

【別紙 2】

審査の結果の要旨

氏名 永井恒志

本研究は、間歇的低酸素（intermittent hypoxia, IH）曝露において肺高血圧の発症を抑制するメカニズムの存在を明らかにしたものである。IH6週間曝露ラットを用いて、肺高血圧の原因となる低酸素性肺血管収縮（hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV）に対する肺内の単球系マクロファージの機能的影響について解析し、以下の結果を得ている。

1. 使用した動物は7週齢 Sprague Dawley (SD) 雄性ラットである。独自に開発した IH 曝露装置を用いて、ラット用低酸素曝露チャンバー内の O₂ が 90 秒毎に 4% および 21% となるように窒素ガス (99.9% N₂) と空気の送気流量を調整し、これを毎日 8 時間 (9:00-17:00)、連日 6 週間実施して IH 曝露ラットを作製した。
2. IH 曝露ラットの右室重量/左室中隔重量比、右室重量/体重比、右室収縮期圧、右室流出路加速時間/駆出時間比を計測したところ、いずれも室内気対照群ラットと差がなく、肺高血圧、右室肥大を呈さなかった。
3. IH 曝露 6 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ところ、IH 曝露ラットではドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンのいずれも著しく高値であった。また IH 曝露ラットでは有意に心拍数、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示す結果を得た。
4. IH 曝露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、β₃ 受容体 (adrenergic receptor, AR) を高度に発現していた。対照群の肺内マクロファージには β₃AR は殆ど発現していなかった。この結果は Western blotting と RT-PCR でも同様に示された。β₃AR は両群の肺血管内膜にも発現を認めたが、IH 曝露ラットでは発現量はむしろ減少していた。
5. IH 曝露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た。

6. IH 曝露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、M1 マクロファージ・マーカー iNOS、CD11c、IL-6 と M2 マクロファージ・マーカー Ym-1、CD206、arginase-1 を免疫染色したところ、IH 曝露群で M1 マクロファージ・マーカーの有意な発現増加を認めた。一方、M2 マクロファージ・マーカーの発現量に有意な差はなかった。肺胞洗浄法にて回収したマクロファージを用いて Western blotting で蛋白発現量を定量化したところ、IH 曝露群では M1 マクロファージ・マーカー iNOS、IL-6、TNF α の有意な発現増加を認めたが、M2 マクロファージ・マーカー Ym-1、CD206、arginase-1 は両群間で差がなかった。したがって、IH 曝露ラットで肺内に増加したマクロファージは M1 マクロファージであると考えられた。
7. マクロファージを肺胞洗浄法にて回収し、培養皿において β_3 AR 刺激薬に曝露したところ、対照群では一酸化窒素 (nitric oxide, NO) 合成は亢進しなかったが、IH 曝露ラット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 曝露ラットの肺内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。
8. IH 曝露ラットと対照群ラットを SPring-8 に持ち込み肺微小血管造影検査を行ったところ、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 曝露ラットでは同範囲で HPV の程度は極めて弱かった。しかし IH 曝露ラットに 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 曝露ラットでは直径 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 週間曝露直後に clodronate を気管内投与して肺内マクロファージを著しく減少させたラットにおいては、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 曝露ラットの肺内マクロファージは 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。
9. IH6 週間曝露と同時に β_3 AR 遮断薬あるいは clodronate の慢性投与を行ったところ、薬剤投与を行っていない IH 曝露ラット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中膜肥厚度を測定した結果、肺高血圧を示した群でも中膜肥厚は生じていなかった。この結果は、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要な原因であり、肺内マクロファージが β_3 AR/iNOS 経路を介して肺高血圧の発症を抑制していることを示している。

以上、本論文は 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 を分泌することで HPV を抑制し、肺高血圧および右室肥大への進展を抑制していることを明らかにした。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示しており、間歇的低酸素における肺高血圧の研究領域において新たな制御機構を解明したものとして学位の授与に値すると考えられる。