

【別紙 1】

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 永井 恒志

睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome, SAS) は睡眠時に気道閉塞による無呼吸を繰り返す症候群である。SAS の合併症の一つとして肺高血圧が知られているが、その合併率は 20~40% であり、合併する患者と合併しない患者がいる。肺高血圧を合併する場合は予後が不良になると考えられている。法医学分野で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おり、SAS の病態に関心が集まっている。特に右心負荷と突然死との関連性が指摘されていることから、SAS における肺高血圧の発生機序、および肺高血圧の有無を決定する因子の解明が急がれる。

SAS 患者では、夜間就寝中に頻回の気道閉塞に伴う間歇的低酸素 (intermittent hypoxia, IH) 血症に一致した一過性の肺動脈圧上昇と漸次進行性の平均肺動脈圧上昇が認められる。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) によると推測されている。この臨床研究の結果から一般に IH が肺高血圧発症に関連していると考えられており、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いる。過去の報告では、IH 曝露動物では肺高血圧を生じるとするものと生じないとするもの両方があり、臨床研究の結果と同様に IH 曝露動物でも肺高血圧は必ずしも発症していない。そこで我々は独自に開発した IH 装置を用いて、ラットを 1 週間から 8 週間まで種々の期間で IH 曝露したが肺高血圧は生じなかった。この結果から、IH では肺高血圧の発症を抑制する機構の存在が推定され、この機構が何らかの原因で機能しない場合に肺高血圧が発症するとの仮説を立てた。

ところで従来、低酸素性肺高血圧の研究は慢性低酸素 (chronic hypoxia, CH) 曝露動物で多数行われてきた。CH 誘発性肺高血圧では著明な肺血管中膜肥厚を生じ比較的重度の肺高血圧を呈する。近年、CH 誘発性肺高血圧の発症に M2 マクロファージが重要な役割を果たしていることが注目されている。一方、IH 誘発性肺高血圧におけるマクロファージの関与については報告がない。しかし *in vitro* 実験でマクロファージを IH 曝露すると誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が発現するとの報告があることから、IH 刺激によって M1 マクロファージに分化する可能性が示唆される。

一方、マクロファージは β 受容体 (β adrenergic receptor, β AR) を発現しており、IH では交感神経系の活性化が著明であるため、カテコラミン刺激が IH の肺マクロファージを活性

化させる可能性がある。興味深いことに持続性高カテコラミン血症では心筋に β_3 AR を発現させ、 β_3 AR の刺激はさらに iNOS 発現を誘導するとの報告がある。マクロファージに β_3 AR が発現するとの報告はないが、上記の研究結果を考慮すると、IH ではマクロファージに β_3 AR/iNOS 経路が発生する可能性がある。iNOS は多量の一酸化窒素 (nitric oxide, NO) を分泌し、NO は強力な血管拡張因子であることから、IH において β_3 AR/iNOS 経路が活性化すると HPV を抑制すると思われ、その結果、肺高血圧の発症が抑制されるとの仮説が成立する。

そこでこの仮説を検証するために、我々は独自の IH 曝露装置を開発した。これを用いて 4%-21%O₂×90 秒×8 時間/日 (9:00-17:00) ×6 週間の条件で IH 曝露ラットを作成した。IH 群では交感神経の活性化が生じることを確認するために、IH6 週間後に 24 時間蓄尿により尿中カテコラミン濃度を測定した。その結果、IH ではドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンいずれも著しく高値であった。また IH6 週曝露後、IH 群では有意に心拍数、収縮期血圧、拡張期血圧が上昇しており、交感神経系の活性化を支持する結果を得た。次に IH ラットの肺を免疫染色したところマクロファージの著しい増加を認め、 β_3 AR を高度発現していた。肺血管内膜にも β_3 AR を認めたが、IH では発現量がむしろ減少していた。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、IH 曝露と同時に蛍光リポソームを間歇的に繰り返し静注したモデルを作成したところ、肺内に赤色に発光する細胞を多数認めた。蛍光リポソームは血中単球に貪食され発光するため、IH で肺内に増加したマクロファージは血中単球が遊走したものと考えられる。また、IH ラットの肺に増加したマクロファージのサブタイプを決定するため、マクロファージマーカーで免疫染色あるいは蛋白定量したところ、M1 マクロファージであることが明らかとなり、iNOS を強発現していることが判明した。これらのマクロファージを肺胞洗浄法を用いて回収し、培養皿において β_3 AR 刺激薬に曝露したところ、対照群では NO 合成は亢進しなかったが、IH 群では有意に亢進した。この亢進は iNOS 阻害薬あるいは汎 NOS 阻害薬の前投与により消失した。これらの結果は IH 群の肺マクロファージでは β_3 AR/iNOS 経路を介する NO 合成が活性化していることを示している。次にこの経路が HPV を抑制するか検証するために、ラットを Spring-8 に持ち込み肺微小血管造影検査を行った。急性低酸素 (10%O₂) 曝露によって、対照群ラットでは直径 200~300 μ m の肺血管で最大収縮を示す HPV が直径 100~500 μ m の太さの血管で認められたが、IH 群では同範囲で HPV の程度は極めて弱かった。しかし IH 群に β_3 AR 遮断薬を前投与して低酸素曝露すると対照群と同レベルの HPV を発現した。この現象は iNOS 阻害薬の前投与でも同様に生じた。逆に β_3 AR 刺激薬を投与すると対照群では血管径に変化はなかったが、IH 群では直径 100~500 μ m 全ての範囲で血管が有意に拡張した。この拡張反応は iNOS 阻害薬あるいは汎 NOS 阻害薬の前投与で消失した。さらに、IH6 週曝露直後に clodronate を気管内投与して肺マクロファージを著しく減少させたモデルにおいては、急性低酸素曝露で IH 群は対照群と同じレベルの HPV を生じた。これらの結果は、IH 群の肺マクロファージは β_3 AR/iNOS 経路を介して分泌された NO によって肺血管を拡張さ

せることで HPV を抑制していることを示している。最後に、この作用が肺高血圧の発症抑制に寄与しているか検証するために、IH 曝露と同時に β_3 AR 遮断薬あるいは clodronate の慢性投与を行った。薬剤投与を行っていない IH 群では肺高血圧も右室肥大も生じなかったが、薬剤投与群ではいずれも肺高血圧と右室肥大を示した。対照群には薬剤の影響はなかった。しかし肺組織を用いて肺血管の中膜肥厚度を検証した結果、肺高血圧を示した群でも中膜肥厚は生じていなかった。したがって IH における肺高血圧は肺血管中膜肥厚ではなく HPV による肺血管過収縮が主な原因であり、肺マクロファージが β_3 AR/iNOS 経路を介して肺高血圧の発症を抑制していると考えられた。

本研究は、IH 曝露により肺内に動員された血中単球由来の M1 マクロファージが β_3 AR/iNOS 経路を介して NO 分泌することで HPV を抑制し、肺高血圧および右室肥大への進展を抑えていることを明らかにした。これらの結果を 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 の発現様式は変化するため、高齢者では血中単球の局所への遊走が低下する可能性がある。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、明らかにラットの年齢によって同じ IH 曝露条件でも血管応答は異なっている。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。