

ラットのモノクロタリン誘発による 実験的肺高血圧症モデルに対する エリスロポエチン投与の有効性

五十嵐 登

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野
(主任：相澤義房教授)

Erythropoietin Administration was Effective for the Treatment of Monocrotaline - Induced Pulmonary Hypertension in Rats

Noboru IKARASHI

Division of Cardiology,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

エリスロポエチン (EPO) は赤血球造血因子として発見され、腎性貧血の治療に用いられてきた (エンドクリン系)。EPO 受容体は赤血球系造血細胞のみならず心血管系や中枢神経にも発現しており、組織保護作用・血管新生作用などを介した多彩なパラクリン系をもつことが知られるようになった。原発性および二次性の肺高血圧症 (PH) は予後不良の疾患で、肺血管内皮障害が発症と進展に重要とされる。EPO の投与が肺血管内皮の生存を高めることで PH を改善しようと考え、動物モデルを用いた治療実験をおこなった。

ラットにモノクロタリンを投与すると、肺細動脈の血管内皮障害と中膜肥厚による PH が誘発された。これを EPO 持続静注で治療したところ、抗アポトーシス分子 BCL-XL の誘導と血管内皮由来分子 PECAM-1 およびエンドセリンの発現量の減少の抑制、肺細動脈の中膜肥厚の改善、および肺高血圧と右心肥大の改善が観察された。EPO のアジアロ体にはこの作用がなかった。

肺高血圧の治療に EPO 投与が有効である可能性が示された。

キーワード：肺高血圧，モノクロタリン，エリスロポエチン，アジアロエリスロポエチン，血管内皮障害

緒 言

原発性肺高血圧症は肺の血管内皮細胞の増殖，

叢状病変 (plexiform lesion)，血管平滑筋細胞の増殖による中膜肥厚を特徴とし、比較的若年者に発症する稀な疾患である。現在の標準的治療

Reprint requests to: Noboru IKARASHI
First Department of Internal Medicine
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学医学部第一内科学教室 五十嵐 登

である Prostacyclin (PGI₂) 持続静注療法などによっても 5 年生存率は 50 % 程度と予後不良であり^{1)–5)}, 有効な治療法の開発が望まれている。

植物アルカロイドの一種であるモノクロタリン (MCT) は, その単回投与により肺血管内皮細胞障害, 血管炎および肺血管透過性亢進を引き起こし, それに引き続いて肺血管中膜肥厚によるリモデリング, 肺高血圧症及び右心肥大を誘発することが知られており, 実験的肺高血圧モデルとして使用されている^{6)–9)}。

エリスロポエチン (EPO) は赤血球系造血因子で, 貧血・低酸素に呼応して腎から分泌され, 血流を介して骨髄に到達し赤血球系造血を亢進させる。EPO 受容体 (EPOR) は赤血球系造血前駆細胞および赤芽球に発現しており, 主に Jak2/stat5 経路を介してこれら増殖中の細胞の生存を維持 (生存因子) することにより造血因子としての作用を発揮する。近年, EPO および EPOR の発現が腎/骨髄システム (エンドクリン) のみならず心血管系, 中枢神経などの多彩な組織で見つかっており (パラクリン), 組織障害時のアポトーシス抑制による細胞保護作用の重要性が指摘されてきた¹⁰⁾。EPO は *in vitro* で血管内皮細胞に対して, endothelial NO synthase (eNOS) 活性誘導作用や PI3K 依存性の Bcl-XL 誘導による抗アポトーシス作用を示す^{11)–15)}。また *in vivo* では, EPOR 欠損マウスには末梢血中への血管内皮前駆細胞の動員の低下, 肺組織での eNOS 発現低下などが背景因子として存在するため低酸素誘発性肺高血圧の増悪が観察され, 肺高血圧の進展に EPO/EPOR システムが組織保護的に働いていると考えられているが¹⁶⁾, 外来性の EPO 投与が肺高血圧モデルに対して有効であるという直接的な報告はない。

我々はマウス下肢虚血モデルの治療実験を用いて, エリスロポエチンの投与が虚血組織の抗アポトーシス作用および血管新生作用を介して虚血下肢の脱落を改善することを報告した¹⁷⁾。従って EPO 投与には上述の血管内皮に対する eNOS 誘導および抗アポトーシス効果に加え, 血管内皮誘

導や血管新生による局所循環の改善が期待される。そこで我々は MCT 誘発ラット肺高血圧モデルに対して EPO 持続静注投与による改善効果を検討した。また, EPO 誘導体の 1 つであるアジアロ EPO との効果の比較をおこなった。

材料と方法

1. MCT 誘発ラット肺高血圧モデルの作成

チャールスリバー (Yokohama, Japan) より 6–7 週齢の雄 Wistar ラットを購入し実験に用いた。全ての実験手順は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 86–23; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) に基づき無菌的に行われた。

MCT 投与の 2 日前に, RPMI1640 メディウム (Nipro, Tokyo, Japan), リコンビナント・ヒト EPO: rhEPO またはアジアロ EPO: rhAEPO (いずれも Chugai Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を含むメディウムを満たした Alzet mini-osmotic pump Model 2004 (Durect, Cupertino, CA) に Alzet Rat Jugular Catheter (Durect) を接続し 37°C で 48 時間以上静置し準備した。

ラットをペントバルビタール (60mg/kg) の腹腔内投与による全身麻酔下に左内頸静脈を露出し, Rat Jugular Catheter を挿入したのち Osmotic pump を背側皮下に留置し, rhEPO 500IU/kg/day (E 群), rhAEPO 500IU/kg/day (A 群) または同容量のメディウム (M 群) の持続投与を開始した。モノクロタリン (WAKO Chemicals, Osaka, Japan) は 1mol/L HCl に融解し, 1mol/L NaOH で中和の後に滅菌蒸留水で調整したものを, 投与量 80mg/kg の 1 回皮下注射を行い, 肺高血圧を誘発した。

2. 生理学的測定

MCT 投与の 21 日後に体重を測定したのちに 2% ハロセン (Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) 吸入麻酔下に血行動態を測定した。大動脈圧 (mmHg) 測定にはポリエチレンカテーテル (PE-50, Becton Dickson, Parsippany, NJ) を右大

腿動脈へ挿入し圧トランスデューサー：P50 (Gould Statham, Oxnard, CA) を接続した。カテーテルチップトランスデューサー：Millar SPR407 (Millar Inst., Houston, TX) を右内頸動脈より左心室へ挿入し、もう1本のカテーテルチップトランスデューサー：Millar SPR671 (Millar Inst.) を右内頸静脈から右心室へ挿入し、それぞれ左室圧 (LVP, mmHg), 右室圧 (RVP, mmHg) を測定した。心拍数は体表面心電図にて測定した。計測データは Power Lab/8sp (AS Instruments, Castle Hill, Australia) に記録し、解析した。血行動態を測定したのち、下大静脈より採血 (血算および血中濃度測定用) を行うことで屠殺した。

3. 組織学的検討

屠殺後すみやかに右下肺を摘出した (mRNA 定量測定用)。続いて右心室前面に切開を加え、主肺動脈にカテーテルを留置して生理食塩水を注入し、左心房から肺内血液を洗い流した。次に気管を切開してカテーテルを挿入し、10%ホルマリン液を注入することで肺を固定し摘出した (組織標本用)。その後、右室・肝・脾を摘出し、その重量を測定した。摘出した組織標本用の左肺は1晩のホルマリン固定を行い、パラフィンに包埋した。肺門を通るレベルで左肺を横断面スライスし、厚さ2 μ mの切片をスライドガラスに載せ、脱パラフィン処理を行ったのちに Hematoxylin-eosin 染色を行った。システム生物顕微鏡 (BHS, Olympus, Japan) に接眼ミクロメータを装着して組織標本中に存在する全ての筋性肺動脈を観察し、松田らの方法¹⁸⁾に従って血管壁厚の測定を行った。すなわち、外径50~200 μ mの筋性肺動脈について外径及び内径を顕微鏡下に測定し、壁厚 (外径 - 内径) を計算し、外径に対する壁厚の比を求めた。

4. 採血サンプルの測定

採血サンプルのうち2mlをEDTA加採血管に分取し、自動血球カウンター：Sysmex F-820 (Sysmex, Kobe, Japan) を用いて血算を行った。

表1 Primers for QRT-PCR

	Sense primer	Antisense primer
γ -actin	gaaccttcctccgggcatggagt	tggaggggcctgactcgtcactact
Bcl-X	tacaagctctcccagaaggatac	ctgttcaaaagctctgatatgctgt
Bcl-XL	tacaagctctcccagaaggatac	atcccgaagaattcattcactact
Bcl-2	tataagctgtcacagaggggctac	ctgactggacatctctgcaaagtc
CD31	ctcctaagagcaaaagagcaacttc	ccctcctttttctttgtaaaactga
CD14	aatctggggcagtagactgatatt	gtgcttgggcaactacttagtacct
CD45	gcatgaactagagatgagcaaaaga	gcagaatataggtgaggatttgt
ET-1	gatccttgaagacttacttceca	ctgtagagttccgctttcaacttt
eNOS	tattccaaggaagttacagagcc	tatggttacagatgtagtgaaca
SDF-1	catcagtgacgtaagccagt	ttaaggctttgtccaggctactctt
VEGF	cagagcggagaaagcatttgtt	cacatctgcaagtagcttctgttta

残りの血液はガラス採血管に採取し、血清を分離したのち、ELISA法によってEPOおよびVEGFを測定した。測定にはそれぞれ Quantikine Mouse/Rat EPO Immunoassay (R&D systems, Minneapolis, USA) および Quantikine Rat VEGF Immunoassay (R&D systems) を用いた。EPO測定に用いたELISA Kitは、ラット由来EPOとヒト由来EPOを同時に検出する。また、ヒトEPOとAEPOを同等に検出する。

5. mRNAの定量

摘出した肺組織中のmRNA発現量を既報のとおり real-time quantitative RT-PCR (QRT-PCR) 法を用いて定量した¹⁹⁾。表1にQRT-PCRに用いたプライマー配列を示す。抗アポトーシス分子のBCL-X, BCL-XLおよびBCL-2, 血管新生に関わるケモカインのSDF-1と増殖因子のVEGF-A, 血管内皮に発現する接着分子PECAM-1 (CD31), 血管内皮が産生する血管収

縮ペプチドであるエンドセリン (ET-1) と血管拡張を誘導する eNOS, 単球/マクロファージ系に発現する LPS 受容体 (CD14), 白血球共通抗原 (CD45), および internal standard の γ アクチンについて計測した. QRT-PCR には LightCycler (Roche, Indianapolis, IN) を用い, 95 °C 10 秒, 62 °C 10 秒, 72 °C 13 秒を 1 サイクルとし計 35 サイクル施行した. RNA 1 μ g あたりの各 RNA のコピー数を計算し, 各指標のコピー数の γ アクチンのコピー数に対する比として表示した.

6. 統計

測定値は平均値と標準偏差で表現した. 多群間の比較は one-way ANOVA を用いて行い, 有意差検定には Tukey の HSD 検定を用いた.

結 果

データはすべて週齢を合わせた正常ラット (N 群), モノクロタリンの皮下注射によって肺高血圧を誘発し同時に EPO を含まないメediumの持続静脈内投与を行ったラット (M 群), モノクロタリンを投与し同時に 500IU/kg/day の rhEPO 持続静脈内投与を行ったラット (E 群), およびモノクロタリンを投与し同時に 500IU/kg/day の rhAEPO 持続静脈内投与を行ったラット (A 群) について, 21 日後の測定で比較した.

1. 血行動態

血行動態の結果を図 1 に示す. 各群の固体数は, N 群: 8, M 群: 9, E 群: 8, A 群: 9 である. 心拍数 (HR) および体血圧の指標である平均大動脈圧 (mean AP) は 4 群間で大きな違いがなく, 左心系/体循環への影響は無視できる範囲であったと考えられる. N 群に比し M 群では右室重量 (RVW) および右室圧 (RVP) の著明な増加/上昇が認められ, 肺高血圧の出現による強い右心負荷の増大が観察された. これは EPO 投与群で改善が見られたが, AEPO 投与群では改善しなかった.

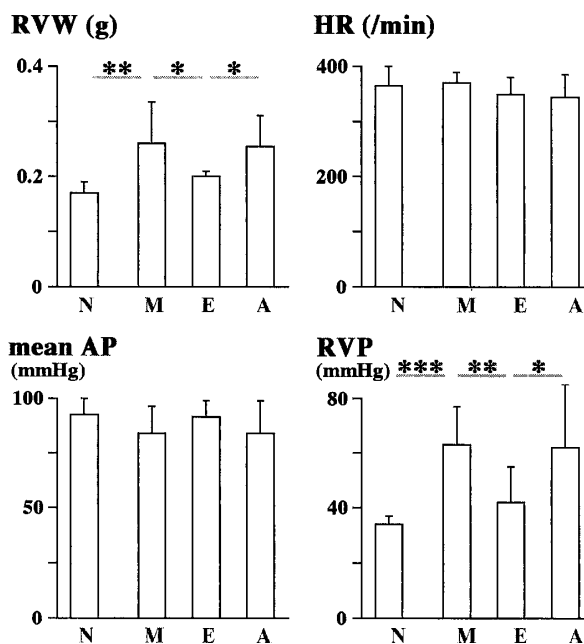


図 1 血行動態

モノクロタリン投与 21 日後の血行動態を示す. 右室重量 (RVW) および右室圧 (RVP) は正常群: N (n = 8) に比しモノクロタリン投与群: M (n = 9) で増加しており, 肺高血圧とそれによる右心負荷の増大を示した. これはエリスロポエチン治療群: E (n = 8) で改善したが, アシアロエリスロポエチン治療群: A (n = 9) では治療効果が明らかでなかった. 心拍数 (HR) および平均大動脈圧 (mean AP) は 4 群間で大きな違いがなく, 左心系/体循環への影響は無視できる範囲であった. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

2. 肺組織

肺組織の結果を図 2 に示す. 各群の固体数は, N 群: 4, M 群: 6, E 群: 5, A 群: 7 である. また各群で測定した組織の肺細動脈数の総計は, N 群: 76, M 群: 104, E 群: 87, A 群: 110 であった. 各群間で肺細動脈の内径 (inner diameter) には大きな違いがなく, 内腔狭窄の出現は明らかでなかった. 一方, 中膜肥厚による壁厚比の著しい増大が M 群で認められ, これは EPO 投与群で改善が見られたが, AEPO 投与群では改善しなかった. すなわち細動脈での中膜肥厚による血

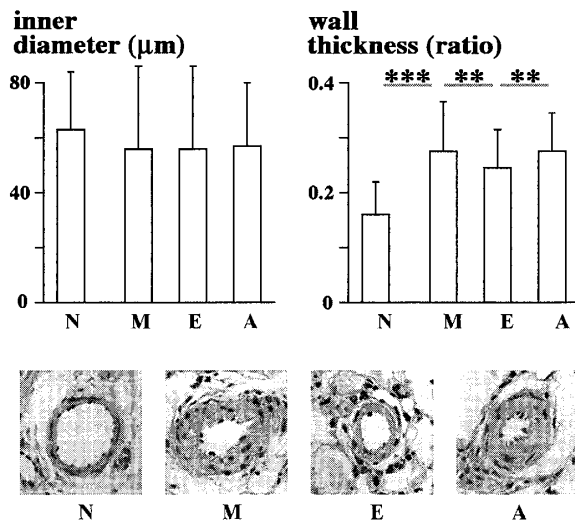


図2 肺組織

モノクロタリン投与21日後の肺組織を示す。細動脈の内径 (inner diameter) は、正常群: N (n = 4)・モノクロタリン投与群: M (n = 6)・エリスロポエチン治療群: E (n = 5)・アジアロエリスロポエチン治療群: A (n = 7)の4群間で差がなかった。血管壁厚比 (wall thickness) はM群で増大し、エリスロポエチン治療で改善したが、アジアロエリスロポエチン治療では改善しなかった。下段に各群の典型的な組織像を示す (HE染色, 200倍)。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

管壁の弾性の低下がこのモデルでの肺高血圧の機序に大きく関わっている可能性が示唆された。またM群・E群・A群の細動脈周囲にはマクロファージが目立ち、好中球の浸潤は明らかでなかった。

3. mRNA 定量

測定結果を図3に示す。各群の固体数は、N群: 7, M群: 7, E群: 7, A群: 9である。組織中に発現していた抗アポトーシス分子のうち、BCL-XはmRNA発現量が多く、BCL-2は少なかった。M群に比しE群で有意なBCL-X発現の誘導が観察されたが、A群では発現誘導が弱かった。BCL-XのアイソフォームのうちBCL-XLが同じ動態を示し、BCL-XLが抗アポトーシス作

用に重要であると考えられた。BCL-2の誘導は見られなかった。SDF-1およびVEGFについては、血管内皮障害に続発して血管周囲組織からの分泌促進が観察されることが予測されたが、各群間で有意な違いは観察されなかった。個体数を増やせば予想どおりの結果が得られた可能性がある。

血管内皮に由来するCD31およびET-1は、N群に比しM群で低下していたが、EPO投与によって低下の抑制が見られ、AEPO投与による改善は見られなかった。EPOによるBCL-XLの誘導が血管内皮を生存させた可能性がある。同じく血管内皮に由来するeNOSにはこのような有意差が観察されなかったが、個体数を増やせばEPO投与による誘導が観察される可能性がある。

マクロファージ系に由来するCD14では、各群間に有意差が見られなかった。白血球共通抗原のCD45の測定値は各群間ではほぼ同じ値を示し、図には示さないがCD14/CD45比は、N群に比しM群で有意に増加していた ($p < 0.05$)。内皮障害に反応して組織中に増加した血液由来細胞が、主にマクロファージであって、好中球ではなかったことと一致する。

4. ELISA と血算

結果を図4に示す。各群の固体数は、N群: 8, M群: 7, E群: 7, A群: 8である。血清EPO濃度はEPO投与群で上昇が見られたが、AEPO投与群では有意な上昇が観察されなかった。これは後で述べるとおり、AEPOの血中からの消失が速やかであるためと思われる。血管内皮障害および/またはEPO投与による内因性VEGFの血中濃度の上昇は観察されなかった。EPO投与群では赤血球造血誘導によるHt (%)の上昇と、脾での赤血球造血による脾重量の増加が見られたが、AEPO投与では造血作用が観察されなかった。

考 察

モノクロタリンの投与によって血管内皮に由来するPECAM-1およびET-1の発現低下が見ら

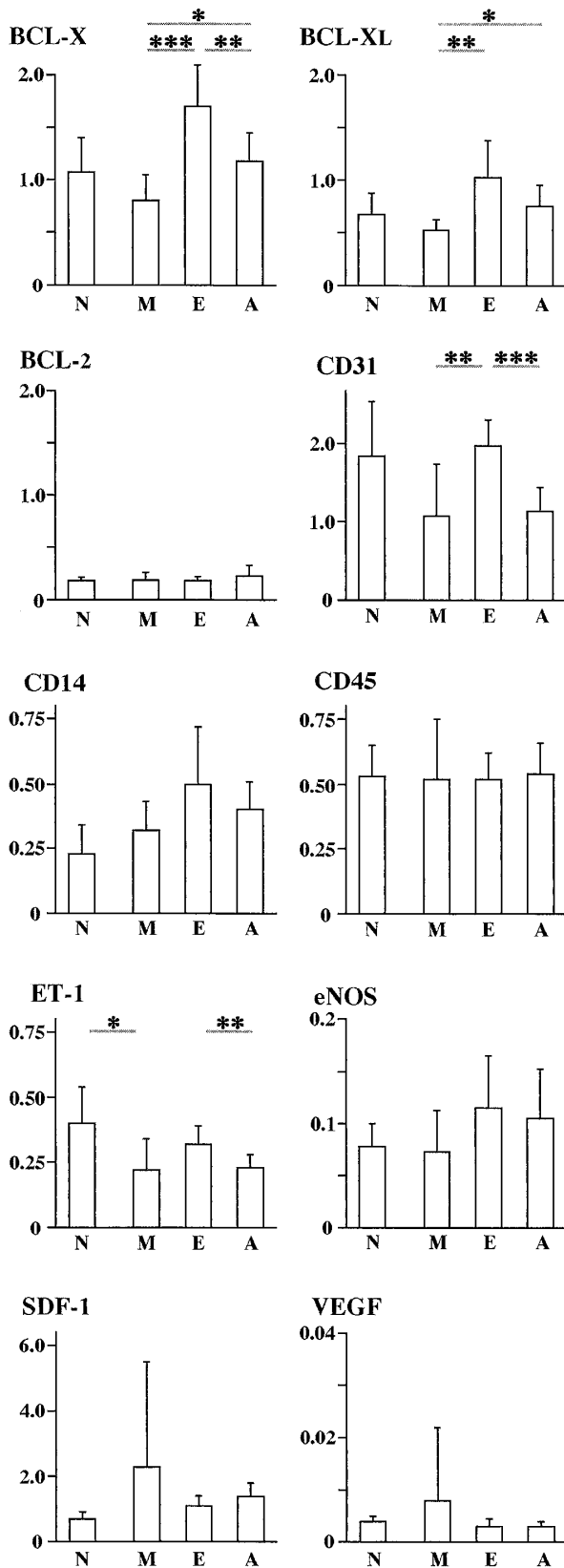


図3 肺組織の mRNA 定量

れ、血管内皮障害によると思われる細動脈の中膜肥厚が観察され、肺高血圧による右室圧の上昇と右室肥大が誘導された。また同時にモノクロタリン投与によって、肺組織での SDF-1 および VEGF の発現が誘導された可能性があるが、これは血管内皮障害に対する血管周囲組織による内皮修復の反応であったかもしれない。

EPO の持続静注により抗アポトーシス分子 BCL-XL が誘導され、血管内皮に由来する PECAM-1 および ET-1 の発現低下が抑制され、細動脈の中膜肥厚が改善し、右室圧および右室重量の増加が抑制された。アジアロ EPO 投与によってはこのような EPO の効果が観察されなかったが、これは後述する理由によって血中濃度が上昇しないことによると推測される。

モノクロタリン投与 21 日後の肺組織から RNA を抽出し、QRT-PCR 法で mRNA のコピー数を測定し、g-actin のコピー数に対する比で表した。各群の個体数は、N (正常群)：7、M (モノクロタリン投与群)：7、E (エリスロポエチン治療群)：7、A (アジアロエリスロポエチン治療群)：9。抗アポトーシス分子のうち、BCL-X およびそのアイソフォーム BCL-XL はエリスロポエチン治療によって誘導されたが、アジアロエリスロポエチン治療によっては誘導されなかった。BCL-2 の発現量は少なく、また各群で差がなかった。血管内皮に由来する分子のうち、PECAM-1 (CD31) およびエンドセリン (ET-1) はモノクロタリン投与群で減少していたが、エリスロポエチン治療によって減少が抑制された。アジアロエリスロポエチン治療にはこのような効果が認められなかった。一方、eNOS は 4 群間で有意差がなかった。マクロファージ抗原の CD14 および白血球共通抗原の CD45 の量は 4 群間で有意差がなかった。血管周囲組織から分泌される血管増殖を誘導する因子である SDF-1 および VEGF も 4 群間で有意差がなかった。*： $p < 0.05$ ，**： $p < 0.01$ ，***： $p < 0.001$ 。

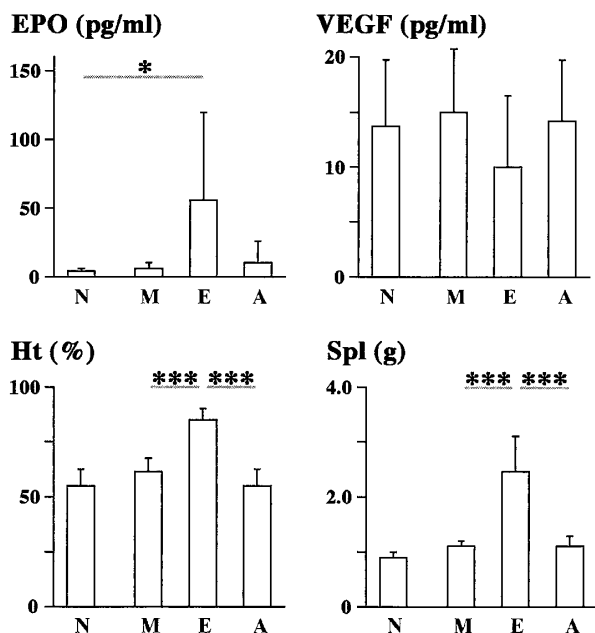


図4 ELISAと血算

モノクロタリン投与21日後の血中のエリスロポエチン(EPO)および血管内皮増殖因子(VEGF)の濃度,ヘマトクリット(Ht)および脾重量(Spl)を示す。各群の個体数は、N(正常群):8,M(モノクロタリン投与群):7,E(エリスロポエチン治療群):7,A(アシアロエリスロポエチン治療群):8。エリスロポエチン投与によって血中エリスロポエチン濃度は上昇しているが、アシアロエリスロポエチン投与によっては明らかな上昇が観察されなかった。血中VEGF濃度は4群間で有意差がなかった。エリスロポエチン投与によって、赤血球造血亢進によるヘマトクリット値の上昇と脾重量の増加が見られたが、アシアロエリスロポエチン投与には、明らかな造血作用が観察されなかった。
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ 。

マウスの頸動脈および冠動脈を切り出して用いた *ex vivo* 実験では、EPOの存在下に血管内皮のeNOSが誘導され、組織のアポトーシスが抑制されたという報告がある²⁰⁾²¹⁾。eNOSはNO産生による短期的な血管拡張作用のみならず血管平滑筋の増殖抑制作用を有し、肺高血圧患者の肺動脈でNOSの減少による中膜肥厚と血管抵抗の上昇が

観察されている²²⁾。

エリスロポエチンの投与は多血症の誘発によって高血圧を来す可能性があるのみならず、血管内皮に対する直接作用としてのエンドセリン産生の上昇や細胞内カルシウムの動員を介して高血圧を誘発すると考えられているが^{23)–25)}、今回の結果では多血症などに随伴する体循環の高血圧は観察されなかった。またエリスロポエチン投与による多血症と血液粘調度の増加が肺高血圧を悪化させると予測した低酸素誘導によるラットの肺高血圧モデル(低酸素による肺動脈収縮モデル)に対するEPO投与の報告では、彼らの予想に反して肺高血圧の悪化が観察されなかった²⁶⁾。

肺高血圧症では血管内皮の障害が発症と病態の進展において重要である²⁷⁾。血管内皮前駆細胞(EPC)を多く含む骨髓を用いた肺高血圧症の細胞治療を目指した前臨床研究では、モノクロタリン誘発ラット肺高血圧の治療モデルに対してEPC輸注が有効であることが分かり²⁸⁾、臨床試験が進行中である²⁹⁾。EPOには骨髓中のEPCを末梢に動員する作用があることが知られていることから³⁰⁾、本研究では血管内皮に発現しているEPO受容体を介した直接作用の他にもEPOによるEPCの動員が肺の微小血管新生を介して肺循環を改善させる効果も寄与していた可能性がある³¹⁾。

原発性肺高血圧症(PPH)患者の肺組織には血管内皮の増生やplexiform lesionの出現が見られるが、モノクロタリン誘発モデルではこのような組織学的特徴は見られず⁶⁾⁷⁾、血管内皮障害が主な機序であるため、PPHのモデルとしては注意が必要である。PPHの患者ではBone morphogenetic protein type 2(BMP2)の遺伝子変異が家族性の約50%、孤立性の約26%で認められており²⁷⁾、またBMP2トランスジェニックマウスでは肺高血圧が生じる³²⁾。また血管障害の他にも片肺の切除やシャント作成による血行力学的な変化から生じるShear stressがPPHの病態の進展に拘わる³³⁾。PPHにより近い動物モデルでの再検討が今後必要となる。一方、病原性大腸菌感染・ウイルス感染・膠原病の悪化・薬剤投与・放

射線照射および造血幹細胞移植後に合併する血栓性血小板減少性紫斑病や血栓性微小血管障害は全身性の血管内皮障害を特徴とする致死的症候群であり、本研究で見いだされた EPO の効果の臨床応用としてはむしろ PPH よりも適切であるかもしれない。

EPO は 165 アミノ酸残基に 3 つの N-グリカンと 1 つの O-グリカンが結合した糖蛋白で、全ての糖鎖はシアル酸で終止する。生体内で分泌される EPO の 14 コのシアル酸は時間とともに徐々に脱落し、肝のアシアロ糖蛋白受容体による代謝および尿への排泄によって速やかに消失するため、AEPO には *in vivo* 投与での造血活性はないが、分子荷電の逆転により受容体への親和性がたかまる³⁴⁾。自然型 EPO の血管新生作用は微弱であるが¹⁷⁾、EPO の完全アシアロ体は骨髄細胞移植療法に匹敵するほどの強力な血管新生作用を有することを発見した (国際特許)。本 EPO 誘導体は EPO 受容体への高い親和性をもち多血症誘発作用を欠くことから、本研究において自然型 EPO との比較を行ったが、血中濃度が維持されないことから治療効果が認められなかった。一方、心筋梗塞の治療モデルとして作成したラットの冠動脈再環流実験では、同じ投与量・投与経路の治療で自然型 EPO よりも良好な効果が AEPO に認められた (投稿準備中)。虚血や炎症により障害された組織局所での血管透過性は亢進しており、いわば自然の Drug Delivery System となっているが、障害局所で血管外組織へ浸透したアシアロ EPO が EPO 受容体を発現している心筋細胞に対して本来の生物作用を発揮したものと推測している。

結 語

モノクロタリン誘発ラット肺高血圧モデルにおいて、エリスロポエチンの投与は主に肺血管内皮の保護を介して肺高血圧の進展を抑制した。血管内皮障害が発症や進展に関与する病態において、エリスロポエチンの投与が治療効果を示す可能性が示唆された。

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました第一内科学教室講師 鳥羽 健先生、同助教 加藤公則先生、同講師 塙晴雄先生、第二病理学教室教授 内藤 眞先生、同准教授 長谷川剛先生、および保健学科基礎生体情報学講座教授 仲澤幹雄先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Newman JH, Fanburg BL, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Garcia JG, Kao PN, Knowles JA, Loyd JE, McGoon MD, Morse JH, Nichols WC, Rabinovitch M, Rodman DM, Stevens T, Tuder RM, Voelkel NF, Gail DB; National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases: Pulmonary arterial hypertension: future directions: report of a National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases workshop. *Circulation* 109: 2947 - 2952, 2004.
- 2) Fishman AP: Primary pulmonary arterial hypertension: a look back. *J Am Coll Cardiol* 43: 2S - 4S, 2004.
- 3) Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM and Tuder RM: Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43: 25S - 32S, 2004.
- 4) Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H and Gaine S: Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43: 40S - 47S, 2004.
- 5) McLaughlin VV and McGoon MD: Pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 114: 1417 - 1431, 2006.
- 6) Meyrick B, Gamble W and Reid L: Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 239: H692 - 702, 1980.
- 7) Ghodsi F and Will JA: Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol* 240: H149 - 155, 1981.
- 8) Hilliker KS, Bell TG, Roth RA: Pneumotoxicity and thrombocytopenia after single injection of

- monocrotaline. *Am J Physiol.* 242: H573 - 577, 1982.
- 9) Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S and Rabinovitch M: Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med* 6: 698 - 702, 2000.
 10. Maiese K, Li F and Chong ZZ: New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 293: 90 - 95, 2005.
 - 11) Banerjee D, Rodriguez M, Nag M and Adamson JW: Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney Int* 57: 1895 - 1904, 2000.
 - 12) Zhande R and Karsan A: Erythropoietin promotes survival of primary human endothelial cells through PI3K - dependent, NF - kappaB - independent upregulation of Bcl - xL. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2467 - 2474, 2007.
 - 13) Chong ZZ, Kang JQ and Maiese K: Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 106: 2973 - 2979, 2002.
 - 14) Chong ZZ, Kang JQ and Maiese K: Apaf - 1, Bcl - xL, cytochrome c, and caspase - 9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 320 - 330, 2003.
 - 15) Beleslin - Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, and Noguchi CT: Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 104: 2073 - 2080, 2004.
 - 16) Satoh K, Kagaya Y, Nakano M, Ito Y, Ohta J, Tada H, Karibe A, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M, Ono M, Watanabe J, Shirato K, Ishii N, Sugamura K and Shimokawa H: Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia - induced pulmonary hypertension in mice. *Circulation* 113: 1442 - 1450, 2006.
 - 17) Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Naito M, Takahashi M and Aizawa Y: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 40: 629 - 638, 2006.
 - 18) Matsuda Y, Hoshikawa Y, Ameshima S, Suzuki S, Okada Y, Tabata T, Sugawara T, Matsumura Y and Kondo T: Effects of peroxisome proliferator - activated receptor gamma ligands on monocrotaline - induced pulmonary hypertension in rats. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 43: 283 - 288, 2005.
 - 19) Hanawa H, Watanabe K, Nakamura T, Ogawa Y, Toba K, Fuse I, Kodama M, Kato K, Fuse K and Aizawa Y: Identification of cryptic splice site, exon skipping, and novel point mutation in type I CD36 deficiency. *J Med Genet* 39: 286 - 291, 2002.
 - 20) d'Uscio LV, Smith LA, Santhanam AV, Richardson D, Nath KA and Katusic ZS: Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension* 49: 1142 - 1148, 2007.
 - 21) Burger D, Lei M, Geoghegan - Morphet N, Lu X, Xenocostas A and Feng Q: Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up - regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 72: 51 - 59, 2006.
 - 22) Giaid A and Saleh D: Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 333: 214 - 221, 1995.
 - 23) Vaziri ND: Mechanism of erythropoietin - induced hypertension. *Am J Kidney Dis* 33: 821 - 828, 1999.
 - 24) Vogel V, Kramer HJ, Bäcker A, Meyer - Lehnert H, Jelkmann W and Fandrey J: Effects of erythropoietin on endothelin - 1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. *Am J Hypertens* 10: 289 - 296, 1997.
 - 25) Larivière R and Lebel M: Endothelin - 1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 81: 607 - 621, 2003.
 - 26) Petit RD, Warburton RR, Ou LC, Brinck - Johnson T and Hill NS: Exogenous erythropoietin fails to augment hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Respir Physiol* 91: 271 - 282, 1993.

- 27) Runo JR and Loyd JE: Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 361: 1533 - 1544, 2003.
- 28) Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q and Stewart DJ: Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 96: 442 - 450, 2005.
- 29) Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Zhu JH, Xie XD, Tao QM, Zhu JH and Chen JZ: Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 49: 1566 - 1571, 2007.
- 30) Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM and Dimmeler S: Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102: 1340 - 1346, 2003.
- 31) Zhao YD, Courtman DW, Ng DS, Robb MJ, Deng YP, Trogadis J, Han RN and Stewart DJ: Microvascular regeneration in established pulmonary hypertension by angiogenic gene transfer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 182 - 189, 2006.
- 32) West J, Fagan K, Steudel W, Fouty B, Lane K, Harral J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Ozimek J, Tuder R and Rodman DM: Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ Res* 94: 1109 - 1114, 2004.
- 33) Botney MD: Role of hemodynamics in pulmonary vascular remodeling: implications for primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 361 - 364, 1999.
- 34) Imai N, Higuchi M, Kawamura A, Tomonoh K, Oh-Eda M, Fujiwara M, Shimonaka Y and Ochi N: Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur J Biochem* 194: 457 - 462, 1990.

(平成 19 年 12 月 5 日受付)