

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 若杉 嵩幸  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 893 号  
学位授与の日付 令和元年 9 月 20 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Role of smooth muscle cell p53 in pulmonary arterial hypertension  
(肺動脈性肺高血圧症における血管平滑筋 p53 の役割)

論文審査委員 主査 教授 菊地 利明  
副査 准教授 白石 修一  
副査 講師 渡部 聡

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

肺動脈性肺高血圧症は肺動脈のリモデリングにより、進行性に肺動脈血管径が狭小化することで右心不全が引き起こされ、死に至る病である。近年治療薬の開発が進んできているが、その予後は未だ不良である。肺高血圧症において血管を構成する細胞の代謝ががん細胞のそれと類似していることが知られている。肺動脈血管平滑筋の増殖が肺高血圧症の病態を形成していると考えられているが、その発症機序は未だ解明されていない。p53 タンパクは細胞周期や DNA 修復、アポトーシス、細胞老化などの制御に関わるタンパクである。過去に全身で p53 を欠失させたマウスにおいて低酸素暴露による肺高血圧症が増悪するという報告がなされているが、肺動脈平滑筋における p53 タンパクの役割については報告がない。そこで申請者らは血管平滑筋の p53 タンパクに着目し、病態の解明を行いたいと考えた。

#### 方法

8 週齢の野生型マウスを 8% の低酸素下で 4 週間飼育し、肺高血圧モデルを作成した。

Cre-loxP システムを用いて平滑筋特異的 p53 欠損マウスおよび平滑筋特異的 MDM4 欠損マウスを作成した。このマウスの DNA 組み換え酵素 Cre(Cre)はタモキシフェンによって誘導されるため、7 週齢より 1mg/300  $\mu$ l(corn oil)/day を連続 5 日間腹腔内投与した。8 週齢で大動脈を摘出し、Western blot により p53 タンパクの減少、増加を確認した。続いて、同様に Cre を誘導した 8 週齢の遺伝子組み換えマウスを 8% の低酸素下で 4 週間飼育した。

心機能評価のため心臓超音波検査により左室拡張末期径、左室収縮末期径を計測し、左室内径短縮率を算出した。左室壁厚および右室壁厚、右室拡張末期径を計測した。また、右室圧の測定は開胸、直視下で右室に 25G の注射針で穿刺し、そこからカテーテルを挿入し計測した。左室その後肺を摘出し、左葉をマイルドホルムで固定しパラフィン包埋し、病理標本を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。右葉を凍結し Western blot により p53 の発現を確認した。

平滑筋の表現系を確認するため、ヒト由来の肺動脈平滑筋細胞(PASMCs)を用いて検討を行なった。1% の低酸素状態において PASMCs の p53 の発現を Western blot を用いて評価した。さらに PASMCs で p53

タンパクの発現を抑制し、細胞外フラックスアナライザーやメタボローム解析を行い PSMCs の代謝リモデリングを検討した。

#### 結果

低酸素暴露により野生型マウスでは左室の壁厚や左室内径短縮率に変化を認めないものの、右室圧の上昇、右室壁の肥厚、右室腔の拡大を認めた。肺のパラフィンをヘマトキシリン・エオジン染色では肺高血圧モデルにおいて肺動脈の壁厚が肥厚していることが確認された。また、p53 タンパクは肺高血圧モデルの肺で優位に低下していることが確認された。

低酸素刺激により PSMCs において p53 タンパクの発現は減少した。PSMCs で p53 タンパクの発現し、メタボローム解析を行うと解糖系のグルコース 6 リン酸、フルクトース-1,6-ビスリン酸、ピルビン酸および乳酸が上昇しており、また TCA 回路ではアセチル CoA が低下傾向を示し、イソクエン酸、フマル酸およびリンゴ酸が低下していた。また、この PSMCs では解糖(Glycolysis)、解糖能(Glycolytic capacity)、解糖予備能(Glycolytic reserve)が上昇し、ミトコンドリア呼吸の基礎呼吸、最大呼吸、ATP 産生および予備呼吸能が低下していることが確認された。

さらなる検討のため、平滑筋特異的 p53 欠損マウスおよび平滑筋特異的 MDM4 欠損マウスで肺高血圧モデルを作成し、血行動態をエコーおよびカテーテルで評価した。驚くべきことに、いずれの遺伝子改変マウスにおいても血行動態の改善、増悪は見られなかった。また、肺のパラフィン切片に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行なったが、対照のマウスと比較していずれのマウスでも肺動脈の壁厚に改善・増悪は見られなかった。

#### 考察

肺高血圧症において血管を構成している細胞である、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞の少なくともいずれかが他の細胞と非協調的に増殖をし、血管リモデリングが生じると考えられる。過去の報告において肺動脈性肺高血圧症の血管の細胞では、がん細胞に類似したアポトーシス抵抗性や代謝リモデリングが起きているとされている。p53 タンパクは細胞増殖を抑制し、解糖系を抑制することが知られていることから、p53 タンパクの発現抑制は肺高血圧症の病態を増悪させ、逆に発現促進は病態を改善させると考えられた。さらに肺動脈性肺高血圧症の患者の PSMCs で解糖系の亢進とミトコンドリア呼吸の抑制が報告されていることから、申請者らは肺高血圧症における肺動脈血管平滑筋の p53 タンパクの役割に着目した。In vitro においては PSMCs の p53 タンパクの発現を抑制すると解糖系が亢進し、ミトコンドリア呼吸が抑制され、がん細胞同様の代謝リモデリングを確認できたが、平滑筋特異的な p53 タンパク発現亢進抑制マウスでは低酸素誘発の肺高血圧症の病態に変化は認められなかった。このことから、平滑筋での p53 タンパクの発現の変化のみではなく、内皮細胞や線維芽細胞の p53 タンパクの発現の変化が肺高血圧症の病態に影響を与えている可能性を示唆した。

#### 審査結果の要旨

肺動脈性肺高血圧症は肺動脈のリモデリングにより、進行性に肺動脈血管径が狭小化することで右心不全が引き起こされ、死に至る病である。近年治療薬の開発が進んできているが、その予後は未だ不良である。本論文では、血管平滑筋の p53 タンパクに着目し、肺動脈性肺高血圧症の病態を解析した。その結果、低酸素暴露により野生型マウスでは左室の壁厚や左室内径短縮率に変化を認めないものの、右室圧の上昇、右室壁の肥厚、右室腔の拡大を認めた。肺のパラフィンをヘマトキシリン・エオジン染色では肺高血圧モデルにおいて肺動脈の壁厚が肥厚していることが確認された。また、p53 タンパクは肺高血圧モデルの肺

で優位に低下していることが確認された。低酸素刺激により PASMCs において p53 タンパクの発現は減少した。さらなる検討のため、平滑筋特異的 p53 欠損マウスおよび平滑筋特異的 MDM4 欠損マウスで肺高血圧モデルを作成し、血行動態をエコーおよびカテーテルで評価した。いずれの遺伝子改変マウスにおいても血行動態の改善、増悪は見られなかった。

本論文は、「平滑筋での p53 タンパクの発現の変化のみではなく、内皮細胞や線維芽細胞の p53 タンパクの発現の変化が肺高血圧症の病態に影響を与えている可能性」を示した点に博士論文としての価値を認める。