 ゲージ針を使い silica 懸濁液(Immuno-Biological Laboratories, Shizuoka, Japan)100 μ L を気管内に注入し、3 日後に 20mL の BALF を回収した。

17. 肺マクロファージの免疫細胞化学染色

LPS 投与群、silica 投与群、IH 群、対照群より回収した BALF は 500 \times g で 10

分間遠心した(Kubota 1720, Tokyo, Japan)。沈殿物のみ回収し、2mL の PBS を加えて軽く混和した。100 μ L ずつスライドに滴下し、乾燥機にて一晩十分乾燥させた。スライドは冷却した 50% acetone に 10 分間浸して固定し 3 回洗浄した。続けて 1% Triton X-100 に 10 分間浸した。3 回の洗浄後、ウシ血清アルブミン溶液に 30 分間浸し、その後、一次抗体を滴下して 4°C の冷蔵庫内で一晩静置した。翌日、3 回の洗浄後に二次抗体を滴下し 60 分間室温で放置した。その後、蛍光顕微鏡(BIOREVO BZ-9000, Keyence)で画像を撮影した。使用した一次抗体は抗 ED1(CD68)抗体 (AbD Serotec)、抗 iNOS 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、抗 eNOS 抗体 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)、抗 nNOS 抗体 (Enzo Life Sciences)、抗 CD11c 抗体 (AbD Serotec)、抗 IL-6 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、抗 Ym1 抗体 (StemCell Technology, Vancouver, Canada)、抗 CD206 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 arginase-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 β_3 AR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)である。

18. 蛍光抗体法における染色陽性細胞数カウント

肺内のマクロファージ数および β_3 AR 陽性細胞率を算出するために、蛍光抗体法により染色した組織スライドを用いて ED-1 と β_3 AR の染色陽性細胞数をカウントした。左肺の少なくとも 10 箇所を無作為に拡大率 200 倍で撮影し、Image Pro

Plus ver. 4.1 (Media Cybernetics)でED-1あるいは β_3 AR陽性細胞をそれぞれ自動的にカウントした。

19. マクロファージにおける nitrite 合成能の評価

BALF で回収される細胞はほとんど全てがマクロファージであることが分かっている(62)。IH6 週間曝露後にラットから回収した BALF を $500\times g$ で 10 分間遠心した(Kubota 1720, Tokyo, Japan)。沈殿物のみ回収し、phenol red 無添加の 1% streptomycin 入り RPMI 1640 medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY)を添加してマクロファージ濃度を 1.4×10^5 cells / mL に調整した。直径 3cm の培養皿に 4.2×10^5 個ずつマクロファージを入れ、 37°C で 12 時間安定させた。その後、 $100 \mu\text{M}$ の CL316243 (Tocris Bioscience)、 $100 \mu\text{M}$ の isoproterenol (LKT Laboratories, Minneapolis, MN)、 $100 \mu\text{M}$ の CL316243 + $50 \mu\text{M}$ の L-NIL (Cayman Chemical)をそれぞれ添加した。30 時間のインキュベーションの後、培養液を回収し、Amicon Ultra Centrifugal Filter Units-10K (EMD Millipore, Billerica, MA)をスピニングカラムとして用い、 $7,000\times g$ 、20 分で遠心して除タンパク処理した。マクロファージから分泌された NO 量は安定代謝産物である nitrite (NO_2^-) 量として Griess 法により fluorometric $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Assay Kit-FX (Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)を用いて測定した。

20. Western blotting によるタンパク定量

-80°C保存した肺をミンチ状にしてよく混ぜた後に 0.1g を採り、cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を含んだ 1mL の RIPA buffer (0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) と混ぜた。不純物を除くために 1,500×g、5 分で遠心し、上清を解析に用いた。また BALF は 500×g、5 分で遠心し、沈殿物であるマクロファージに 1mL の RIPA buffer を添加した。このマクロファージ懸濁液をソニケーションした後にさらに 1,000×g、5 分で遠心して不純物を除去した。ホモジェネートした肺とマクロファージのサンプルを 95°C で 5 分間加熱し、9% の mercaptoethanol を含む 3 x Laemmli を加えた。各サンプルのタンパク濃度は Coomassie Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL)を用いて Bradford 法により定量した。タンパク量にして 30μg に相当する量を SDS-PAGE 法により 4-20%のグラジエントゲル内に展開後、PVDF 膜に転写した。ブロッキングは TBS-T 0.1%を加えた 3%スキムミルクを使用し、その後、一次抗体に曝露し 4°Cの冷蔵庫内で一晩静置した。翌日、3 回洗浄し、続けて二次抗体に 60 分曝露し、さらに 3 回洗浄した後に増感化学発光法で検出されたバンドをルミノ・イメージアナライザー (Image Quant Las 4000 mini, GE Healthcare, Waukesha, WI)で検量した。使用し

た一次抗体は、抗 β_3 AR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 iNOS 抗体 (Abcam)、抗 eNOS 抗体 (Enzo Life Sciences)、抗 nNOS 抗体 (Enzo Life Sciences)、抗 IL-6 抗体 (R&D Systems)、抗体 TNF α 抗体 (Abcam)、抗 CD 206 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 arginase-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Ym-1 抗体 (StemCell Technology)である。

21. real-time RT-PCR による mRNA 定量

肺組織をホモジェネートした後に ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を使用して RNA 抽出を行った。抽出液に混入した DNA の増幅を回避するために、DNase I (Takara Bio, Kyoto, Japan)で処理し、その後 TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan)を用いて cDNA に逆転写した。 β_3 AR の mRNA 量は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems Japan)を使用し、ABI PRISM 7000 sequence detector(Applied Biosystems Japan)で real-time RT-PCR 法により増幅し定量した。尚、内部標準には β -actin を用いた。

22. 統計学的処理

全ての統計解析は GraphPad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA)を用いて行った。 β_3 AR の mRNA 量と肺微小血管造影検査での血管径変化率は平均値±

標準誤差 (mean±S.E.M.) で示し、それ以外は全て平均値±標準偏差 (mean+±S.D.) で示した。2 群間解析には Student の t 検定 (unpaired)を用いた。多群間解析には有意差検定として one-way ANOV もしくは two-way ANOVA を行った後に Sidak 検定で多重比較を行った。p<0.05 を統計学的有意差と設定した。

第三章 結果

1. IH6 週間曝露後、IH 群は対照群に比べて有意に心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧が上昇した

IH6 週間曝露の体重、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧に対する影響を調べた。

IH 群と対照群との比較において体重に差はなかったが、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧はいずれも対照群に比べ IH 群は有意に高値であった (図 10)。

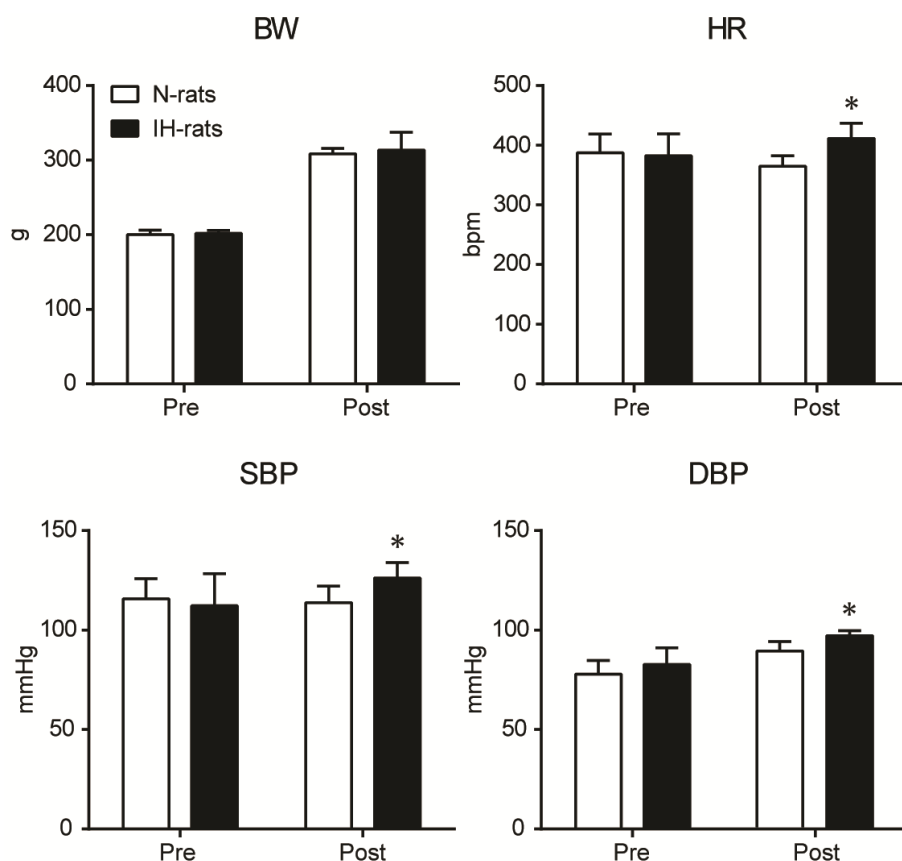


図 10 IH6 週曝露実験後の対照群と IH 群の体重、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧

IH6 週曝露終了後において IH 群と対照群で体重 (BW) に差は無いが、心拍数 (HR)、収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP) は IH 群で有意に高値であった。

Pre : 実験開始前、Post : 6 週間後。(n=6 each, mean \pm S.D.)。* P <0.05 vs N-rats.

2. IH6 週間曝露後の 24 時間蓄尿で IH ラットでは尿中カテコラミン濃度が有意に増加した

IH 曝露によって交感神経活性が亢進するか確かめるために、IH6 週間曝露終了直後に IH 群、対照群それぞれ 5 匹ずつを採尿用代謝ケージに入れて室内気で 24 時間蓄尿した。その結果、ドパミン・アドレナリン・ノルアドレナリンの 3 種とも、IH 群で対照群に比べて有意な増加を認めた (図 11)。図 10 と図 11 の結果は IH 群では交感神経が活性化しており、この活性化は IH 終了後、室内気のもとでも継続していることを示している。

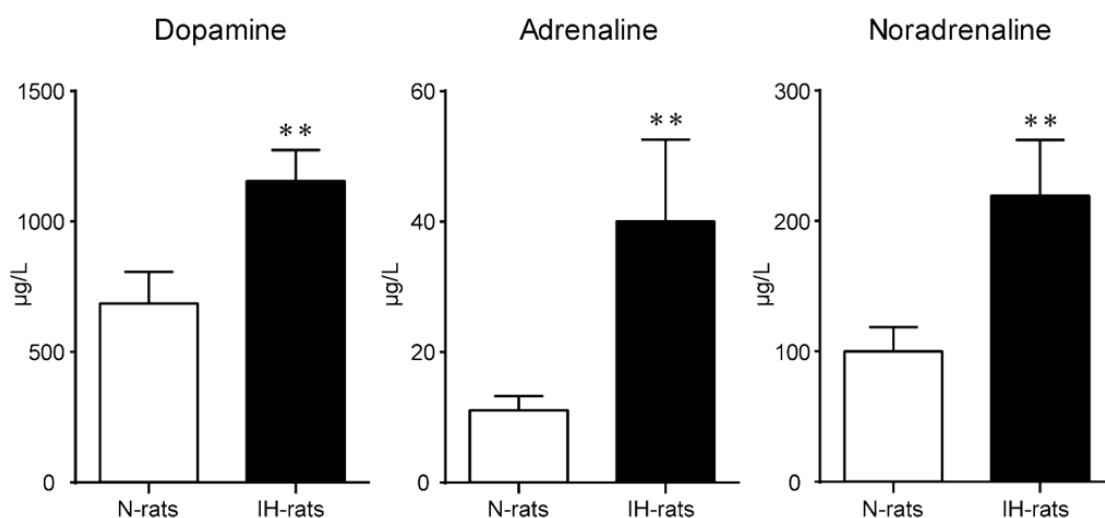


図 11 IH6 週間曝露後 24 時間蓄尿での尿中カテコラミン濃度

IH6 週間が終了した直後から代謝ケージで 24 時間蓄尿した。ドパミン、アドレナリン、ノルアドレナリンともに IH 群で著明に増加していた (n=5 each, mean ± S.D.)。 ** $P < 0.01$ vs N-rats.

3. IH 曝露により β_3AR を高発現したマクロファージが肺に集簇した

IH6 週間曝露が終了したパラフィン固定肺組織を用いて蛍光抗体法により ED-1 と β_3AR の二重染色を行ったところ、IH 群において ED1 陽性細胞、すなわちマクロファージが著増していた。また、これらのマクロファージにおける β_3AR 陽性率は対照群に比して明らかに高かった (図 12a-d)。BALF 由来の肺マクロファージを撒布したスライドを用いた ED-1 と β_3AR の蛍光二重染色でも IH 群で明らかに β_3AR 陽性率が高かった (図 12e)。酵素抗体法を用いて β_3AR 染色により肺内におけるマクロファージの分布を観察すると、IH 群では肺胞腔内のマクロファージ数が増加しているだけでなく、微小肺血管の周囲に集簇する像がしばしば見られた (図 13)。肺のホモジェネート液を使用して Western blotting と RT-PCR 法により β_3AR のタンパク量と mRNA 量を測定すると、対照群においても β_3AR は存在していたが、その発現量は IH 群で有意に増加していた (図 12f,g)。また Western blotting により BALF 回収マクロファージにおける β_3AR のタンパク量を定量すると、IH 群で有意に増加していた (図 12h)。 β_3AR は肺血管にも発現する可能性があるため、酵素抗体法により肺組織切片を染色し、直径 50~150 μm の肺血管における発現量を定量化したところ、血管内膜に認められる β_3AR の発現量は対照群に比して IH 群で有意に減少していた (図 14)。これらの結果より、IH 曝露により β_3AR は肺血管では発現減少するが、肺マクロファ-

ジでは発現増加することが明らかとなった。

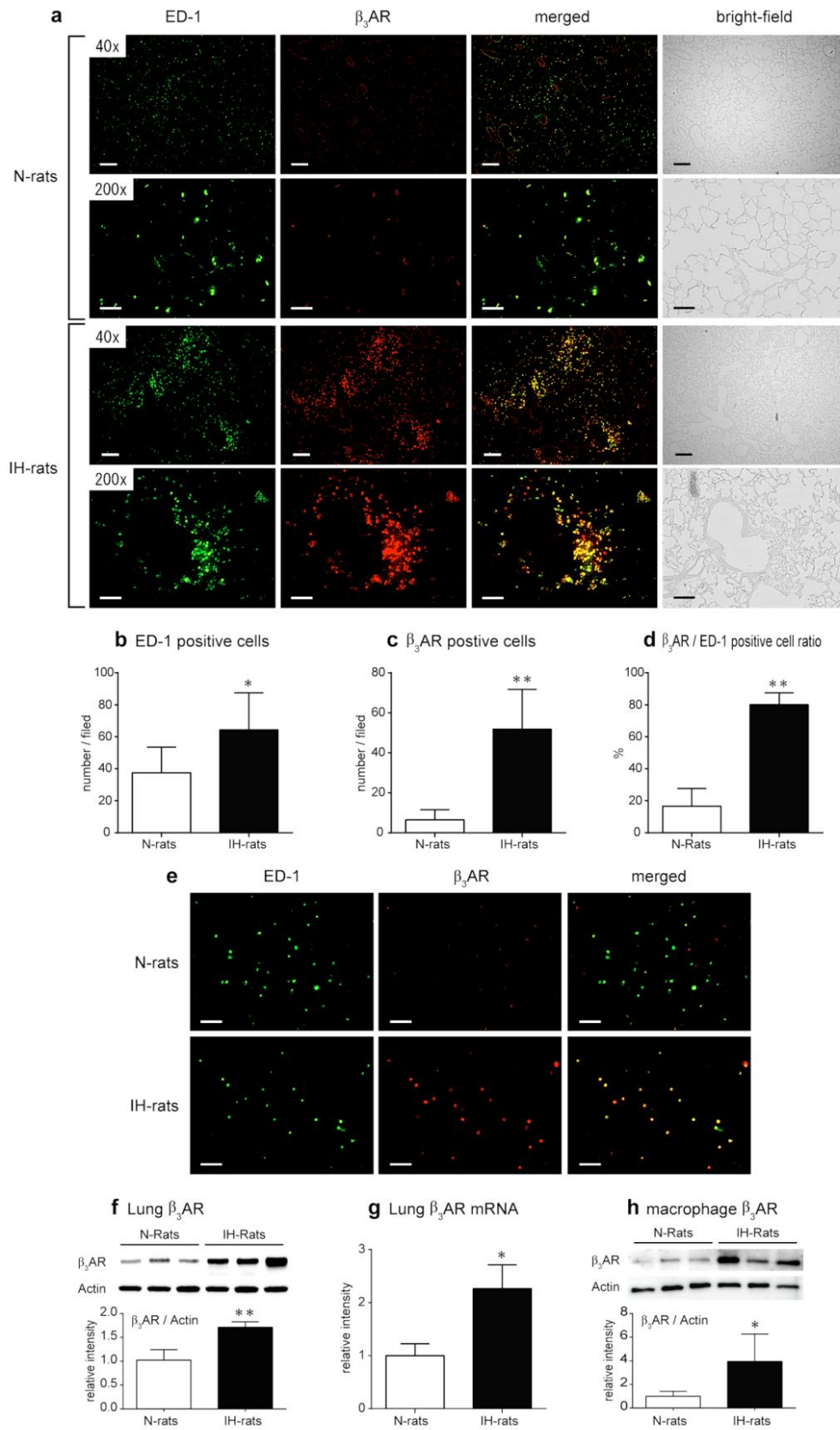


図 12 IH6 週間曝露後の肺におけるマクロファージ数と β_3AR の発現量

(a)対照群と IH 群の肺の蛍光抗体法による ED-1、 β_3AR の二重染色像。IH では ED-1 陽性（マクロファージ）細胞数が著増しており、 β_3AR 陽性も多い。IH のマクロファージは肺野全体に多いが、集簇する傾向にあり、一部は血管を取り囲んでいる。スケールバーは 40 倍で 200 μm 、200 倍で 50 μm 。(b,c)一視野当たりのマクロファージ数と β_3AR 陽性細胞数を定量化すると明らかな有意差を得た。IH では β_3AR の陽性率が極めて高い (n=6 each, mean \pm S.D.)。(d) β_3AR /ED-1 陽性率は IH で有意に高い (n=6 each, mean \pm S.D.)。(e)BALF で回収したマクロファージに対する蛍光抗体法による ED-1、 β_3AR の二重染色像。IH では β_3AR が染まるが、対照群ではほとんど染まらない。(f)Western blotting による肺組織中の β_3AR の発現量。IH 群で有意に発現が増加している (n=6 each, mean \pm S.D.)。(g)RT-PCR による肺組織中の β_3AR の発現量。IH 群で有意に発現が増加している (n=6 each, mean \pm S.E.M.) (h) Western blotting による BALF で回収したマクロファージの β_3AR の発現量。IH 群で有意に発現が増加している (n=5 each, mean \pm S.D.)。* P <0.05, ** P <0.01 vs N-rats.

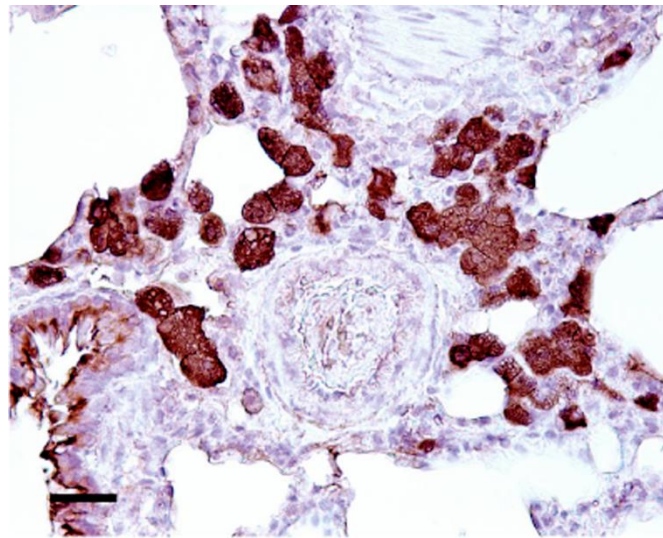


図 13 肺血管周囲に集簇するマクロファージ

肺組織切片の β_3AR 染色像。 β_3AR 陽性のマクロファージが肺小血管周囲に集簇している。スケールバーは 20 μm 。

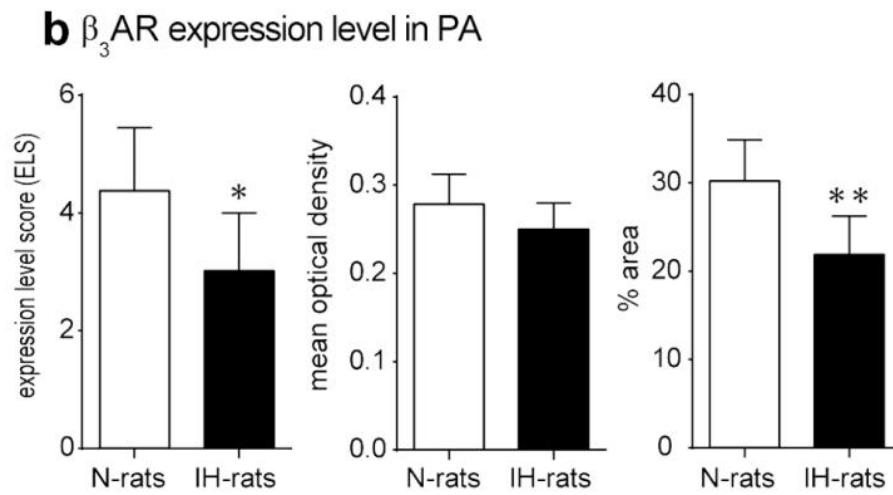
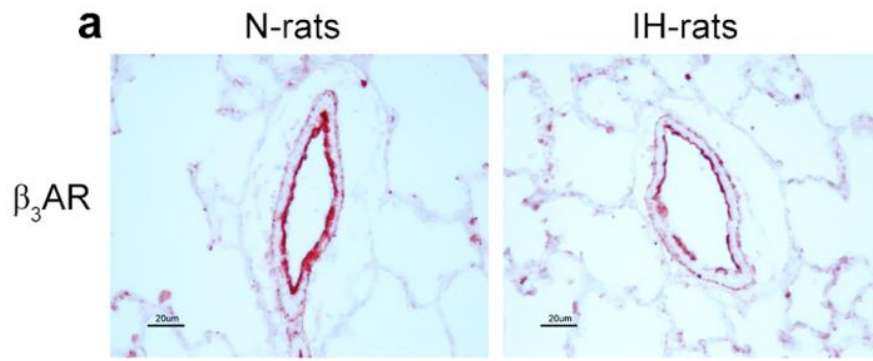


図 14 肺小血管における β_3 AR の分布および発現量

50~150 μ m の肺小血管において対照群も IH 群も主に肺血管内膜に β_3 AR は発現していた。単位面積当たりの発現量は両群で差はないが、発現面積は IH 群の方が有意に少なかった。その結果、合計としての β_3 AR 発現量 (expression level score, ELS) は IH 群の方が有意に少なかった (n=6 each, mean \pm S.D.)。* P <0.05, ** P <0.01 vs N-rats.

4. IH 群の肺に集簇するマクロファージは血中単球由来であり M1 型であった

IH ラットの肺で増加したマクロファージの由来を調べるために、単球が貪食する赤色蛍光リポソームを毎週 1 回静脈内投与しながら IH 曝露すると、IH 群では肺内に赤色を呈する細胞が多数集簇していた (図 15)。このことから、IH 群の肺に集簇するマクロファージは血中単球が肺に遊走したものであることが明らかとなった。この現象は肝臓でも高度に認められた (図 16)。次いで BALF で回収した肺マクロファージを M1 マクロファージ・マーカーである iNOS、CD11c、IL-6 抗体で蛍光染色すると、IH 群ではマクロファージにこれらのタンパクが高発現していたが対照群には発現を認めなかった。同様に M2 マクロファージ・マーカーとして Ym-1、CD206、arginase-1 で染色したところ、IH 群、対照群ともにこれらのタンパク発現を認めなかった (図 17)。M1、M2 マクロファージ・マーカーはそれぞれポジティブコントロールである LPS、silica 投与モデルで確認した (図 18)。また、染色に使用したのと同じのマクロファージを用いて Western blotting を行ったところ、M1 マーカーである iNOS、IL-6、TNF α はいずれも有意に IH 群で増加していたが、M2 マーカーである Ym-1、CD206、arginase-1 に有意差はなかった (図 19)。

一方、肺マクロファージには eNOS の発現が認められたが、対照群と IH 群とで発現の程度に差はなかった。nNOS は共に発現を認めなかった (図 20)。

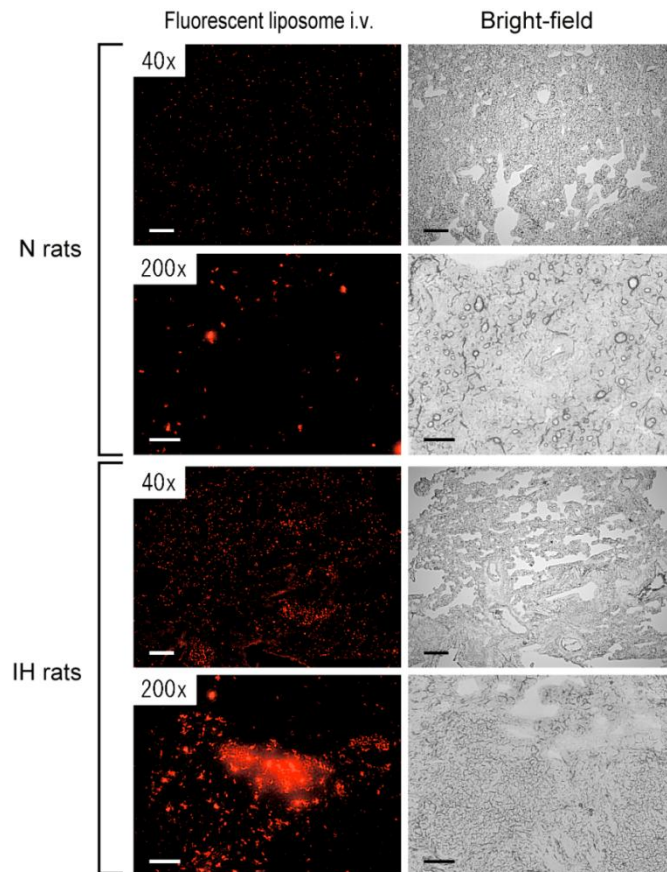


図 15 蛍光リポソームを間歇的静注した IH6 週曝露群の肺
赤色の蛍光リポソームを間歇的静注すると IH6 週曝露ラットの肺では蛍光リポソームを貪食した血中単球が多数肺内に遊走し集簇していた。スケールバーは 40 倍で 200 μm 、200 倍で 50 μm 。

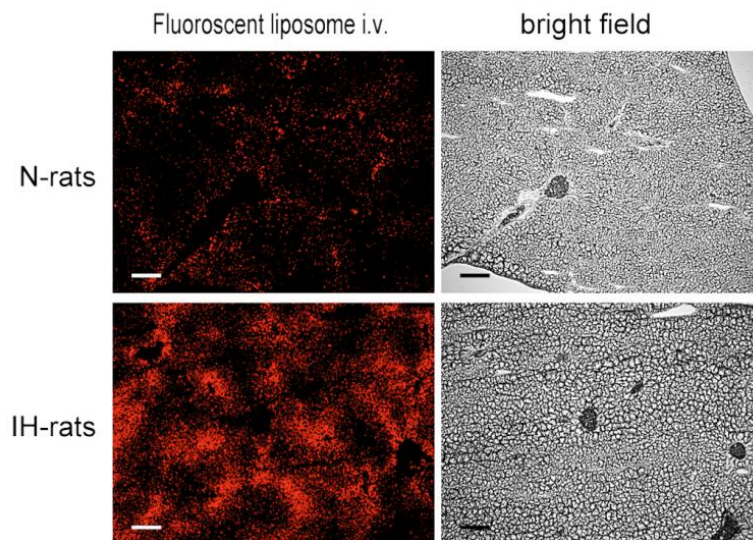


図 16 蛍光リポソームを間歇的静注した IH6 週曝露群の肝臓
肺と同様に蛍光リポソームを貪食した血中単球が多数肝臓に集簇していた。

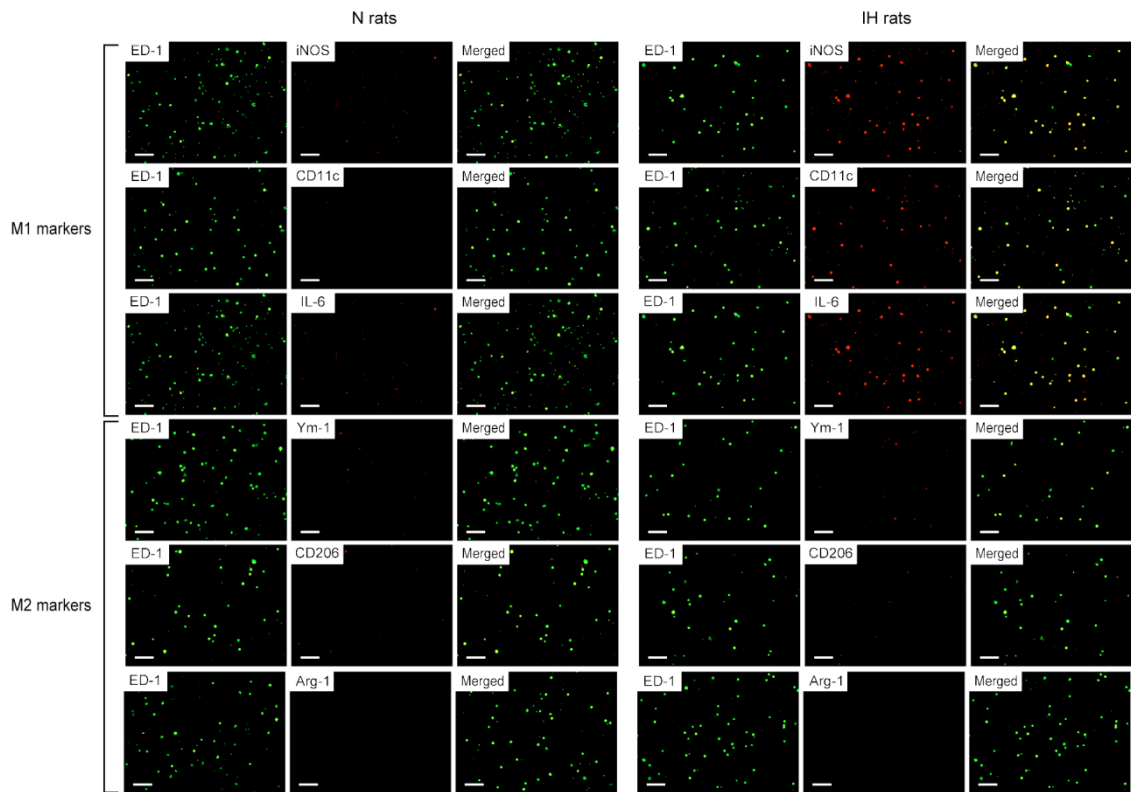


図 17 IH6 週曝露後の BALF 由来マクロファージに対する M1 および M2 マクロファージ・マーカーでの染色

M1 マクロファージ・マーカーとして iNOS、CD11c、IL-6 を、M2 マクロファージ・マーカーとして Ym-1、CD206、Arginase-1 を用いた。ED-1 との二重染色でマクロファージに染まっていることを確認した。対照群は全てのマーカーで染まらなかったが、IH 群は M1 マーカーは全て染まり、M2 マーカーは全て染まらなかった。この結果から IH 群の肺に増えているマクロファージは M1 マクロファージであることが分かった。スケールバーは 50 μ m。

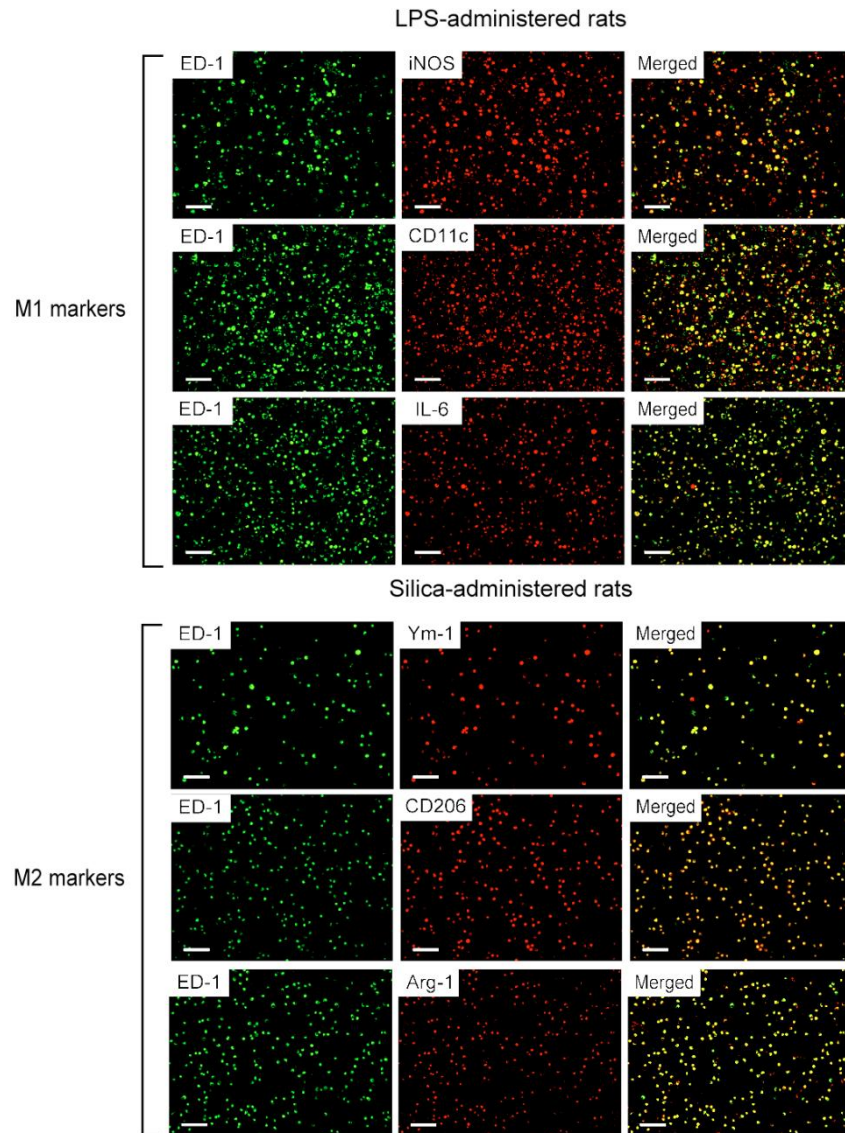


図 18 M1、M2 マクロファージのポジティブコントロール

M1 マクロファージのポジティブコントロールとして LPS 負荷ラット、M2 マクロファージのポジティブコントロールとして silica 負荷ラットの BALF 由来マクロファージを使用し、それぞれが M1、M2 マーカーで染まることを確認した。スケールバーは 50 μ m。

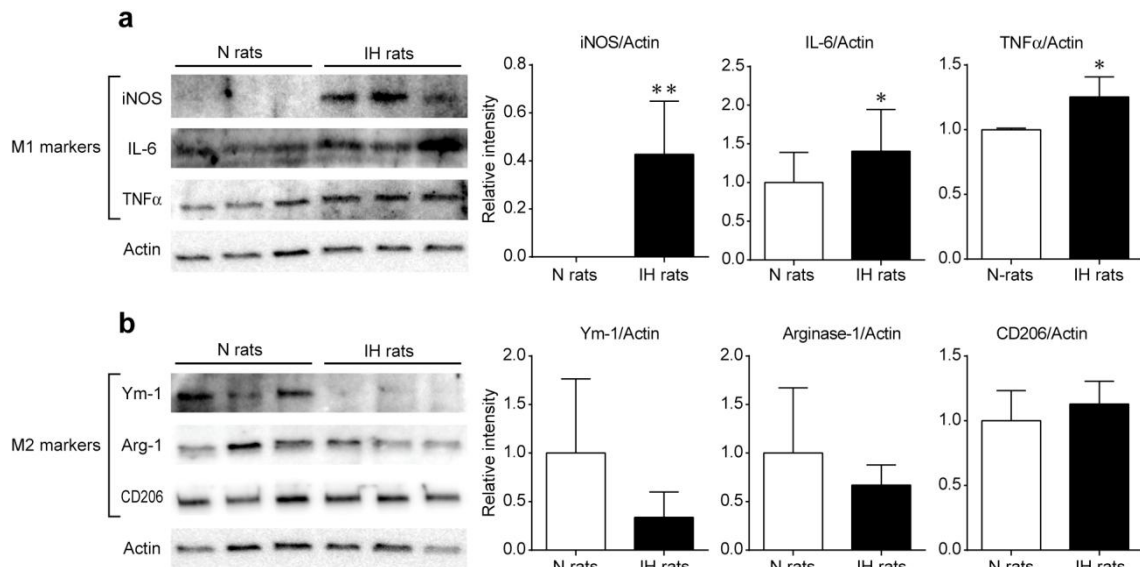


図 19 IH6 週曝露後の BALF 由来マクロファージでの M1 および M2 マクロファージ・マーカの発現量

IH6 週曝露後に回収した BALF より抽出したマクロファージを用いて、M1 マクロファージ・マーカーである iNOS、IL-6、TNF α 、あるいは M2 マクロファージ・マーカーである Ym-1、Arginase-1、CD206 のタンパク発現量を Western blotting で定量した。IH 群は M1 マクロファージ・マーカー全てで有意に増加していた。M2 マクロファージ・マーカーに有意な差はなかった。(n=5 each, mean \pm S.D.). * P <0.05 vs N-rats.

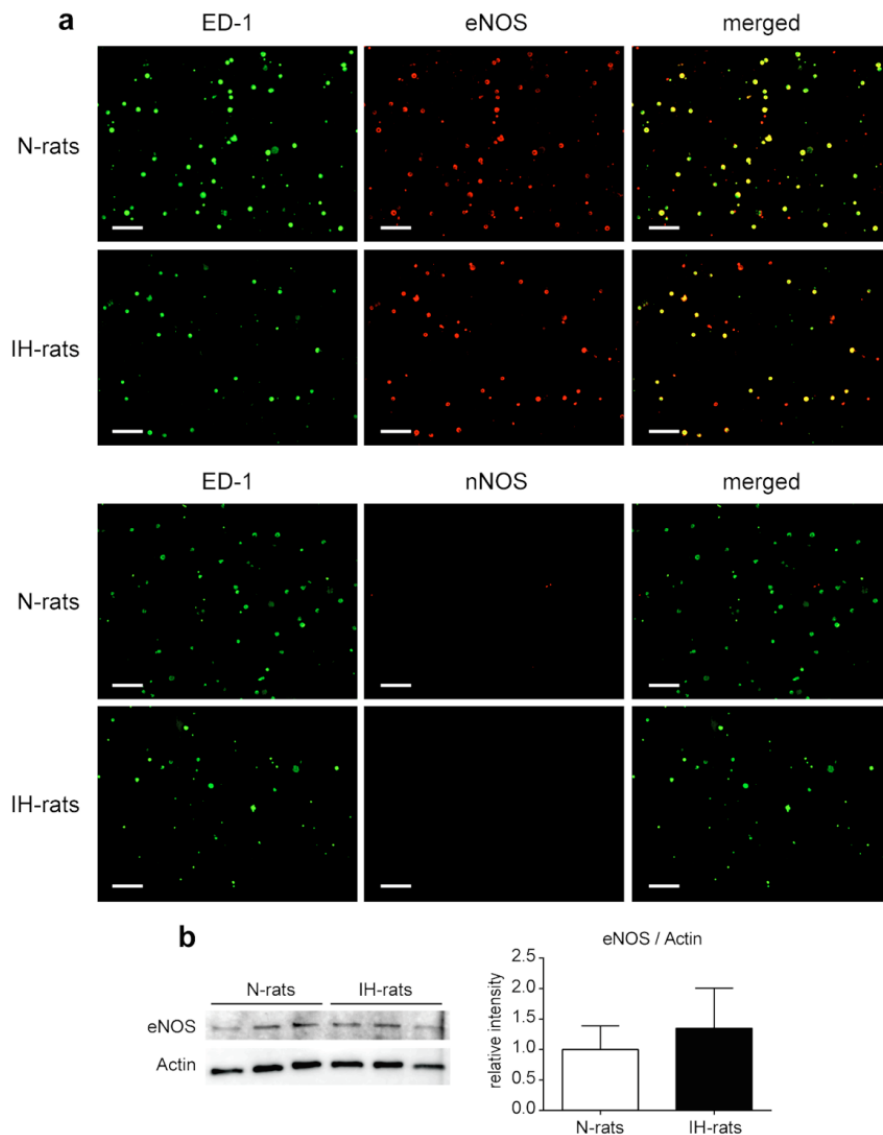


図 20 BALF 回収マクロファージにおける eNOS と nNOS の発現量

(a) 免疫染色で eNOS は両群共に発現を認めた。nNOS は両群とも発現を認めなかった。(b) BALF 回収マクロファージによる Western blotting では、eNOS の発現量は両群間で差がなかった (n=5 each, mean ± S.D.)。

5. IH 群の肺マクロファージは β_3 AR/iNOS 経路を介して NO を合成した

BALF で回収した肺マクロファージに対して CL316243 (β_3 AR 刺激薬) を投与すると IH 群では対照群に比して培養液中の nitrite (NO 代謝産物) 濃度が有意に上昇した。これは β_3 AR 刺激により NO 合成が増加したことを反映している。しかし、この nitrite 濃度上昇は同時に L-NIL (iNOS 阻害薬) を添加した場合には生じなかった。また、isoproterenol ($\beta_{1,2}$ AR 刺激薬) の投与では IH 群、対照群ともに nitrite 濃度は減少した (図 21)。これらの結果は、IH 群では M1 マクロファージの β_3 AR/iNOS 経路を介して NO 合成が促進することを示しており、一方で β_3 AR 刺激による NO 合成に $\beta_{1,2}$ AR は関与していないことを示している。

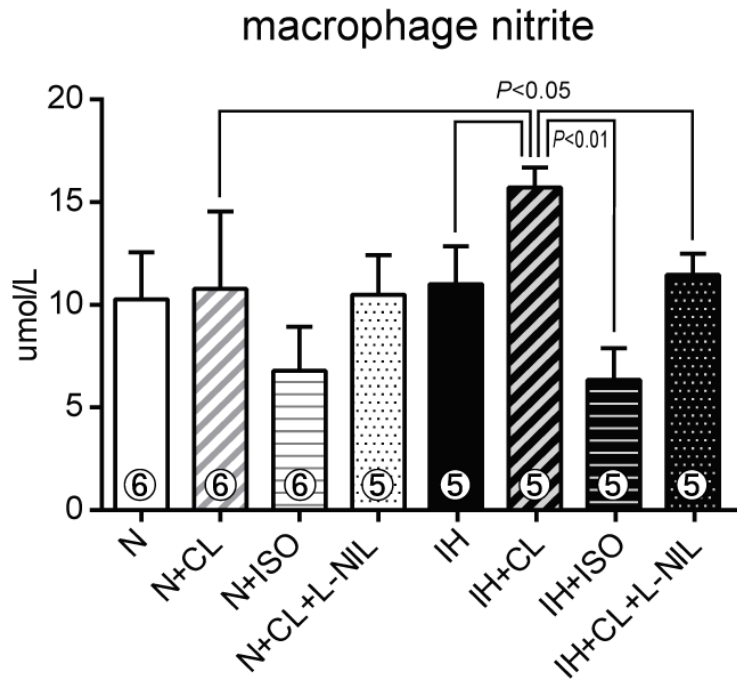


図 21 IH6 週曝露後の BALF 由来マクロファージの nitrite 合成能

IH6 週曝露後に回収した BALF より抽出したマクロファージを培養皿に移し 12 時間静置して安定させた後、 β_3 AR 刺激薬 CL316243 (CL)あるいは $\beta_{1,2}$ AR 刺激薬 isoproterenol (ISO)を負荷し 30 時間後に計測した。CL によって IH 群では nitrite 濃度が有意に上昇したが、対照群では変化はなかった。逆に ISO の負荷では両群ともに nitrite 合成量が減少した。IH 群において CL による nitrite の合成増加は同時に添加した iNOS 阻害薬 L-NIL によって消失した。両群における薬剤非投与群での nitrite 合成は培養皿に移動させてから 42 時間の間に eNOS を介して少しずつ合成された NO が nitrite に変化して培養液中に蓄積されたものと考えられる。各群の n 数はカラム中に表示 (mean \pm S.D.)。

6. IH 群では HPV が抑制されていた

IH 群と対照群の HPV の程度を評価するために、SPring-8 にラットを搬入し肺微小血管造影検査を行った。対照群のラットに対して 10%O₂ を急性曝露すると直径 100~500 μ m の肺血管で明瞭な血管収縮、すなわち HPV が観察され、血管収縮の程度は 200~300 μ m で最も強く、直径の変化率にして 24%収縮した。一方、IH 群では同様の低酸素曝露で HPV の程度が対照群に比して著しく弱く、100~500 μ m において対照群の半分程度の血管収縮率であった (図 22a,b)。これらの結果は IH6 週間曝露によって HPV は著しく抑制されることを示している。

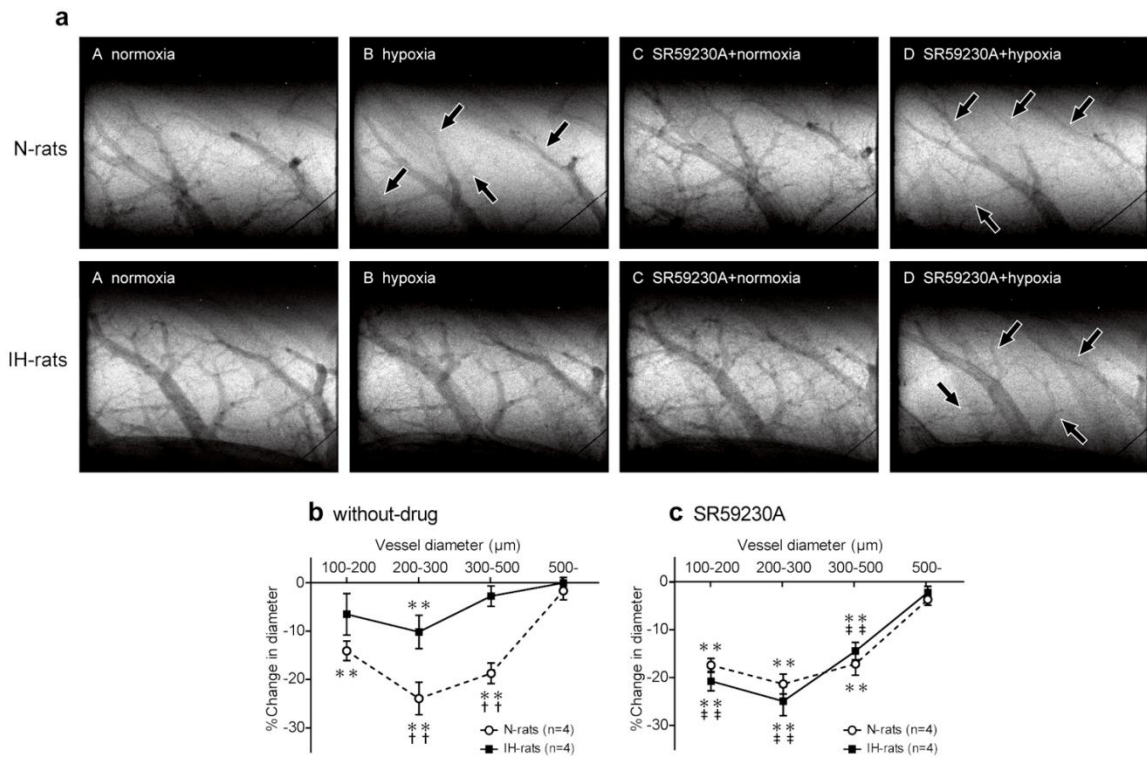


図 22 IH6 週曝露後のラットの HPV に対する β_3AR 阻害薬の影響

IH6 週間曝露後に SPring-8 にラットを搬入し、肺微小血管造影検査にて HPV を評価した。対照群では 10%O₂ 曝露により HPV が生じて血管が収縮した(矢印)。しかし IH 群では HPV が全般的に強く抑制されており、200~300µm の血管でのみ有意な収縮を示した。 β_3AR 遮断薬 SR59230A を静脈内投与してから 10%O₂ に曝露すると IH 群でも対照群とほぼ同じレベルの HPV を生じた (mean ± S.E.M.)。写真右下角の黒線はタングステンワイヤー (直径 50µm)。** $P < 0.01$ vs normoxic condition, †† $P < 0.01$ vs N-rats, ††† $P < 0.01$ vs without-drug.

7. IH 群では β_3 AR 刺激により iNOS を介して肺血管が拡張し HPV は抑制された

IH 群における HPV 抑制が β_3 AR を介している可能性を調べるために、IH 群で HPV が抑制されていることを観察した後で、SR59230A (β_3 AR 遮断薬) の前投与を行ってから再度、急性低酸素曝露を行った。まず SR59230A 自身の血管径に対する影響を観察したところ、SR59230A は IH 群、対照群ともに血管系に影響を及ぼさなかった (図 23)。次に低酸素曝露を行ったところ、対照群では SR59230A 投与は HPV の程度に影響しなかったが、IH 群では SR59230A 投与後に HPV が対照群と同程度の血管収縮レベルまで悪化した (図 22a,c)。したがって IH 群では β_3 AR を介した HPV 抑制機構が存在すると考えられた。

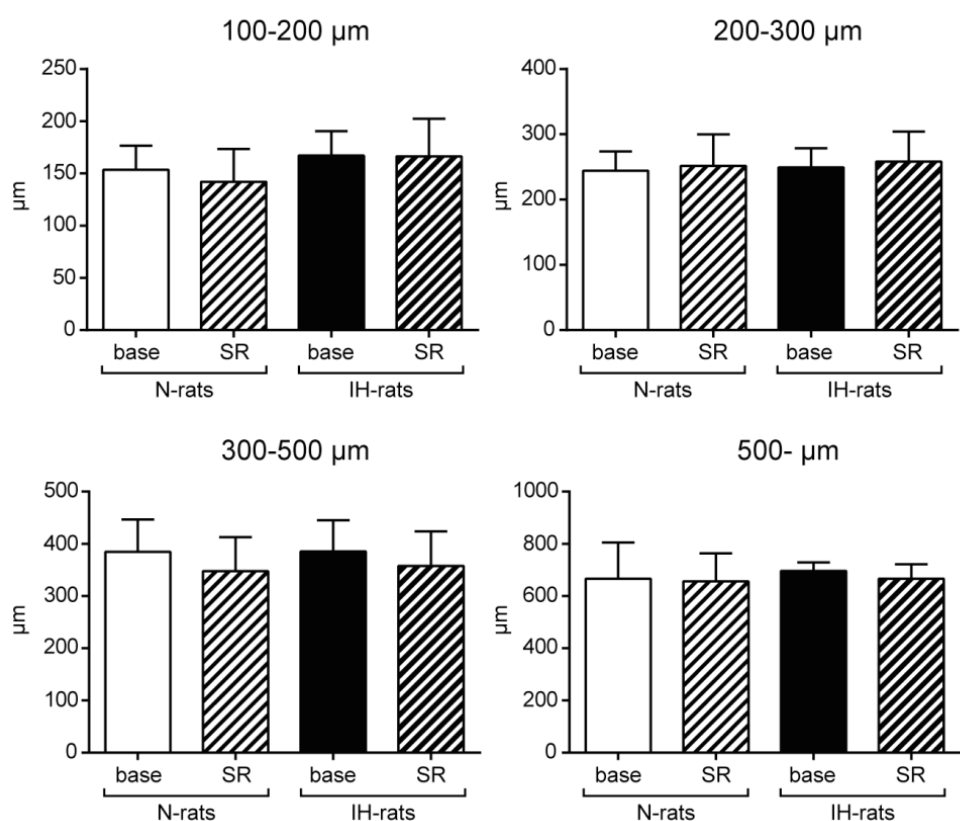


図 23 SR59230A の血管径に対する影響

対照群、IH 群ともに SR59230A は血管径に影響しなかった (n=4, mean ± S.D.)。

β_3 AR を介した HPV 抑制作用が、肺末梢における β_3 AR を介するか調べるために、中枢神経からのシグナルを hexamethonium bromide (C6、交感神経節遮断薬) の投与によって完全に遮断した後に、CL316243 を急性投与して肺血管の拡張応答が生じるかを血管造影にて検証した。まず C6 自体の血管径に対する影響をみたところ、C6 は両群ともに血管径に影響を及ぼさなかった (図 24)。次に CL316243 を投与すると対照群で血管拡張は生じなかったが、IH 群では 100~500 μ m の血管全てで著明な血管拡張を示した (図 25a,b)。また 100 μ m 以下の血

管数が肺野に著明に増加した (図 25a,d)。これらの結果から、IH 群では肺末梢における β_3AR の活性化に伴う肺血管拡張が HPV を抑制していると考えられた。

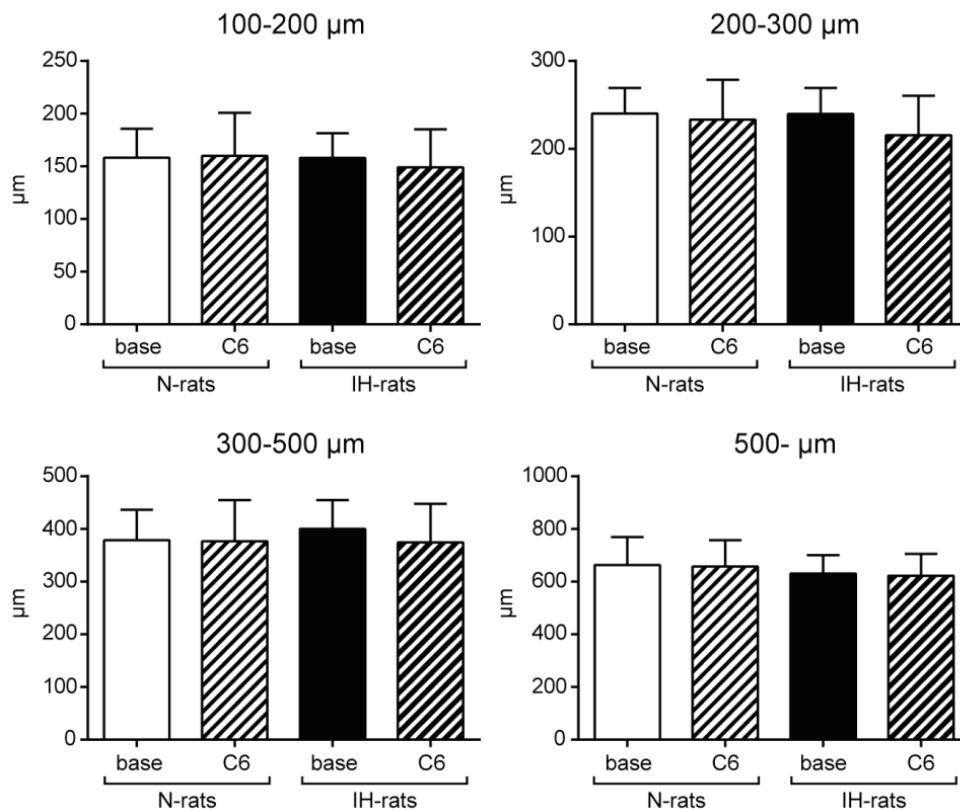


図 24 hexamethonium bromide (C6) の血管径に対する影響
 対照群、IH 群ともに C6 は血管径に影響しなかった (n=4, mean \pm S.D.)。

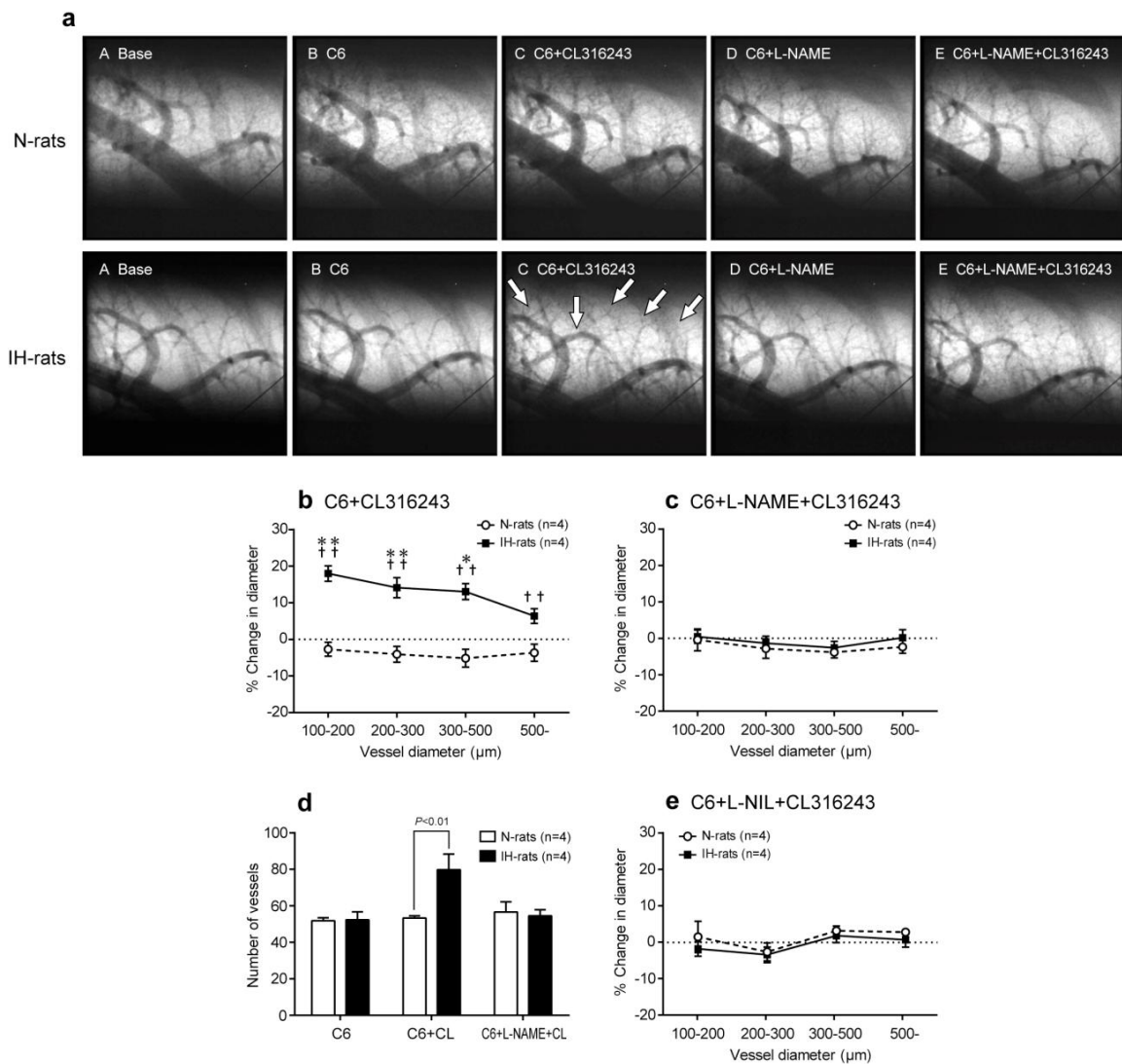


図 25 IH6 週曝露後のラットに対する β_3 AR 刺激薬の肺血管への影響

(a)IH6 週曝露後のラットに対して hexamethonium bromide (C6) を投与して交感神経節を遮断後に β_3 AR 刺激薬 CL316243 を投与すると、IH 群では血管拡張と共に直径 100 μ m 以下の細い血管が多数造影された (白矢印)。しかし汎 NOS 阻害薬 L-NAME を投与した後に CL316243 を投与すると血管拡張は起こらなかった。(b)IH 群では CL316243 投与で 100~500 μ m 全ての範囲で有意な血管拡張を示した (mean \pm S.E.M.)。(c)L-NAME 投与後に CL316243 を投与しても血管拡張は起こらない (mean \pm S.E.M.)。(d)血管数をカウントすると IH 群において CL316243 投与で造影血管数が著明に増加し、この効果は L-NAME 投与により消失した (mean \pm S.D.)。(e)CL316243 による IH 群での血管拡張効果は iNOS 阻害薬 L-NIL 前投与によっても消失した (mean \pm S.E.M.)。

次に我々は β_3 AR 依存性の肺血管拡張が NOS を介しているか調べるために、L-NIL あるいは L-NAME を投与した後に CL316243 を投与した。まず L-NIL または L-NAME それ自体の血管径に対する影響を調べたところ、L-NIL は対照群、IH 群ともに血管径に影響しなかったが、L-NAME は両群ともに血管径を有意に収縮させた。しかし L-NAME による血管収縮率は両群間で差はなかった (図 26, 27)。IH 群における CL316243 による血管拡張作用は L-NIL、L-NAME の前投与により完全に消失した (図 25a,c,e)。L-NAME 投与後では CL316243 投与によっても $100\mu\text{m}$ 以下の肺血管数は増加しなかった (図 25a,d)。また、IH 群に対して L-NIL を投与して急性低酸素曝露すると SR59230A と同程度の HPV が生じた (図 28)。これらの結果から β_3 AR 刺激による HPV 抑制作用は iNOS を介した NO 合成が主に関与していると思われる。

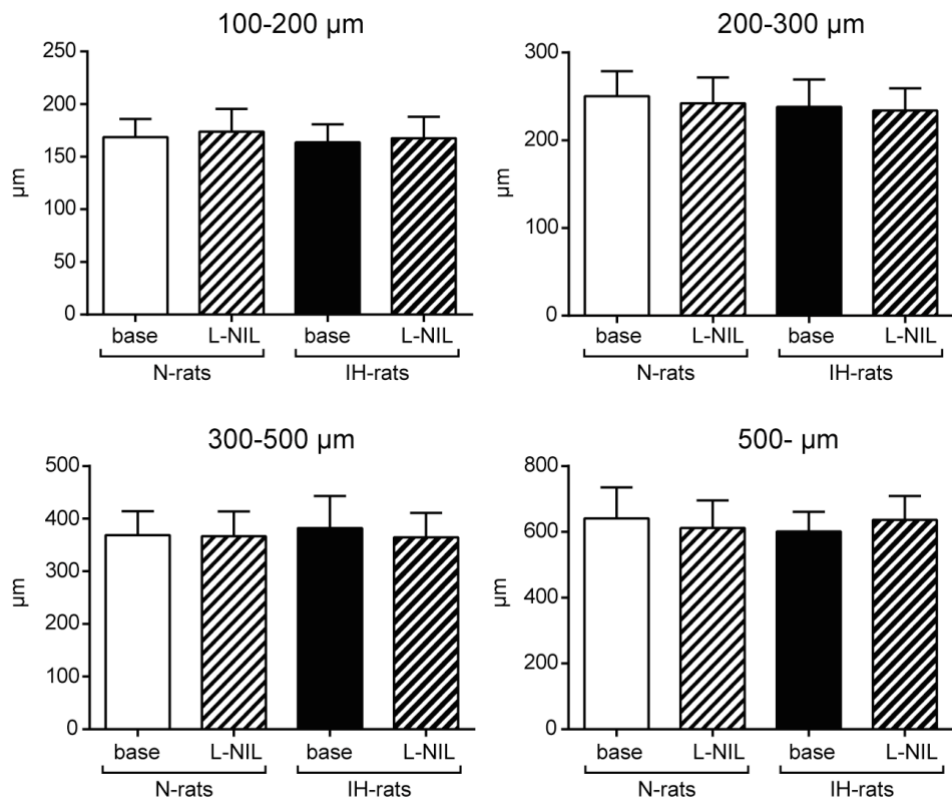


図 26 L-NIL の血管径に対する影響

対照群、IH 群ともに L-NIL は血管径に影響しなかった (n=4, mean ± S.D.)。

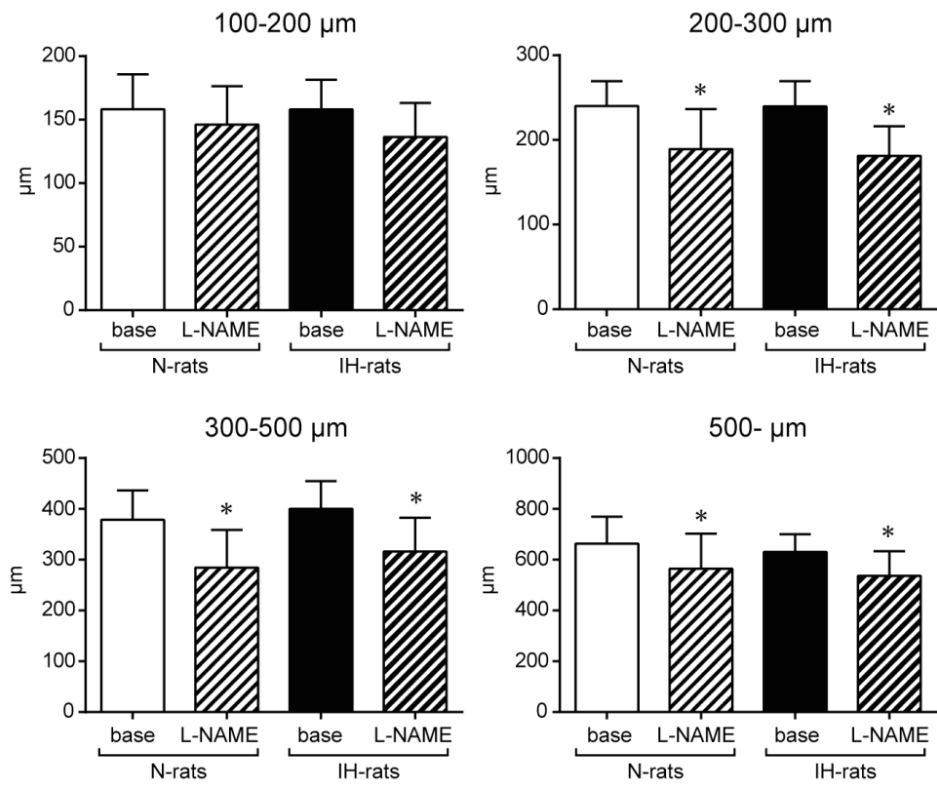


図 27 L-NAME の血管径に対する影響

L-NAME は 200~500μm の血管径において対照群、IH 群共に収縮させた (n=4, mean ± S.D.)。両群間での差はなかった。* $P < 0.05$ vs N-rats.

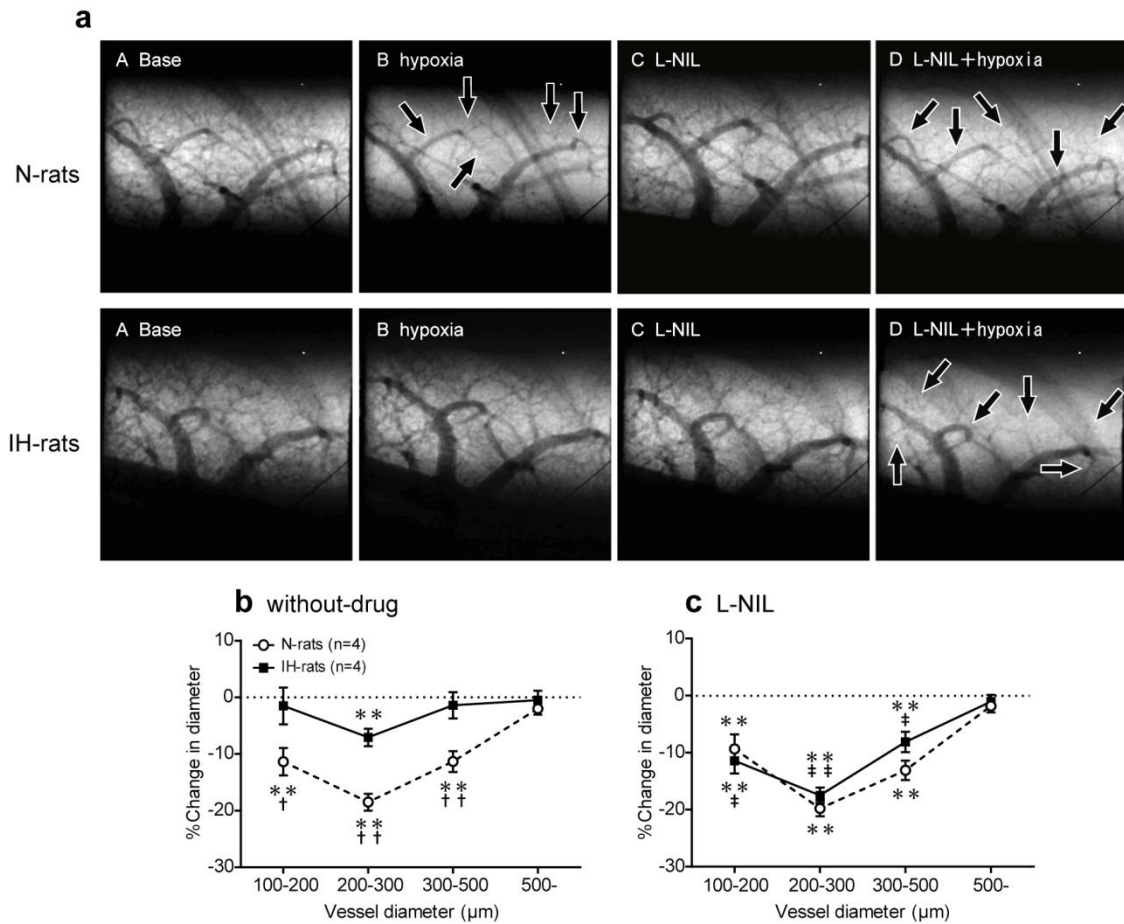


図 28 IH6 週間曝露後の HPV に対する iNOS 阻害薬の影響

(a)IH 群では L-NIL 投与により 10%O₂ 曝露で HPV が生じた (矢印)。(b,c)IH 群では 10%O₂ 曝露で HPV は抑制されているが、L-NIL 投与ではほぼ対照群レベルの HPV を生じた (mean ± S.E.M.)。**P*<0.01 vs normoxic condition, †*P*<0.05, ††*P*<0.01 vs N-rats, ‡*P*<0.05, ‡‡*P*<0.01 vs without-drug.

8. clodronate の急性気管内投与は IH 群の HPV を悪化させた

IH 群の肺に集簇している M1 マクロファージが HPV 抑制に関与しているか調べるために、IH6 週間曝露後に clodronate を気管内投与して肺内のマクロファージを大幅に減少させてから肺血管造影を行った。clodronate の気管内投与は IH 群の肺マクロファージ数を大幅に減少させたことを肺組織切片の免疫染色法で確認した (図 29a)。このラットに対して急性低酸素曝露を行い HPV の程度を定量したところ、IH 群においても対照群と同じ程度の HPV を生じた (図 29b,c)。対照群でも clodronate は肺マクロファージを減少させたが、HPV の程度に差は見られなかった。したがって IH 群で増加している M1 マクロファージは HPV 抑制に貢献するが、常在マクロファージは関与していないと考えられる。

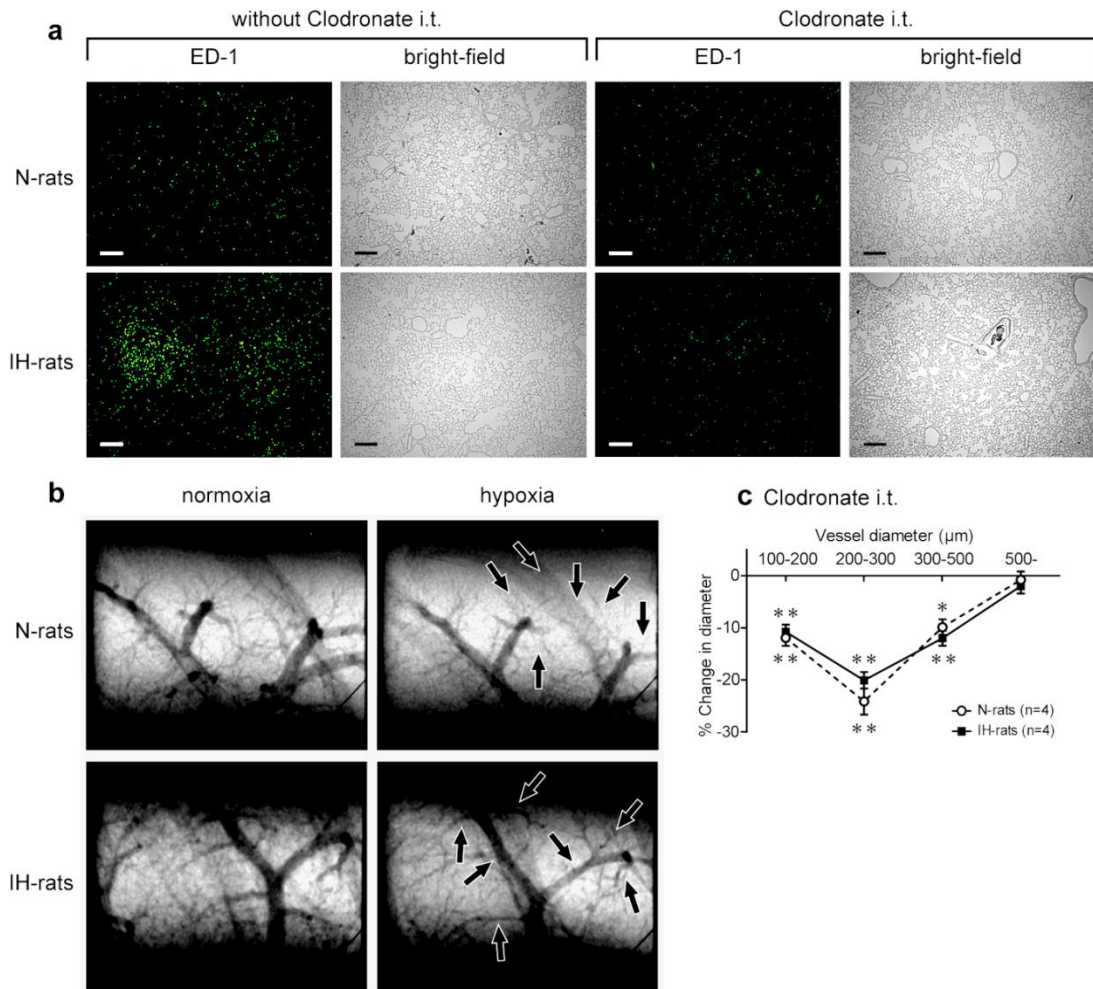


図 29 clodronate 気管内投与による肺マクロファージ消失の HPV に対する影響 (a)IH6 週間曝露後に clodronate を気管内に投与したラットの肺マクロファージを ED-1 で染色したもの。IH 群では clodronate によりマクロファージ数が著明に減少した。対照群でもマクロファージ数は減少した。スケールバーは 200 μm 。(b,c)clodronate 投与後 3 日目に肺微小血管造影検査を行い、10%O₂ 曝露による HPV の程度を調べたところ、IH 群でも対照群と同レベルの HPV を生じた (矢印) (mean \pm S.E.M.)。* P <0.05, ** P <0.01 vs normoxic condition.

9. clodronate あるいは SR59230A の慢性投与は IH 群で肺血管中膜肥厚を伴わない肺高血圧と右室肥大を惹起した

IH 群の肺に増加してくるマクロファージは血中単球由来であることから、IH6 週曝露の間、4 日置きに clodronate を静注して持続的に血中単球が極度に減少した状態を維持した。6 週間終了後に組織切片で確認すると、clodronate 間歇投与群では IH でも肺内のマクロファージは増加していなかった (図 30)。この IH 群では IH6 週間曝露終了後に右室重量/左室中隔重量比 (R/L+S)、右室重量/体重比 (R/BW)、右室収縮期圧 (RVSP) の有意な上昇を認め、心エコーで右室流出路加速時間/駆出時間比 (AcT/ET) は低下していた (図 31a)。AcT/ET の低下は肺血管抵抗の上昇を示す。したがって、これらの結果は肺高血圧、右室肥大を示している。また別のラット群で IH6 週間曝露中に SR59230A を慢性投与し続けると、clodronate と同様に肺高血圧と右室肥大を惹起した (図 31b)。これらの結果から、血中単球由来の肺マクロファージが β_3 AR を介して肺高血圧の発症を抑えていると考えられた。一方、これらの肺高血圧発症ラットの肺組織を用いて肺血管中膜肥厚の状態を評価したが、有意な肥厚は認めなかった (図 32)。したがって IH に由来する肺高血圧は肺血管中膜肥厚ではなく、主に HPV に起因すると考えられた。

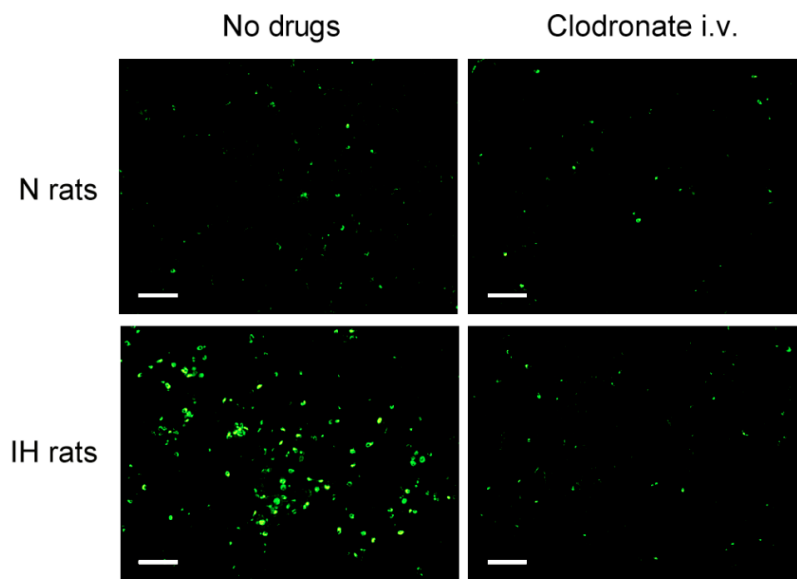


図 30 **clodronate** を間歇的静注した IH6 週曝露群の肺
clodronate を間歇的静注すると IH6 週間後の肺にはマクロファージが増加してい
なかった。スケールバーは 50 μm 。

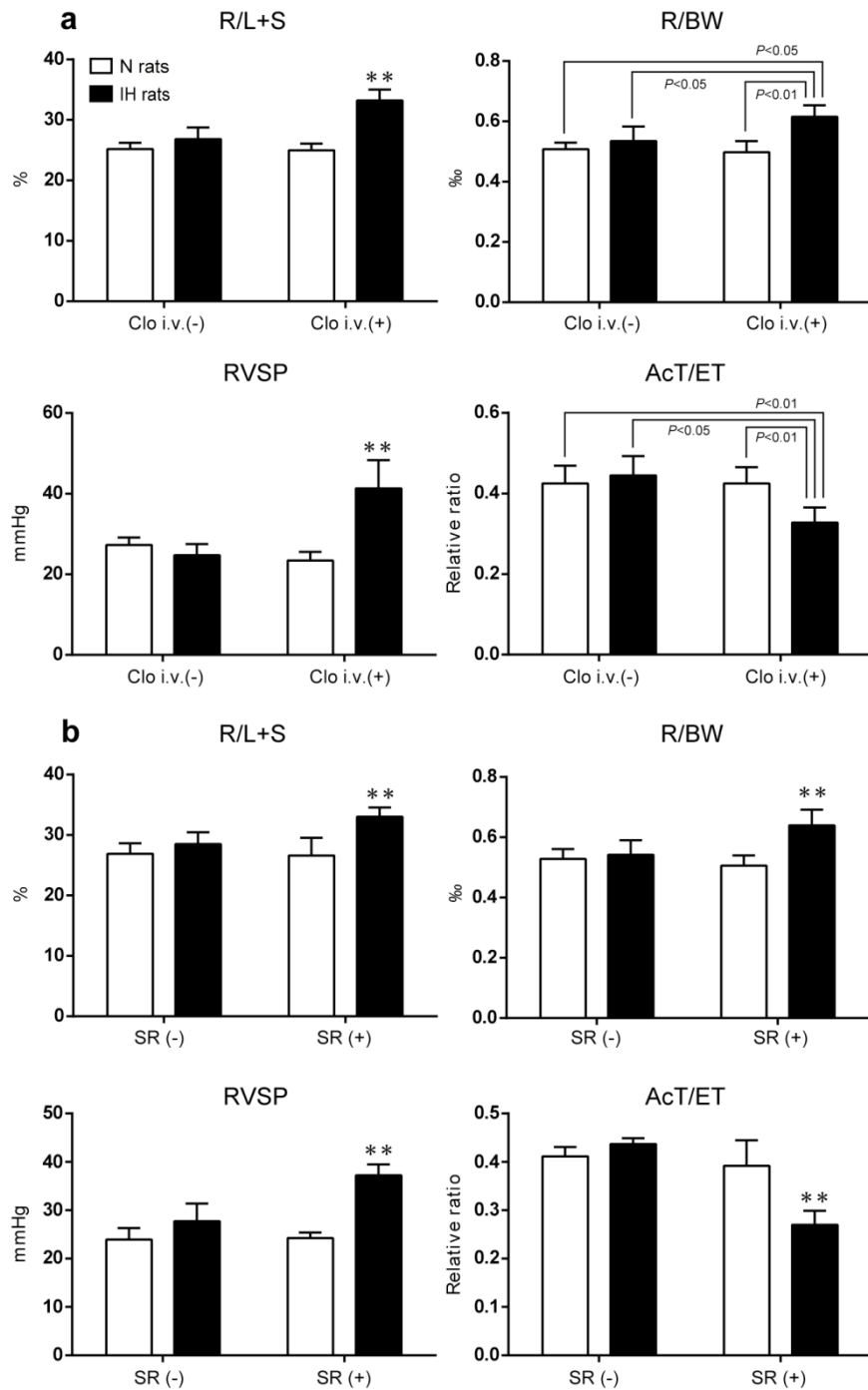


図 31 clodronate あるいは SR56230A の慢性投与の肺高血圧に対する影響
 (a)clodronate の間歇的静注あるいは(b)SR59230A の持続皮下注によって IH6 週間後に右室重量比の増大、右室収縮期圧の上昇、肺血管抵抗の上昇を認めた (mean ± S.D.)。clodronate 群は各 n=4。SR59230A 群は SR(-)の IH 群のみ n=5、他群は各 n=6。R/L+S：右室重量/左室中隔重量、R/BW：右室重量/体重、RVSP：右室収縮期圧、AcT/ET：右室流出路加速時間/駆出時間。 ** $P<0.01$ vs every other group.

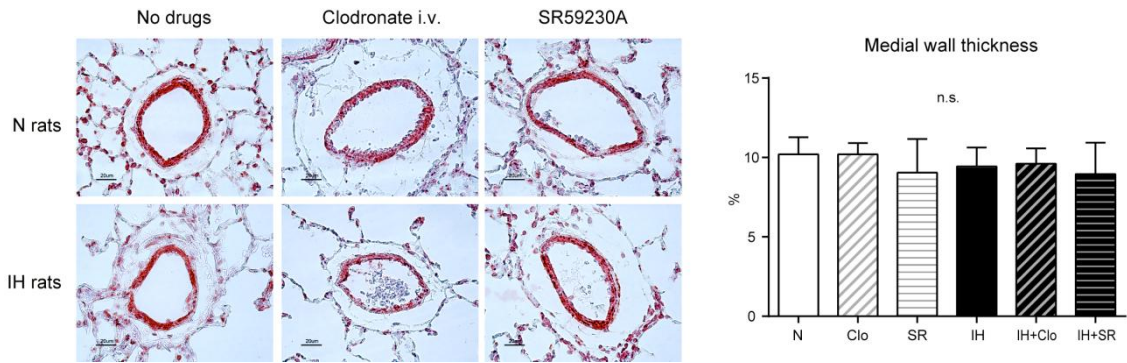


図 32 clodronate あるいは SR56230A の慢性投与の肺血管中膜に与える影響
 clodronate 間歇的静注群あるいは SR59230A 持続皮下注群における肺血管中膜の壁厚はいずれの群間にも有意差は見られなかった (mean ± S.D.)。薬剤なし群は各 n=5、clodronate 群は各 n=4、SR59230A 群は各 n=5。スケールバーは 20 μm。

第IV章 考察

本研究はIHにおける肺高血圧の発症メカニズムとその内因性抑制機構の一端を解明したものである。IH曝露は肺血管中膜肥厚を惹起しないが、HPVによって肺高血圧を生じることが分かった。しかし同時にIH刺激は肺内に血中単球を遊走させ、単球から分化したM1マクロファージは β_3 AR/iNOS経路を介してNOを分泌することで肺血管を拡張しHPVを抑制する。その結果、肺高血圧の発症は抑制されることが明らかとなった(図33)。これらの知見によって、SASやIH曝露動物で肺高血圧が必ずしも認められない理由を少なくとも部分的に説明することができる。これまでIHはCHと類似した低酸素刺激であると考えられてきたが、CH誘発性の肺高血圧とは発生機序が全く異なるものであり、マクロファージの関与についても根本的に異なる病態である。さらに、マクロファージは直接的に肺血流を制御する能力を有しており、肺循環の恒常性維持という重要な生理学的役割を果たしていることを示している。

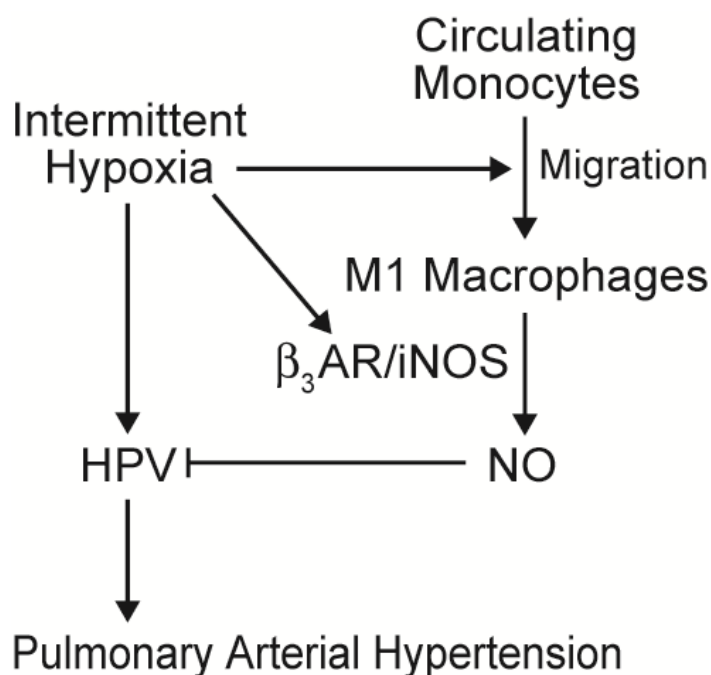


図 33 本研究で示した IH で肺高血圧発症が抑制される経路

血中単球が IH 刺激により肺内に遊走し、次いで M1 マクロファージに分化し、 β_3 AR、iNOS が共に高発現する。交感神経賦活による β_3 AR 活性化は iNOS を介した NO 分泌を促進し HPV を抑制する結果、肺高血圧の発症が防がれる。

IH6 週間暴露後、体重は両群間で差がなかったが、心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧は対照群に比べて IH 群では有意に上昇した。過去の IH 曝露による動物実験では交感神経活性化によって心拍数と血圧が上昇することが一般的に知られており、本研究でもその点で一致した(19)。

また IH 群では対照群に比して 24 時間蓄尿での尿中ドパミン、アドレナリン、ノルアドレナリン値はいずれも著明に上昇していた。IH6 週間曝露の終了翌日の 24 時間蓄尿であるため、蓄尿時にラットは IH 曝露されていないが、それにも関わらず IH 群ではカテコラミンが高値であったことから、IH 群では低酸素から解

放された後も少なくとも一定期間は交感神経が持続的に活性化していると推測される。この結果は、Sica らによる IH ラットにおける交感神経持続活性の結果と一致している(63)。また我々は本実験と同じ IH 条件で IH6 週曝露した後のラットに対して 8%O₂ を 5 分間曝露したところ、対照群に比べて著明に肺交感神経が活性化することを、神経シグナルの直接的計測によって見出した(64)。

Kumar によると、IH では急性低酸素曝露によってカテコラミンの過剰放出が生じるが、CH ではそうした現象は生じない(23)。したがって IH と CH では交感神経の活性化状態は著しく異なる。

肺微小血管造影の結果、IH 群では対照群に比して HPV が高度に抑制されていた。健常ラットでは HPV は血管径にして 100~500 μ m の範囲で生じ、HPV が最も強く生じるのは 200~300 μ m である。500 μ m 以上ではほとんど起こらない(65)。本実験でも対照群の HPV パターンは過去の報告と同様であった。一方、IH 曝露ラットでは 100~500 μ m 全体で HPV が対照群の半分程度に抑制されていた。直径 200~300 μ m の血管では対照群より弱いながらも統計学的に有意な HPV を認めたと、その他の血管径では有意な血管収縮は生じなかった。この HPV 抑制は β_3 AR 遮断薬の急性静脈内投与により解除され、全血管径において対照群と同等の HPV レベルを生じた。逆に、IH 群に交感神経節遮断薬 hexamethonium を投与して中枢からのシグナルを完全に遮断した状態で β_3 AR 刺激薬を投与すると、IH

では肺血管が 100~500 μm の血管径において有意に拡張した。この結果より、IH では肺末梢の $\beta_3\text{AR}$ を介する肺血管拡張能が亢進しており、HPV が抑制されていることが示された。IH では低酸素曝露時に肺交感神経が過剰興奮し、その際に放出されたカテコラミンが肺末梢の $\beta_3\text{AR}$ を刺激して HPV を抑制すると考えられる。

対照群ラットで $\beta_3\text{AR}$ の発現分布を免疫染色法により調べると主に肺血管内膜に発現していた。しかし $\beta_3\text{AR}$ 刺激薬は対照群では肺血管を拡張させなかった。この結果は、健常な肺血管の $\beta_3\text{AR}$ は肺血管拡張作用を持たない(66, 67)、あるいは持つとしても弱い作用である(68, 69)、との報告と一致している。一方、IH 群の肺血管では $\beta_3\text{AR}$ の発現量は減少しており、逆に肺に集簇するマクロファージで発現が増加していた。したがって IH 群の肺血管に認められる $\beta_3\text{AR}$ は $\beta_3\text{AR}$ 刺激薬を介した肺血管拡張に寄与していない可能性が高く、マクロファージの $\beta_3\text{AR}$ の関与が大きいと考えられる。我々は過去の研究で、IH 群では中枢神経の $\beta_1\text{AR}$ が肺交感神経活性化を介して HPV を抑制すること(70)、また IH 群では肺血管内膜に発現する $\beta_2\text{AR}$ が PI3kinase/Akt/eNOS 経路を介して HPV を抑制することを報告している(71)。これらの結果を総合すると、IH6 週曝露における HPV 抑制機構としては、中枢神経では $\beta_1\text{AR}$ 、肺血管では $\beta_2\text{AR}$ 、肺マクロファージでは $\beta_3\text{AR}$ がそれぞれ中心的な役割を担っていると考えられる。しかし文献によ

ると、持続的な高カテコラミン血症では β_1 AR、 β_2 AR は発現減少し、 β_3 AR は発現増加するという(26)。したがって、より長期の IH 曝露ではこれらの機能配分
が変化し、さらに β_3 AR を中心とした調節機構に移行する可能性がある。

ところで、一般にマクロファージには分化型として M1 型と M2 型があることが知られている。M1 マクロファージは“古典的活性化型マクロファージ”とも呼ばれ、炎症反応を促進して種々の外来性微生物から生体を防御している。M2 マクロファージは“代替的活性化型マクロファージ”と呼ばれ、むしろ抗炎症作用を示し、創傷治癒を促進する一方で腫瘍の増殖や転移を惹き起こすことで知られる(72)。CH 曝露マウスでは肺血管周囲への M2 マクロファージ集簇が報告されていることから、IH でも同様の現象を生じる可能性もあるが、実際には仮説通り M1 マクロファージの集簇が認められた。IH では少なくとも低酸素曝露 6 週間後の段階で M2 マクロファージは認めなかった。さらに、IH6 週間曝露後、直ちに clodronate を気管内投与して肺の M1 マクロファージを減少させた後に急性低酸素曝露すると、対照群レベルと同程度の HPV を発現した。これらの結果は、IH 群では M1 マクロファージが直接的に HPV を抑制することを示している。

我々の実験では、IH 群の肺マクロファージには iNOS が高発現していた。M1 マクロファージは LPS 投与モデルで分化誘導されることが知られており iNOS

の高発現を特徴とする(60, 73)。また、活性化したマクロファージから分泌された NO が血管を拡張させることが *ex vivo* の実験で報告されている(74, 75)。これらより M1 マクロファージが直接、血流制御する可能性を指摘できるが、これまでに *in vivo* 実験で直接証明した報告はなかった。本研究における血管造影検査では、IH 群において iNOS 阻害薬投与後の急性低酸素曝露によって対照群と同等レベルの HPV が観察され、かつ IH 群での β_3 AR 刺激薬による肺血管拡張反応は iNOS 阻害薬あるいは汎 NOS 阻害薬の前投与により消失した。これらの結果から、M1 マクロファージの iNOS から分泌された NO が HPV を抑制しており、iNOS の上流に β_3 AR が位置すると考えられた。

IH6 週間曝露後に BALF により回収したマクロファージの *in vitro* 実験で、IH 群では β_3 AR 刺激薬負荷で nitrite 合成、すなわち NO 合成が増加したが、対照群では NO 合成は増加しなかった。この IH の β_3 AR 刺激薬による NO 合成亢進は iNOS 阻害薬によって抑えられた。これらの結果は IH では交感神経活性化が M1 マクロファージにおける β_3 AR/iNOS 経路を賦活化し NO 分泌を増加させることを示している。isoproterenol によるマクロファージの β_1 AR および β_2 AR 刺激では、IH 群、対照群ともに NO 合成が抑制された。この現象は過去にも報告されているが、その機序は現在も不明である(76, 77)。マクロファージには iNOS 以外に eNOS も発現していたが、免疫染色および Western blotting で対照群と IH 群

とで発現量に差はなかった (nNOS はマクロファージに発現していなかった)。

マクロファージの eNOS はマクロファージが非活性化状態であっても少量の NO を持続的に分泌し続けることから(78)、薬剤を投与していない対照群と IH 群とで同量程度認められた nitrite 合成は、マクロファージを培養皿に移してから測定までの 42 時間に eNOS から少量ずつ合成された NO を反映していると考えられる。マクロファージにおける eNOS は生理学的に意義のある NO 合成には寄与していないと言われているため(79)、 β_3 AR 刺激による NO 合成を介した血管拡張は iNOS 経路であり eNOS は関与していないと考えられる。また、これまで β_3 AR と NOS の関連性については専ら心筋細胞の研究で報告されている。心筋細胞では eNOS、nNOS、iNOS のいずれもが β_3 AR 経路の下流に存在するが(30, 80-83)、最も報告が多いのは β_3 AR/eNOS 経路であり、 β_3 AR/iNOS 経路は我々の知るところ一報のみである(30)。他方、M1 マクロファージにおいて iNOS 発現を促進する受容体として TLR4(84)、IFN- γ R(85, 86)、TNF-R(87)などが知られているが、 β_3 AR についての報告はこれまでなく、M1 マクロファージにおける β_3 AR/iNOS 経路についての報告は本研究が初めてとなる。

一般に iNOS は発現量と NO 合成量が正比例し、発現している間は長時間にわたり多量の NO 合成を行うとされている(88)。しかしながら本研究における SPring-8 と細胞レベルでの実験の結果は、IH では短時間の β_3 AR 刺激で iNOS を

介した NO 分泌が促進することを示しており、 β_3 AR が iNOS の機能を制御している可能性を示す。確かに、従来の研究によると iNOS はリン酸化によって NO 合成能が変化すると報告されている。Tyryshkin らは iNOS のチロシン 1055 残基のリン酸化により iNOS の構造的安定性が向上し、NO 合成量が増加することを報告している(89)。また Gupta らはインテグリン $\alpha 9\beta 1$ の活性化が iNOS チロシン残基をリン酸化し、NO 合成量を増加させることを報告している。このインテグリン $\alpha 9\beta 1$ による iNOS リン酸化は時間依存性であり、インテグリン $\alpha 9\beta 1$ を活性化させると 5 分以内に iNOS リン酸化が亢進する(90)。このことは iNOS による NO 合成能はリン酸化を介して極めて短時間で変化することを示している。これらの研究報告から β_3 AR の刺激が iNOS をリン酸化し NO 合成量を増加させる可能性がある。

本実験では β_3 AR 遮断薬あるいは clodronate の慢性投与によって肺血管中膜肥厚を伴わない肺高血圧、右室肥大を呈した。このことから IH 誘発性肺高血圧に肺血管中膜肥厚は関与せず、HPV が中心的な役割を担う可能性が高く、HPV を抑制する内因性機構に依存して肺高血圧の発症が抑えられることが明らかとなった。ところで肺血管中膜肥厚は CH 曝露による肺高血圧の原因であり最も特徴的な所見である(91)。近年、CH 曝露による肺高血圧とマクロファージの関連性について顕著な進歩があった。Vergadi らは CH₄ 週曝露マウスにおいて低酸素曝

露開始後数日から認められる M2 マクロファージの誘導が、肺血管中膜肥厚を惹起し、肺高血圧発症に決定的な役割を果たすことを報告した(21)。本研究では IH6 週曝露ラットの肺で M2 マクロファージを認めなかったが、より短期間あるいは長期間の IH 曝露における M2 マクロファージについては検討していない。CH 曝露では曝露数日後から持続的な肺内 M2 マクロファージの増加を認めるが、IH 曝露では M2 マクロファージの誘導に長期間を必要とする可能性もあり、その場合、IH 曝露でも長期的には肺血管中膜肥厚を呈する可能性がある。

一方、慢性炎症が肺高血圧の肺血管リモデリングに寄与するとの報告もある(92-94)。M1 マクロファージは炎症を促進することから IH で M1 マクロファージによって肺血管リモデリングが生じる可能性も考えられる。IH 曝露は活性酸素種を発生させ、Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 依存性に Tumor necrosis factor α (TNF α)、Interleukin-8 (IL-8)、Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)を介して全身性に炎症を惹起する(95)。この全身性の炎症は IH 刺激による心血管障害、肝障害、膵障害の一因になると考えられている(96)。本研究でも、肺以外に肝臓にも著明な血中単球の増加を認めていることから、マクロファージの集簇は全身諸臓器に及んでいる可能性がある。IH6 週曝露時点では M1 マクロファージの肺内集簇を認めたものの肺血管中膜肥厚は生じていなかったが、より長期の曝露期間では炎症由来の肺血管リモデリングを惹起する可能性があり、M1 マクロ

ファージを介した HPV 抑制による肺高血圧発症の抑制は IH 曝露初期における代償作用の可能性がある。しかしながら炎症による肺高血圧の発現機序にはマクロファージ以外にリンパ球の関与も指摘されており、種々の chemokine や cytokine の発現状態が多大な影響を及ぼすことから、IH における炎症と肺高血圧に関しては今後、詳細な検討が必要である。

また蛍光リポソームあるいは clodronate の間歇的静注実験から、IH で肺内に増加する M1 マクロファージは血中単球に由来することが明らかとなった。ラットに対する CH 曝露で血中単球が肺血管周囲に集簇し高度の肺血管壁肥厚を生じるとの報告があり(20)、IH と CH では共に血中単球由来のマクロファージが肺に集簇する。しかし IH と CH ではマクロファージが分化するサブタイプが全く異なり、この差が交感神経の活性化の程度に依存している可能性がある。肺高血圧発症のメカニズムも IH では HPV が主体であるのに対して、CH では肺血管中膜肥厚が主体と、発生メカニズムが根本的に異なることが明らかとなった。SAS に還元して言えば、必ずしも全患者が肺高血圧を発症しないのは、血中単球由来肺マクロファージの分化や性質が影響している可能性がある。特に加齢によって chemokine や chemoreceptor の発現様式が変化することで(97, 98)、高齢者では血中単球が局所へ動員されにくくなる可能性がある。実際、我々の先行研究でも、9ヶ月齢ラットを用いて IH 曝露を行ったところ4週間目に有意な肺

高血圧、右室肥大を生じており(99)、明らかにラットの月齢によって同じ IH 曝露条件でも結果は異なっている。

本研究の応用

本研究ではマクロファージが IH 誘発性肺高血圧の発症を抑制していることを明らかにした。従来は SAS 患者の就眠時に認められる IH による HPV や交感神経系の活性化が肺高血圧の原因になると考えられていたが、むしろ交感神経の活性化はマクロファージの β_3 AR/iNOS 経路を介して肺循環保護に働いていることが示され、肺血流に対して代償的に作用していた。ヒトにおいても同様の現象が生じるか検証が必要である。近年、過活動膀胱の治療薬として β_3 AR 刺激薬が臨床応用されており(100)、同剤を使用すると SAS の肺で NO 合成が促進し肺循環が改善する可能性がある。

また、中心静脈圧が高いと喉頭部で鬱血を生じて上気道狭窄が起こりやすくなることが知られている(101)。静脈還流不全を伴う心不全を認める SAS では利尿剤を使用すると上気道周囲軟部組織の鬱血が減少して閉塞が改善し、SAS の重症度が著明に低下するとの報告がある(102)。したがって肺血管抵抗の上昇は静脈還流不全を介して上気道閉塞の重症化に寄与しうるため、SAS の重症度に影響する可能性がある。M1 マクロファージが肺血管収縮を抑制し静脈還流を維

持することは、右心室に対する圧負荷を軽減するだけでなく、SASの重症化を抑えている可能性もある。

さらに血中単球の局所への動員には chemokine の作用が重要である。マウスとヒトでは chemoreceptor の発現様式が類似していることが知られているが(98)、ヒトでは加齢により血中単球の CCR2 や CXCR3 の発現が低下する(97)。また興味深いことに CXCR3 が血管周囲へのマクロファージ集簇に必須との指摘もある(103)。したがって加齢によって chemokine の作用が減弱すると肺内にマクロファージが動員されにくくなる可能性があり、高齢者の方が肺高血圧を来しやすい、あるいは静脈系の負荷が大きくなり SAS が重症化しやすい可能性が指摘される。

本研究の限界と今後の課題

小動物に対する IH 曝露実験では低酸素刺激により過換気が起こるため、低炭酸ガス血症と呼吸性アルカローシスを生じるが、実際の SAS では気道閉塞のために高炭酸ガス血症と呼吸性アシドーシスを呈する。血中 CO₂ 濃度は IH に伴う肺高血圧の程度に影響を及ぼすため、SAS の病態解明には重要な因子である(35, 104-106)。しかし O₂ と CO₂ のいずれの影響が明らかにするためには、初段階として、まず IH の心血管障害に与える影響を検討し、次段階として CO₂ を加える

必要がある。本研究は IH のみの心血管障害に対する効果を検証したものである。価値がある。

我々の研究の結果では HPV の抑制により肺高血圧の発症が抑えられていると結論づけたが、我々の観察した HPV は IH6 週曝露終了後に麻酔および人工呼吸下で急性低酸素曝露して誘発した HPV を観察したものである。したがって IH 曝露中の覚醒状態のラットにおける HPV を直接観たものではない。実際には IH 曝露中の肺血管の収縮を直接観察する方法はないので、肺動脈圧もしくは右室圧の上昇をテレメトリーで経時的に追跡する方法が有用である。

また IH6 週間曝露により血中単球が肺内に遊走集簇する現象を認めたと、血中単球が肺に集簇する詳細なメカニズムは不明である。これを明らかにするためには chemokine に関する研究が必要である。

本研究での現象が実際の SAS 患者で生じているか確認するために、剖検例における肺高血圧、右室肥大と肺内マクロファージに関する研究が必要である。

結論

我々は、IH 曝露により肺内に動員された血中単球由来マクロファージが HPV を抑制することで肺高血圧の発症を抑えていることを明らかにした。このマクロファージは M1 型である。交感神経系から刺激を受けた M1 マクロファージは

β_3 AR/iNOS 経路を介して NO を分泌することで肺血管を拡張し HPV を抑制する。

また IH でみられる肺高血圧は肺血管中膜肥厚を伴わないことから、IH 誘発性肺高血圧の発症機序は主に HPV であると考えられる。これらのことから血中単球の肺内遊走の阻害や、M1 マクロファージへの分化抑制など、HPV 抑制機構に障害を生じると肺高血圧を発症する可能性がある。本研究は M1 マクロファージが IH 環境下において肺循環に対して保護的に作用していることを明らかにしたと同時に、SAS に合併する肺高血圧の発症機序解明におけるマクロファージの重要性を示唆している。

引用文献

1. Bradley TD, Floras JS. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet*;373:82-93. 2009.
2. 高田綾, 斉藤一之, 呂彩子, 村井達哉, 黒田直人. habitual snoring のみられた睡眠中の突然死例—閉塞性睡眠時無呼吸症候群との関連について—. *法医学の実際と研究*;42:237-242. 1999.
3. Uemura K, Harada K, Shiotani A, Kai A, Urata Y, Yasuhara M, et al. Obesity-sleep apnea (Pickwickian) syndrome: autopsy findings and a medicolegal review. *Leg Med (Tokyo)*;2:36-41. 2000.
4. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev*;92:367-520. 2012.
5. Sajkov D, McEvoy RD. Obstructive sleep apnea and pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*;51:363-370. 2009.
6. 百村伸一ほか. 循環器領域における睡眠呼吸障害の診断・治療に関するガイドライン. *Circ J Suppl II*;74:963-1051. 2010.
7. Marrone O, Bonsignore MR, Romano S, Bonsignore G. Slow and fast changes in transmural pulmonary artery pressure in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir*

J;7:2192-2198. 1994.

8. Sajkov D, Wang T, Saunders NA, Bune AJ, McEvoy RD. Continuous positive airway pressure treatment improves pulmonary hemodynamics in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*;165:152-158. 2002.

9. Marrone O, Bonsignore MR. Pulmonary haemodynamics in obstructive sleep apnoea. *Sleep Med Rev*;6:175-193. 2002.

10. Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension*;19:555-561. 1992.

11. Fletcher EC, Bao G. Effect of episodic eucapnic and hypocapnic hypoxia on systemic blood pressure in hypertension-prone rats. *J Appl Physiol*;81:2088-2094. 1996.

12. McGuire M, Bradford A. Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat. *Respir Physiol*;117:53-58. 1999.

13. Fagan KA. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol*;90:2502-2507. 2001.

14. Campen MJ, Shimoda LA, O'Donnell CP. Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol*;99:2028-2035. 2005.

15. Snow JB, Kitzis V, Norton CE, Torres SN, Johnson KD, Kanagy NL, et al. Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on

pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol*;104:110-118. 2008.

16. Nisbet RE, Graves AS, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Reed AL, Fan TH, et al. The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*;40:601-609. 2009.

17. Norton CE, Jernigan NL, Kanagy NL, Walker BR, Resta TC. Intermittent hypoxia augments pulmonary vascular smooth muscle reactivity to NO: regulation by reactive oxygen species. *J Appl Physiol*;111:980-988. 2011.

18. Reinke C, Bevans-Fonti S, Grigoryev DN, Drager LF, Myers AC, Wise RA, et al. Chronic intermittent hypoxia induces lung growth in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;300:L266-273. 2011.

19. Bosc LV, Resta T, Walker B, Kanagy NL. Mechanisms of intermittent hypoxia induced hypertension. *J Cell Mol Med*;14:3-17. 2010.

20. Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, et al. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol*;168:659-669. 2006.

21. Vergadi E, Chang MS, Lee C, Liang OD, Liu X, Fernandez-Gonzalez A, et al. Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of

hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*;123:1986-1995. 2011.

22. Baumgardner JE, Otto CM. In vitro intermittent hypoxia: challenges for creating hypoxia in cell culture. *Respir Physiol Neurobiol*;136:131-139. 2003.

23. Kumar GK, Rai V, Sharma SD, Ramakrishnan DP, Peng YJ, Souvannakitti D, et al. Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress. *J Physiol*;575:229-239. 2006.

24. Henricks PA, Van Esch B, Van Oosterhout AJ, Nijkamp FP. Specific and non-specific effects of beta-adrenoceptor agonists on guinea pig alveolar macrophage function. *Eur J Pharmacol*;152:321-330. 1988.

25. Liggett SB. Identification and characterization of a homogeneous population of beta 2-adrenergic receptors on human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis*;139:552-555. 1989.

26. Germack R, Dickenson JM. Induction of beta3-adrenergic receptor functional expression following chronic stimulation with noradrenaline in neonatal rat cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther*;316:392-402. 2006.

27. Cheng HJ, Zhang ZS, Onishi K, Ukai T, Sane DC, Cheng CP. Upregulation of functional beta(3)-adrenergic receptor in the failing canine myocardium. *Circ Res*;89:599-606. 2001.

28. Moniotte S, Belge C, Sekkali B, Massion PB, Rozec B, Dessy C, et al. Sepsis is associated with an upregulation of functional beta3 adrenoceptors in the myocardium. *Eur J Heart Fail*;9:1163-1171. 2007.
29. Dincer UD, Bidasee KR, Guner S, Tay A, Ozcelikay AT, Altan VM. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes*;50:455-461. 2001.
30. Maffei A, Di Pardo A, Carangi R, Carullo P, Poulet R, Gentile MT, et al. Nebivolol induces nitric oxide release in the heart through inducible nitric oxide synthase activation. *Hypertension*;50:652-656. 2007.
31. Pison U, Lopez FA, Heideimeyer CF, Rossaint R, Falke KJ. Inhaled nitric oxide reverses hypoxic pulmonary vasoconstriction without impairing gas exchange. *J Appl Physiol (1985)*;74:1287-1292. 1993.
32. Nagai H, Tsuchimochi H, Yoshida K-i, Shirai M, Kuwahira I. A novel system including an N2 gas generator and an air compressor for inducing intermittent or chronic hypoxia. *Int J Clin Exp Physiol*;1:307-310. 2014.
33. Sajkov D, Cowie RJ, Thornton AT, Espinoza HA, McEvoy RD. Pulmonary hypertension and hypoxemia in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*;149:416-422. 1994.

34. Bady E, Achkar A, Pascal S, Orvoen-Frija E, Laaban JP. Pulmonary arterial hypertension in patients with sleep apnoea syndrome. *Thorax*;55:934-939. 2000.
35. Fagan KA. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985);90:2502-2507. 2001.
36. Campen MJ, Shimoda LA, O'Donnell CP. Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* (1985);99:2028-2035. 2005.
37. Norton CE, Jernigan NL, Kanagy NL, Walker BR, Resta TC. Intermittent hypoxia augments pulmonary vascular smooth muscle reactivity to NO: regulation by reactive oxygen species. *J Appl Physiol* (1985);111:980-988. 2011.
38. Ma S, Mifflin SW, Cunningham JT, Morilak DA. Chronic intermittent hypoxia sensitizes acute hypothalamic-pituitary-adrenal stress reactivity and Fos induction in the rat locus coeruleus in response to subsequent immobilization stress. *Neuroscience*;154:1639-1647. 2008.
39. Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;293:H2971-2976. 2007.
40. Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care*

Med;167:1548-1553. 2003.

41. Fletcher EC. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* (1985);90:1600-1605. 2001.

42. Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*;37:511-515. 2001.

43. Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* (1985);86:298-305. 1999.

44. Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*;45:705-709. 2005.

45. Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, et al. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol* (1985);98:1691-1696. 2005.

46. Gozal D, Row BW, Kheirandish L, Liu R, Guo SZ, Qiang F, et al. Increased susceptibility to intermittent hypoxia in aging rats: changes in proteasomal activity, neuronal apoptosis and spatial function. *J Neurochem*;86:1545-1552. 2003.

47. Sharma SD, Raghuraman G, Lee MS, Prabhakar NR, Kumar GK. Intermittent hypoxia activates peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase in rat brain stem via

reactive oxygen species-mediated proteolytic processing. *J Appl Physiol* (1985);106:12-19.

2009.

48. Liu Y, Ji ES, Xiang S, Tamisier R, Tong J, Huang J, et al. Exposure to cyclic intermittent hypoxia increases expression of functional NMDA receptors in the rat carotid body. *J Appl Physiol* (1985);106:259-267. 2009.

49. Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;293:H2911-2918. 2007.

50. Madjdpour C, Jewell UR, Kneller S, Ziegler U, Schwendener R, Booy C, et al. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;284:L360-367. 2003.

51. Forbes A, Pickell M, Foroughian M, Yao LJ, Lewis J, Veldhuizen R. Alveolar macrophage depletion is associated with increased surfactant pool sizes in adult rats. *J Appl Physiol* (1985);103:637-645. 2007.

52. Danenberg HD, Fishbein I, Gao J, Monkkonen J, Reich R, Gati I, et al. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation*;106:599-605. 2002.

53. Polfliet MM, Goede PH, van Kesteren-Hendrikx EM, van Rooijen N, Dijkstra CD,

van den Berg TK. A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system. *J Neuroimmunol*;116:188-195. 2001.

54. Schwenke DO, Pearson JT, Umetani K, Kangawa K, Shirai M. Imaging of the pulmonary circulation in the closed-chest rat using synchrotron radiation microangiography. *J Appl Physiol* (1985);102:787-793. 2007.

55. Schwenke DO, Pearson JT, Umetani K, Kangawa K, Shirai M. Imaging of the pulmonary circulation in the closed-chest rat using synchrotron radiation microangiography. *J Appl Physiol*;102:787-793. 2007.

56. Sasaki S, Kobayashi N, Dambara T, Kira S, Sakai T. Structural organization of pulmonary arteries in the rat lung. *Anat Embryol (Berl)*;191:477-489. 1995.

57. Mizuno S, Bogaard HJ, Kraskauskas D, Alhussaini A, Gomez-Arroyo J, Voelkel NF, et al. p53 Gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;300:L753-761. 2011.

58. Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research-a review. *J Med Syst*;36:2621-2631. 2012.

59. Allen ACS, S. O. A. A novel technique of computer assisted image analysis to quantify molecular stress in cetaceans. Application Note #3, Image Pro-Plus.

60. Meyer M, Huaux F, Gavilanes X, van den Brule S, Lebecque P, Lo Re S, et al. Azithromycin reduces exaggerated cytokine production by M1 alveolar macrophages in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*;41:590-602. 2009.
61. Misson P, van den Brule S, Barbarin V, Lison D, Huaux F. Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. *J Leukoc Biol*;76:926-932. 2004.
62. Tsuji C, Shioya S, Hirota Y, Fukuyama N, Kurita D, Tanigaki T, et al. Increased production of nitrotyrosine in lung tissue of rats with radiation-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;278:L719-725. 2000.
63. Sica AL, Greenberg HE, Ruggiero DA, Scharf SM. Chronic-intermittent hypoxia: a model of sympathetic activation in the rat. *Respir Physiol*;121:173-184. 2000.
64. Shirai M, Tsuchimochi H, Nagai H, Gray E, Pearson JT, Sonobe T, et al. Pulmonary vascular tone is dependent on the central modulation of sympathetic nerve activity following chronic intermittent hypoxia. *Basic Res Cardiol*;109:432. 2014.
65. Schwenke DO, Pearson JT, Kangawa K, Umetani K, Shirai M. Changes in macrovessel pulmonary blood flow distribution following chronic hypoxia: assessed using synchrotron radiation microangiography. *J Appl Physiol*;104:88-96. 2008.
66. Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, Banquet S, et al. beta-adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric

oxide-dependent beta2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*;77:202-210.

2008.

67. Pourageaud F, Leblais V, Bellance N, Marthan R, Muller B. Role of beta2-adrenoceptors (beta-AR), but not beta1-, beta3-AR and endothelial nitric oxide, in beta-AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*;372:14-23. 2005.

68. Dumas M, Dumas JP, Bardou M, Rochette L, Advenier C, Giudicelli JF. Influence of beta-adrenoceptor agonists on the pulmonary circulation. Effects of a beta3-adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Eur J Pharmacol*;348:223-228. 1998.

69. Dumas JP, Goirand F, Bardou M, Dumas M, Rochette L, Advenier C, et al. Role of potassium channels and nitric oxide in the relaxant effects elicited by beta-adrenoceptor agonists on hypoxic vasoconstriction in the isolated perfused lung of the rat. *Br J Pharmacol*;127:421-428. 1999.

70. Shirai M, Tsuchimochi H, Nagai H, Gray E, Pearson JT, Sonobe T, et al. Pulmonary vascular tone is dependent on the central modulation of sympathetic nerve activity following chronic intermittent hypoxia. *Basic Research in Cardiology*;in Press. 2014.

71. Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Inagaki T, et al. beta2-Adrenergic receptor-dependent attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction

prevents progression of pulmonary arterial hypertension in intermittent hypoxic rats. *PLoS One*;9:e110693. 2014.

72. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*;11:723-737. 2011.

73. Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*;43:275-288. 1999.

74. Wang H, Mizuno R, Ohhashi T. Macrophage-induced nitric oxide and prostanoid dependent relaxation of arterial smooth muscles. *Can J Physiol Pharmacol*;75:789-795. 1997.

75. Hattori Y, Kasai K, Akimoto K, Thiemeermann C. Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages: involvement of a CD14-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*;233:375-379. 1997.

76. Sigola LB, Zinyama RB. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Immunology*;100:359-363. 2000.

77. Hasko G, Nemeth ZH, Szabo C, Zsilla G, Salzman AL, Vizi ES. Isoproterenol inhibits IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Brain Res Bull*;45:183-187. 1998.

78. Miles PR, Bowman L, Rengasamy A, Huffman L. Constitutive nitric oxide

production by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol*;274:L360-368. 1998.

79. Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem*;278:26480-26487. 2003.

80. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*;416:337-339. 2002.

81. Brixius K, Bloch W, Ziskoven C, Bolck B, Napp A, Pott C, et al. Beta3-adrenergic eNOS stimulation in left ventricular murine myocardium. *Can J Physiol Pharmacol*;84:1051-1060. 2006.

82. Birenbaum A, Tesse A, Loyer X, Michelet P, Andriantsitohaina R, Heymes C, et al. Involvement of beta 3-adrenoceptor in altered beta-adrenergic response in senescent heart: role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology*;109:1045-1053. 2008.

83. Amour J, Loyer X, Le Guen M, Mabrouk N, David JS, Camors E, et al. Altered contractile response due to increased beta3-adrenoceptor stimulation in diabetic cardiomyopathy: the role of nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide. *Anesthesiology*;107:452-460. 2007.

84. Maa MC, Chang MY, Chen YJ, Lin CH, Yu CJ, Yang YL, et al. Requirement of

inducible nitric-oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated Src induction and macrophage migration. *J Biol Chem*;283:31408-31416. 2008.

85. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*;5:953-964. 2005.

86. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology*;2:59. 2005.

87. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*;3:23-35. 2003.

88. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*;75:639-653. 2004.

89. Tyryshkin A, Gorgun FM, Abdel Fattah E, Mazumdar T, Pandit L, Zeng S, et al. Src kinase-mediated phosphorylation stabilizes inducible nitric-oxide synthase in normal cells and cancer cells. *J Biol Chem*;285:784-792. 2010.

90. Gupta SK, Vlahakis NE. Integrin alpha9beta1 mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase. *J Cell Sci*;122:2043-2054. 2009.

91. Ma W, Han W, Greer PA, Tudor RM, Toque HA, Wang KK, et al. Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease. *J Clin Invest*;121:4548-4566. 2011.

92. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, et al. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*;11:554-559. 1998.
93. Olivetta E, Percario Z, Fiorucci G, Mattia G, Schiavoni I, Dennis C, et al. HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J Immunol*;170:1716-1727. 2003.
94. El Chami H, Hassoun PM. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*;55:218-228. 2012.
95. Ryan S, McNicholas WT. Intermittent hypoxia and activation of inflammatory molecular pathways in OSAS. *Arch Physiol Biochem*;114:261-266. 2008.
96. May AM, Mehra R. Obstructive sleep apnea: role of intermittent hypoxia and inflammation. *Semin Respir Crit Care Med*;35:531-544. 2014.
97. Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol*;11:30. 2010.
98. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*;211:609-618. 2006.

99. Nara A, Nagai H, Shintani-Ishida K, Ogura S, Shimosawa T, Kuwahira I, et al. Pulmonary Arterial Hypertension in Rats Due to Age-related Arginase Activation in Intermittent Hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014.
100. Leone Roberti Maggiore U, Cardozo L, Ferrero S, Sileo F, Cola A, Del Deo F, et al. Mirabegron in the treatment of overactive bladder. *Expert Opin Pharmacother*;15:873-887. 2014.
101. Shepard JW, Jr., Pevernagie DA, Stanson AW, Daniels BK, Sheedy PF. Effects of changes in central venous pressure on upper airway size in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*;153:250-254. 1996.
102. Bucca CB, Brussino L, Battisti A, Mutani R, Rolla G, Mangiardi L, et al. Diuretics in obstructive sleep apnea with diastolic heart failure. *Chest*;132:440-446. 2007.
103. Zhou J, Tang PC, Qin L, Gayed PM, Li W, Skokos EA, et al. CXCR3-dependent accumulation and activation of perivascular macrophages is necessary for homeostatic arterial remodeling to hemodynamic stresses. *J Exp Med*;207:1951-1966. 2010.
104. McGuire M, Bradford A. Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats. *Eur Respir J*;18:279-285. 2001.
105. Snow JB, Kitzis V, Norton CE, Torres SN, Johnson KD, Kanagy NL, et al. Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on

pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol* (1985);104:110-118. 2008.

106. Fletcher EC, Bao G, Miller CC, 3rd. Effect of recurrent episodic hypocapnic, eucapnic, and hypercapnic hypoxia on systemic blood pressure. *J Appl Physiol* (1985);78:1516-1521. 1995.

謝辞

稿を終えるに当たり、本研究の機会を与えて頂いた東京大学大学院医学系研究科社会医学専攻法医学講座の吉田謙一前教授（現・東京医科大学医学部法医学教室教授）に謹んで御礼申し上げます。また研究全般の指導と共に SPring-8 における肺微小血管造影で多大なお力添えを頂いた国立循環器病研究センター研究所心臓生理機能部の白井幹康部長、並びに研究全般の指導と共に IH 装置の開発に惜しめない御助力を頂いた東海大学医学部内科学系呼吸器内科学および附属東京病院呼吸循環器センターの桑平一郎教授・センター長に深甚なる感謝を申し上げます。さらに基本的な動物の扱い方から PV カテーテルによる右心室圧の測定まで幅広く専門的な知識・技術をご指導頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻比較病態生理学講座の桑原正貴准教授に心より感謝申し上げます。また、吉田教授退官後、私に引き続き研究機会を与えて下さり、学位審査の御指導まで賜りました東京大学大学院内科学系専攻病態診断医学講座臨床病態検査医学の矢富裕教授、並びに下澤達雄講師に深く御礼申し上げます。

他、本研究の遂行に当たり多くの御助言・御協力を頂いた吉田教授時代の法医学教室教官、原田一樹先生（現・防衛医科大学校総合基礎医学群総合社会・

環境医学系法医学講座准教授) と新谷香先生 (現・京都府立医科大学大学院医学研究科法医学教室准教授) に謹んで御礼申し上げます。また当時の大学院生、
研究員の中でも、とりわけ小倉彩世子先生 (現・日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野助手)、奈良明奈先生 (現・東京大学大学院医学系研究科法医学教室日本学術振興会特別研究員 PD)、前田秀将先生 (現・東京医科大学医学部法医学講座助教)、山口るつ子先生 (現・東京大学大学院医学系研究科法医学教室大学院生) には実験の遂行に労を惜しまずお力添え頂きました。この場を借りて心から感謝申し上げます。また、最大の愛と信頼をもって応援し支えてくれた両親と家族に心より感謝致します。

なお本研究は独立行政法人日本学術振興会の科学研究費の補助を受けて実施されました。深く御礼申し上げます。

最後に、本研究のために尊い命を頂戴しましたラット達に深く感謝し哀悼の意を表すると共に、彼らの死を科学の発展のために決して無駄にしないことをお誓い申し上げ、私の謝辞に代えさせていただきます。