

小児肺高血圧症における肺組織ヘムオキシゲナーゼ1 発現の特徴

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4497

小児肺高血圧症における 肺組織ヘムオキシゲナーゼ1発現の特徴

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学
(旧講座名：小児科学)
(主任：小泉晶一教授)

中 村 奈 美

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase, HO) はヘム蛋白代謝における律速酵素であり、HOの3種のアイソフォームのうち、HO-1は種々の酸化ストレスによって誘導される。HOは一酸化炭素 (CO) 産生を介して心血管系の血管拡張作用や炎症制御作用を担っており、種々の心血管疾患の病態に関与している可能性が考えられている。またHO-1遺伝子のプロモーター領域のGT反復配列の多型は、HO-1産生誘導量を制御し種々の血管病変発症と関連することが示唆されている。本研究では種々の肺高血圧症 (pulmonary hypertension, PH) において肺組織HO-1産生の特徴について検討した。対象は血管炎に伴うPH 3例、原発性肺高血圧症1例、心室中隔欠損症 (ventricular septal defect, VSD) 22例、非心疾患1例およびHO-1欠損症1例とした。肺組織標本を用いてHO-1免疫組織染色を行い、VSD例では肺組織HO-1mRNA発現量をリアルタイム定量的PCR法にて定量した。さらにPHを伴うVSD例では、HO-1プロモーター領域のDNA多型とHO-1発現との関連をGene Scan法にて解析した。HO-1欠損症では肺組織内にHO-1産生は全く観察されなかったが、正常肺では気道上皮や肺胞マクロファージに軽度のHO-1産生が認められた。血管炎に伴うPHでは肺胞マクロファージのHO-1発現は増強し、さらに気道周囲や肺動脈壁に浸潤するマクロファージに強いHO-1産生が観察された。一方、原発性肺高血圧症では肺胞マクロファージのHO-1発現はやや増強していたが、気道周囲や肺動脈壁にHO-1産生の増強は認めなかった。PHを伴うVSD例では肺組織内の肺胞マクロファージのHO-1産生が増強し、高肺血流かつ高肺血管抵抗例でHO-1発現が強い傾向があった。そのHO-1発現の違いとHO-1遺伝子プロモーター領域のGT反復配列の多型との間に相関は認めなかった。これらの結果より肺組織におけるHO-1産生は日常的ストレスを反映しており、組織の機能恒常性維持に重要であることが示唆された。またヒトのPHにおいては、肺胞マクロファージ由来HO/CO系がPHの病態形成に保護的に関与している可能性が示唆された。しかし、PHの成因によってHO-1発現の特徴が多様であり、この点に関して今後の検討が必要であると考えられた。

Key words heme oxygenase-1, carbon monoxide, pulmonary hypertension, alveolar macrophage

肺高血圧症 (pulmonary hypertension, PH) の中で原発性肺高血圧症 (primary pulmonary hypertension, PPH) や先天性心疾患などに伴った続発性肺高血圧症は肺動脈高血圧症に分類される。PPHは原因となる基礎疾患がなくPHを来した場合に診断されるが、進行性かつ難治性で極めて予後不良の疾患である。また先天性心疾患に伴うPHは、術前術後および遠隔期に患児の予後を左右する危険因子の一つである¹⁾。中でも左右短絡を有し高肺血流によるPHを合併する心疾患は頻度が高く、その病因や病態の把握は治療法を考える上で重要である。近年は心エコーや心臓カテーテル検査にて手術適応が評価されることが多いが、手術適応に問題がある症例や、手術適応があってもPHの病理組織学的な重症度や術後遠隔期の予後を把握するために肺生検診断が必要な場合がある。高肺血流によるPHの肺高血圧性肺血管病変は、肺血流増加に伴って末梢肺動脈枝や細

小動脈の中膜の肥厚、内膜の増殖や内腔の狭窄ないし閉塞が進行し終末像として叢状病変 (plexiform lesion) の出現を見るといわれている²⁾。PHの研究はその病理所見の解析に始まり、最近は分子生物学的なレベルで多くの知見が得られるようになってきている。すなわち、血管内皮細胞のバリアとしての機能障害、一酸化窒素 (NO) やエンドセリン (endothelin, ET) などの血管作動物質のバランスの破綻、血管平滑筋細胞収縮制御系の異常、凝固線溶系の異常など様々な病態解明が進んでいる³⁾。

NOは血管内皮由来弛緩因子として生体内各所で多彩な生理活性を有するガス状伝達物質であるが、近年NOと類似した性格を有する可能性のある物質として一酸化炭素 (CO) が注目されている。ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase, HO) はヘム蛋白を最終的にビリルビンに分解する律速酵素で、この反応過程でCOが産生される。HOは現在3つのアイソフォーム (HO-1,

平成16年2月27日受付, 平成16年4月13日受理

Abbreviations : Aop, aortic pressure; ET, endothelin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HO, heme oxygenase; MPAP, main pulmonary artery pressure; PH, pulmonary hypertension; PPH, primary pulmonary hypertension; Qp/Qs, pulmonary to systemic flow ratio; Rp, pulmonary resistance; TBS, tris-buffered saline; VSD, ventricular septal defect

HO-2, HO-3) が知られ, そのうちHO-1は誘導型で虚血と再灌流, 低酸素, 酸化ストレスなど多彩な刺激でその発現が誘導され, ストレス蛋白の一つに分類されている^{4)~6)}. HO-1は血管平滑筋細胞からも産生され⁷⁾, COを介して心血管系において血管拡張作用, 炎症制御を担うと示唆されている⁸⁾⁹⁾. HO-1はCO産生を介して肺血管床においても血管トーンを弛緩させる方向に作用し, PHの病態に関与している可能性が考えられる. 低酸素暴露ラットに対しHO-1を誘導させることによってPH病変が緩和されたという報告があるが¹⁰⁾, ヒトのPHにおけるHOの役割についてはほとんど報告がない. そこで今回の研究では種々の基礎疾患に起因するPH症例を収集し, それらの症例の肺組織内のHO-1発現様式の特徴について検討した.

また, 最近の臨床疫学と分子遺伝学の発展により, 様々な遺伝子の多型が特定の疾患の予後規定因子であることが明らかにされている. ヒトHO-1遺伝子のプロモーター領域にはGT反復配列が存在しており, このGT反復数は個体によって数が異なるDNA多型を示すことが明らかになっている¹¹⁾¹²⁾. そして, その多型が酸化ストレス下のHO-1産生誘導量を制御すること, 肺気腫や種々の血管病変の発症と関連することが示唆されている¹³⁾¹⁴⁾. 今回の研究では, PHを伴う心室中隔欠損症 (ventricular septal defect, VSD) におけるHO-1の発現量を検討すると共に, GT反復配列の多型との関連について解析した.

対象と方法

I. 対象

1999年9月から2002年9月までの間に金沢大学小児科および共同研究機関である関連病院にて, 治療管理がなされたVSD患者のうち, 説明と同意後検体採取が可能であった22名を対象とした. また他のPH疾患としてPPHを1名, 血管炎に続発したPHを3名, コントロールとして非心疾患患者2名 (うち1名はHO-1欠損症) を対象に加えた.

これら検体の一部は既提供試料であったが, 試料を匿名化することで研究結果が提供者等に影響を与えないように考慮した. また個人情報については結果に全く表現されず, 保護されている. 以上の点については金沢大学医学部等医の倫理委員会の承認を得た (課題番号第15号).

II. 方法

1. 材料

VSD患者においては心内修復術の際にPHの評価目的に肺生検を行い, 右肺中葉の肺区域S₅または左肺舌区より肺生検組織を採取した. 本研究では説明と同意の後でその生検組織の一部を材料とした. 各々の肺組織標本について10%ホルマリン溶液で固定した後パラフィン包埋切片を作成し, また-80℃凍結組織標本を作成した. 他の患者については剖検にて得られた肺組織のパラフィン包埋切片を用いた.

2. 肺高血圧の評価

VSD患者では術前に静脈麻酔下で心臓カテーテル検査を施行し, 主肺動脈圧 (main pulmonary artery pressure, MPAP), 大動脈圧 (aortic pressure, Aop), 肺血管抵抗 (pulmonary vascular resistance, Rp), 肺体血流比 (pulmonary to systemic flow ratio, Qp/Qs) を測定した. VSDは欠損孔の位置によってKirklin分類を用いて分類した. また組織学的には全例パラフィン包埋切片を用いてH-E染色および弾性線維 (elastica van gieson) 染色を行い肺血管病変を観察した. PH病変の組織学的重症度として

は, 肺血流増加型先天性心疾患に起こる肺血管病変について, 肺小動脈の中膜の肥厚からはじまり最終的に叢状病変を形成する過程としてgrade I からgrade VIまで分類されたHeath-Edwards分類を用いて評価した²⁾. なお組織学的にPHの所見がなかった場合はNormal (N) とした.

3. 肺組織におけるHO-1発現の検討

1) 免疫組織染色

肺組織パラフィン包埋切片を脱パラフィン, 脱アルコール処理を行い, トリスアミノメタン緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) (pH 7.2) にて5分, 3回洗浄した. その後抗原性の賦活化目的に10% Target-Retrieval溶液 (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) に各切片を浸し, 6分間マイクロウェーブ照射 (500W電子レンジ) で加熱処理を行った. 加熱終了後, 沸騰した10% Target-Retrieval溶液に浸したまま室温に30分間放置した後, TBSにて5分, 3回洗浄した. 4%正常ヤギ血清 (DAKO) を加えたTBSで30分間ブロッキング処理後, 200倍希釈のウサギ抗ヒトHO-1ポリクローナル抗体 (SPA896, Affinity Bioreagents, USA) を一次抗体として4℃で12時間反応させた. TBSにて5分, 3回洗浄後アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ・抗マウス血清 (DAKO) を二次抗体として室温で30分間反応させた. TBSにて5分, 3回洗浄後, 0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.6) 9.8mlにNaphtol AS-MX phosphate (Sigma, St Louis, USA) 2mg, シアゾジウム塩 (Fast-red TR Salt, Sigma) 10mg, レバミゾール (Levamisole, Sigma) 2.4mgを溶解したものを基質として発色させた. 発色後蒸留水内で反応を止め, Mayerヘマトキシリン溶液にて核染色を行い観察した.

HO-1陽性強度は組織全体として気道上皮, 肺胞マクロファージのHO-1発現をnone, weak, moderate, intenseの4段階で評価した. 特に肺胞マクロファージについては全く染色されないものを0点, 淡くもしくはまばらに染色されるものを1点, 濃く均一に染色されるものを2点と定め, 強拡大20視野あたりの肺胞マクロファージを数え, 点数化してpointという指標を算出した (図1). 各評価は3名で行い, 臨床情報を知らされずに施行し, その平均をpointとした.

2) 肺組織におけるHO-1mRNAの発現の定量的評価

i. RNAの抽出

Chomczynskiら¹⁵⁾の方法を以下のように改良して行った. 凍結肺組織100mgに対してTRISOL Reagent (ライフテック オリエンタル (株), 東京) を1mlを加えて十分にホモジナイズし, 99.5%クロロホルム200 μ lを加えて攪拌した. 室温で5分間静置した後, 微量遠心器にて15000回転/分, 4℃, 15分間で遠心分離した. 上層部を採取し等量のイソプロパノールを加え混和し-20℃で12時間静置した後, 15000回転/分, 4℃, 20分間遠心した. 上清を除去し, 80%エタノールを1ml加えて沈殿物を溶解し15000回転/分, 4℃, 5分間遠心沈殿後, 上清を完全に除去し室温で5分間放置し乾燥させた. 1 \times Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 6.8, 1 \times TE) 26 μ lに溶解し, 260nmの吸光度を測定して総RNA濃度を測定した. また260nm, 280nmの吸光度の比を測定してRNAの純度の参考とし, この比が1.7から2.0のRNAを使用した.

ii. cDNAの合成

上記によって得られた総RNAを鋳型としランダムプライマーにてcDNAを作成した. 逆転写反応は以下の二段階にて行った. まず試料を総RNA2 μ gを含むように1 \times TE (pH 6.8) にて

希釈し23.5 μ lに反応量を調節し、さらに80 μ Mランダムヘキサヌクレオチドプライマー (Random Hexanucleotide primer, 宝酒造, 大津) を1.5 μ l加えた。GeneAmpTM PCRシステム9600-R (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster City, USA) を用いて、65 $^{\circ}$ Cで10分間保持後20分間かけて25 $^{\circ}$ Cまで徐冷することでRNAの変性とプライマーのアニーリングを行った。引き続き逆転写酵素RAV-2 (宝酒造) に付属の逆転写反作用緩衝液 (5 \times RAV-2 Reverse Transcriptase Buffer) に各1mM dNTP (Pharmacia, Los Angeles, USA) を加えた緩衝液24.5 μ lとRAV-2 0.5 μ l (10単位) を加えてGeneAmpTM PCRシステム9600-Rを用いて、42 $^{\circ}$ Cで60分間保持し、cDNAを合成させた後90 $^{\circ}$ C、2分間でRAV-2を失活させた。反応終了後1 \times TE (pH 7.0) 50 μ lを加えて総量100 μ lとした。

iii. リアルタイム定量的PCR法によるcDNAの定量

リアルタイム定量的PCR法はTaqMan DNAポリメラーゼの5'エンドヌクレアーゼ活性を利用し、TaqManプローブと呼ばれる蛍光プローブの蛍光強度の変化を検出し、特異的なPCR増幅産物の検出をおこなうものである¹⁶⁾。今回は調製したcDNAのうち5 μ lを鋳型として、最終0.2 μ Mの各プライマー、最終120nMのTaqManプローブ、Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) を加え全量50 μ lでリアルタイム定量的PCR反応を行った。プライマーはセンスプライマーとして5'-TGAGGAAGCTTTTCAGAAGGGCC-3'、アンチセンスプライマーとして5'-TGTTGCGCTCAATCTCCTCC-3'を設計し、合成はフナコシ (株) (東京) に委託した。TaqManプローブは5'-CGGCTTCAAGCTGGTGATGGCC-3'にレポーター色素としてFAMを、クエンチャー色素としてTAMRAをラベルするように設計し、合成はフナコシ (株) へ委託した。PCR反応はABI PRISM 7700 Sequence Detectorを用い、MicroAmp Optical 96well Reaction Plate (Perkin-Elmer) およびMicroAmp Optical caps内で行った。反応は50 $^{\circ}$ C \times 2分のAmpErase uracil N-glycosylase処理、95 $^{\circ}$ C \times 10分の初期変性後、95 $^{\circ}$ C \times 15秒、60 $^{\circ}$ C \times 1分のサイクルで40回増幅した。PCR反応を行う際に、同時に既知量のターゲットコピー数の標準サンプルとなるcDNAを用いて検量線を作成し、未知の検体のコピー数を計算した。このPCR反応は同一検体で3回行い各平均を算出した。

総RNA抽出過程における検体間の精製の質の差を考慮内部標準としてグリセルアルデヒド-3-リン酸化脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 遺伝子の定量を同様に施行し、各々HO-1/GAPDHの比を算出し相対的発現量の測定を行った。

4. HO-1遺伝子プロモーター領域のGT反復配列多型と肺高血圧症の関連

1) DNAの抽出

VSD患者では、凍結肺組織よりAquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad Laboratories) を使用しDNAを抽出した。また正常対照としては心疾患を伴わない小児よりヘパリン加末梢静脈血を得た後、フィコールハイパーク (Ficoll-Hypaque) 比重遠心法により単核球を分離し、ヨウ化ナトリウム法によりDNAを抽出した。細胞5 \times 10⁵個をリン酸緩衝液200 μ lに浮遊し、ヨウ化ナトリウム溶液 (7.4M NaI, 16mM EDTA, 32mM Tris-HCl (pH 8.0), グリコーゲン40 μ g/ml) 250 μ l, 30% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム5.4 μ lを加えて攪拌し40 $^{\circ}$ Cで

15分間保持した。イソプロピルアルコール450 μ lを加え攪拌し、室温に15分間静置後、15000回転/分、4 $^{\circ}$ C、15分間遠心した。その後上清を除き、33%イソプロピルアルコール400 μ l, 35%イソプロピルアルコール750 μ lで2回洗浄し、上清を捨て乾燥後、1 \times Tris-EDTA緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 50 μ lに溶解しDNA溶液を作成した。

2) HO-1遺伝子プロモーター領域の反復配列の解析

抽出したDNAを鋳型としてPCRを施行した。HO-1プロモーター領域のGT反復配列を含むようにプライマーは5'末端に蛍光色素6FAMをラベルされたセンスプライマーとして5'-AGAGCCTGCAGCTTCTCAGA-3'、アンチセンスプライマーとして5'-ACAAAGTCTGGCCATAGGAC-3'を設計し合成はフナコシ (株) へ委託した。PCR反応は調製したDNAのうち3 μ lを鋳型として、最終0.4 μ Mのプライマー、各200 μ Mの4種類のdNTP、PCR反作用緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl), MgCl₂2.5mM, AmpliTaq DNAポリメラーゼ (Applied Biosystems) 0.75単位を加えて全量30 μ lで行った。反応はGeneAmpTM PCR System 9600-Rを用い5分間 \times 94 $^{\circ}$ Cの初期変性後、94 $^{\circ}$ C \times 20秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C \times 10秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C \times 20秒を1サイクルとし35回増幅した。得られたPCR産物のサイズ分析は、ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Applied Biosystems) を用いてGeneScan法にて分析した。分析条件はキャピラリーは47cm \times 50 μ m, ポリマーはPerformance optimized Polymer 4, 電圧15kV, キャピラリー温度は60 $^{\circ}$ Cである。ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzerは変性系電気泳動を行うシステムでDNAを標識している蛍光色素をレーザーにより検出し、塩基数があらかじめわかっているサイズスタンダードと未知のサンプルを同時に電気泳動することによって再現性良くサンプルの塩基数の測定を行うことができる。蛍光プライマーを用いてPCRを行ったサンプル1 μ lに対しROXTM size standard (Applied Biosystems) を0.5 μ l, 脱イオンホルムアミド12 μ lを加え95 $^{\circ}$ C、2分間加熱変性した後、氷中に静置し急冷した。これをABI PRISMTM 310 Genetic Analyzerを用いてGeneScan法にて解析した。得られた塩基数よりGT反復配列以外の塩基数を差し引いてGT反復配列数を算出した。

5. 統計処理法

肺組織における肺胞マクロファージのHO-1陽性pointの検討およびHO-1mRNAの発現の定量的検討ではノンパラメトリック法のMann-Whitney検定を用いた。またHO-1プロモーター領域のGT反復配列に関しては χ^2 検定を用いた。 $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

成 績

I. 肺組織におけるHO-1発現の免疫組織学的検討

肺組織におけるHO-1発現について非心疾患患者とHO-1欠損症患者について検討した。HO-1欠損症では気道上皮、肺胞マクロファージのいずれもHO-1の発現は陰性であったが (図2A, B), 非心疾患患者の肺組織では、気道上皮や肺胞マクロファージに軽度のHO-1発現が認められた (図2C, D)。

血管炎に続発したPHでは、筋性肺動脈には中膜の肥厚および内膜の増殖による血管内腔の狭小化を認め一部再開通像を認めた。免疫組織染色では、肺胞マクロファージのHO-1発現は増強し、さらに気道周囲や肺動脈周囲に浸潤するマクロファージに強いHO-1発現が観察された (図3A, B, C)。PPHの症例で

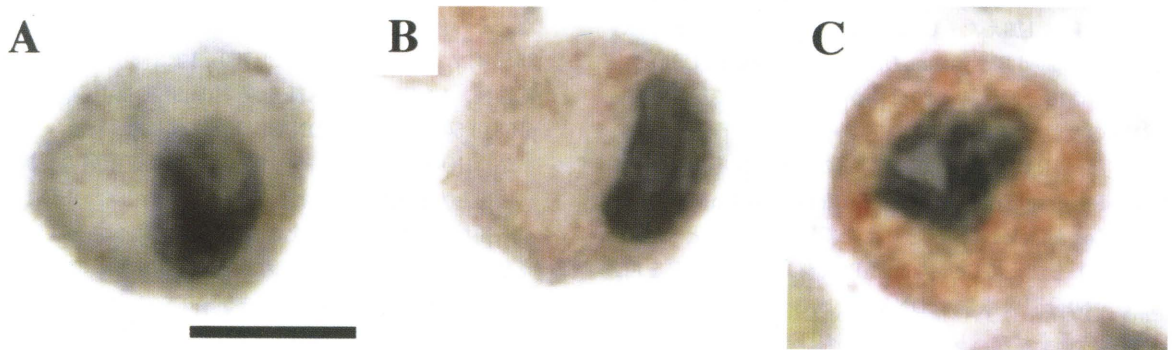


Fig. 1. Immunostaining of alveolar macrophages. Alveolar macrophages were graded into different points as follows: (A) grade 0, no staining; (B) grade 1, weak staining; (C) grade 2, intense staining. The number of alveolar macrophages was counted per 20 high power fields and total points were calculated. Scale bar indicates $5\ \mu\text{m}$.

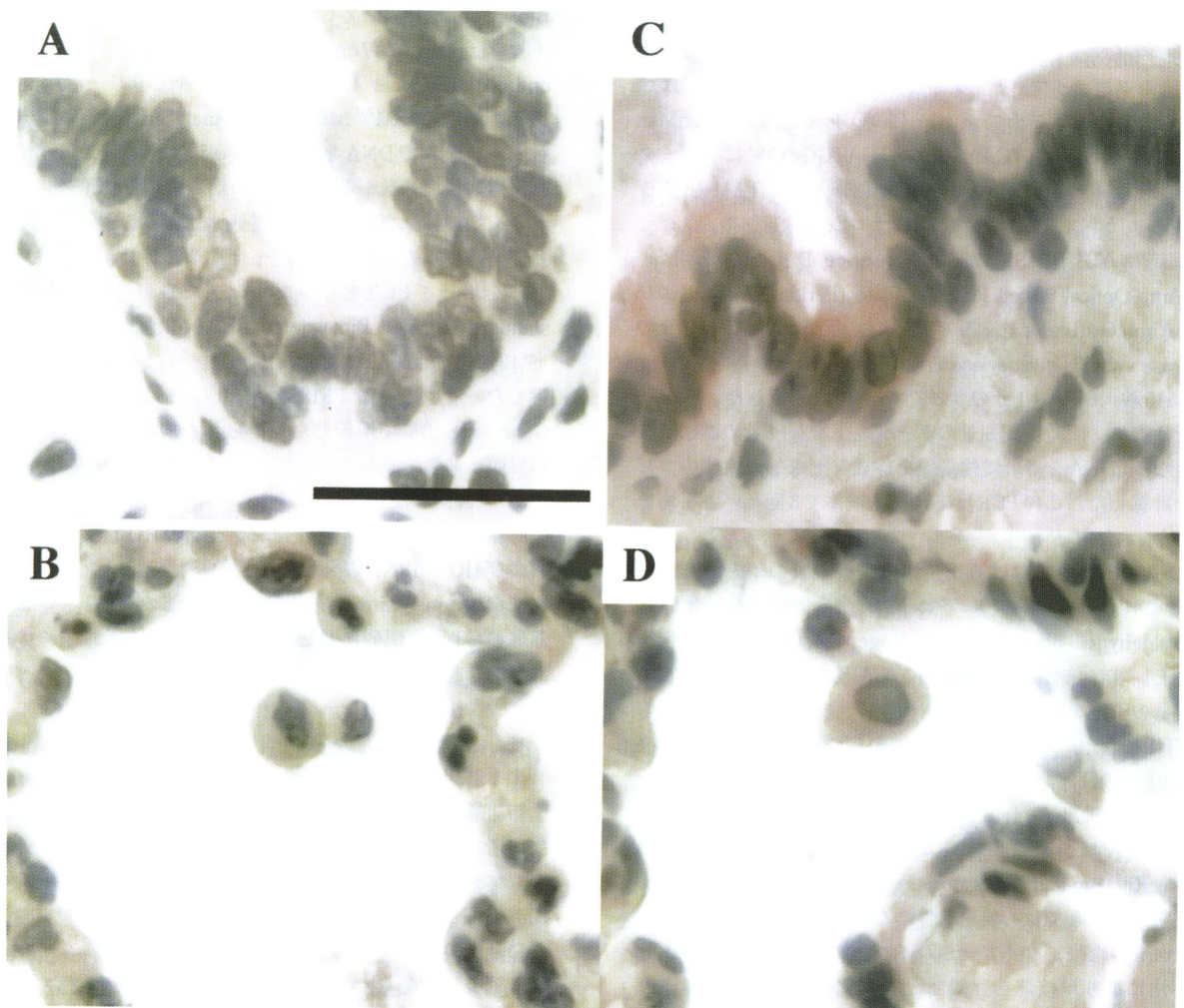


Fig. 2. Immunohistochemical staining of HO-1 in the lung. The bronchial epithelium stained for HO-1 in a HO-1 deficiency case (A) and in a non-cardiovascular case (C). Alveolar macrophages stained for HO-1 in a HO-1 deficiency case (B) and in a non-cardiovascular case (D). Scale bar indicates $20\ \mu\text{m}$.

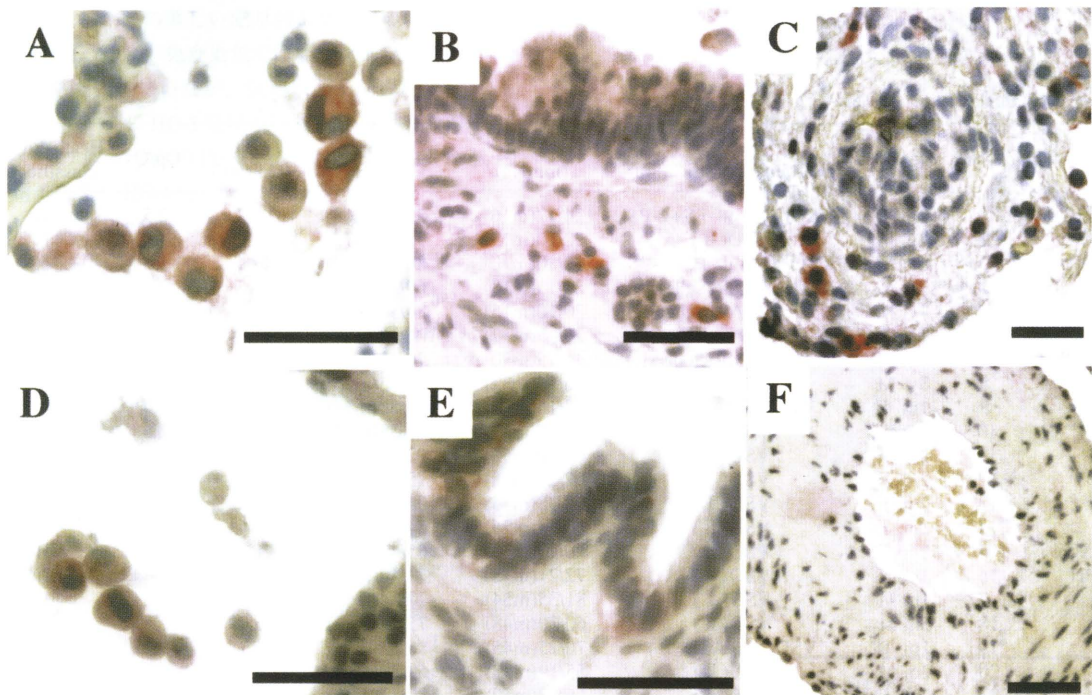


Fig. 3. Immunohistochemical staining of HO-1 in the lung with PH. Alveolar macrophages stained for HO-1 in a subject with PH associated with vasculitis (A) and in a subject with PPH (D). Bronchial epithelium stained for HO-1 in a subject with PH associated with vasculitis (B) and in a subject with PPH (E). Pulmonary artery stained for HO-1 in a subject with PH associated with vasculitis (C) and in a subject with PPH (F). Scale bars in A, B, D and E indicate 20 μ m. Scale bars in C and F indicate 50 μ m.

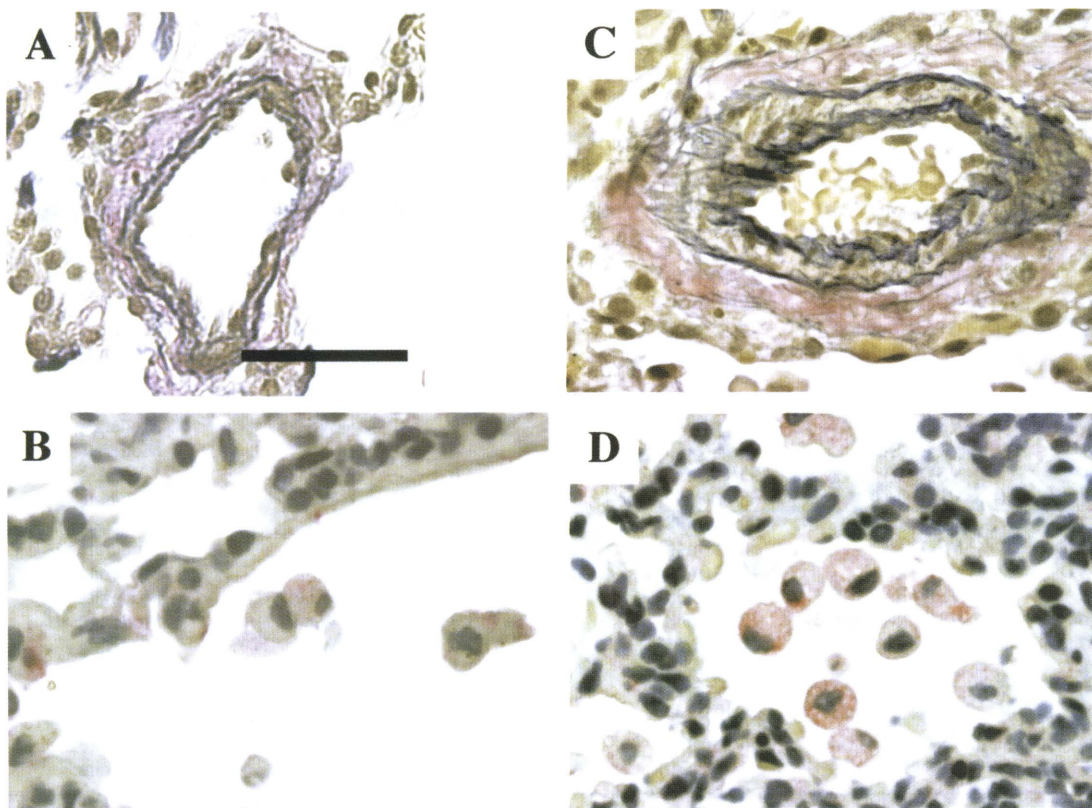


Fig. 4. EVG of pulmonary artery and immunohistochemical staining of HO-1 in the lung with VSD. Pulmonary artery stained for EVG in VSD without PH (case 4, A) and in VSD with PH (case 13, C). Alveolar spaces stained for HO-1 in case 4, (B) and in case 13, (D). Scale bars indicate 20 μ m.

Table.1 Clinical features of VSD

	Case	Age Sex	Diagnosis (Kirklin's classification)	MPAp (mmHg)	Aop (mmHg)	Rp (Unit/m ²)	Qp/Qs	Heath-Edwards classification
PH(-)	1	2m F	VSD(II)+inf-PS+v-PS	24/12(m16)	85/52(m68)	0.7	2.5	N
	2	2y M	VSD(II)	22/10(m15)	90/55(m75)	0.8	1.9	N
	3	6m M	VSD(II)+inf-PS+v-PS	22/10(m10)	86/48(m64)	0.4	1.3	N
	4	7m M	VSD(I)+AR(SellersI ^o)	25/13(m18)	69/41(m53)	0.5	2.6	N
	5	1y M	VSD(I)+AR(SellersI ^o)	20/10(m15)	84/54(m68)	2.8	1.2	N
Moderate PH	6	14y F	VSD(I)+AR(SellersI ^o)	18/ 8(m12)	106/72(m88)	1.0	1.2	N
	7	4m M	VSD(II)+MR(SellersI ^o)	44/15(m30)	70/40(m55)	2.0	3.4	I
	8	3y M	VSD(II)	50/16(m32)	95/55(m75)	4.2	1.9	I
	9	1m F	VSD(I)+ASD(II)	48/18(m30)	86/50(m74)	2.0	4.4	I
	10	1m M	VSD(I)	55/15(m35)	96/55(m82)	2.8	2.6	I
	11	2m M	VSD(II)	68/30(m50)	92/45(m65)	5.5	2.3	I
	12	2m F	VSD(I)	52/20(m38)	73/44(m58)	2.9	2.8	I
	13	2m F	VSD(I)	60/38(m45)	104/72(m88)	2.8	4.2	I
	14	2m F	VSD(II)	40/14(m26)	64/45(m50)	2.4	2.1	I
	15	2m F	VSD(II)	60/20(m35)	65/40(m50)	1.3	8.0	II
Severe PH	16	1m M	VSD(II)	72/21(m48)	79/40(m65)	3.9	3.3	II
	17	1m M	VSD(I)	81/35(m54)	77/34(m54)	6.1	2.6	II
	18	5m M	VSD(II)	60/30(m48)	75/40(m55)	6.9	2.1	I
	19	1m F	VSD(I)+ASD(II)	70/25(m45)	86/53(m75)	4.7	3.1	I
	20	2m M	VSD(II)	55/19(m35)	69/39(m49)	9.4	3.0	I
	21	2m F	VSD(II)	66/28(m50)	80/52(m70)	5.9	1.9	II
	22	4m M	VSD(II)	94/44(m70)	100/60(m80)	8.3	2.4	I

m indicated month, y indicated years. Pressure value indicated systolic/diastolic (mean) pressure.

AR, aortic regurgitation; ASD, atrial septal defect; MR, mitral regurgitation; inf-PS, infundibular pulmonary stenosis; v-PS, valvular pulmonary stenosis.

Table.2 Expression of HO-1 within the lung in pulmonary hypertension

Case	Diagnosis (Kirklin's classification)	MPAp (mmHg)	Rp (Unit/m ²)	Qp/Qs	HO-1 level (bronchial epithelium)	HO-1 level (alveolar macrophage)	Point
1	VSD(II)+inf-PS+v-PS	24/12(m16)	0.7	2.5	Weak	Weak	15
2	VSD(II)	22/10(m15)	0.8	1.9	Weak	Weak	32
3	VSD(II)+inf-PS+v-PS	22/10(m10)	0.4	1.3	Weak	Weak	24
4	VSD(I)+AR(SellersI ^o)	25/13(m18)	0.5	2.6	Weak	Weak	20
5	VSD(I)+AR(SellersI ^o)	20/10(m15)	2.8	1.2		Moderate	192
6	VSD(I)+AR(SellersI ^o)	18/ 8(m12)	1.0	1.2		Weak	15
7	VSD(II)+MR(SellersI ^o)	44/15(m30)	2.0	3.4	Weak	Moderate	156
8	VSD(II)	50/16(m32)	4.2	1.9	Weak	Moderate	194
9	VSD(I)+ASD(II)	48/18(m30)	2.0	4.4		Moderate	120
10	VSD(I)	55/15(m35)	2.8	2.6	Weak	Weak	42
11	VSD(II)	68/30(m50)	5.5	2.3	Weak	Moderate	188
12	VSD(I)	52/20(m38)	2.9	2.8		Moderate	148
13	VSD(I)	60/38(m45)	2.8	4.2	Weak	Moderate	144
14	VSD(II)	40/14(m26)	2.4	2.1		Moderate	60
15	VSD(II)	60/20(m35)	1.3	8.0	Weak	Moderate	94
16	VSD(II)	72/21(m48)	3.9	3.3	Weak	Moderate	123
17	VSD(I)	81/35(m54)	6.1	2.6	Weak	Moderate	144
18	VSD(II)	60/30(m48)	6.9	2.1	Weak	Moderate	153
19	VSD(I)+ASD(II)	70/25(m45)	4.7	3.1	Weak	Moderate	91
20	VSD(II)	55/19(m35)	9.4	3.0		Moderate	156
21	VSD(II)	66/28(m50)	5.9	1.9		Moderate	171
22	VSD(II)	94/44(m70)	8.3	2.4		Moderate	177

Pressure value indicated systolic/ diastolic (mean) pressure.

AR, aortic regurgitation; ASD, atrial septal defect; MR, mitral regurgitation; inf-PS, infundibular pulmonary stenosis; v-PS, valvular pulmonary stenosis.

は、筋性肺動脈には中膜の著しい肥厚および内膜の増殖による内腔の狭小化が認められ、免疫染色では肺胞マクロファージのHO-1発現はやや増強していたが、気道周囲や肺動脈周囲に浸潤するマクロファージにHO-1発現の増強は認められなかった(図3D, E, F)。また、いずれのPH症例においても筋性肺動脈中膜の血管平滑筋細胞にHO-1発現は認められなかった。

次に肺血流増加型PHをきたす疾患としてVSD症例22例を検討した。各々の臨床病型および心臓カテーテル検査結果を表1にまとめた。VSDはKirklin分類のI型(室上稜上部欠損)またはII型(膜性周囲部欠損)であった。PHについて、主肺動脈圧の収縮期圧が大動脈圧の収縮期圧の3/4以上をsevere, 1/2以下をmild, その中間をmoderateとすると症例1-6はPHのない症例, 症例7-14はmoderate PH, 症例15-22はsevere PHを伴っていた。PHを伴うVSDでは筋性肺動脈に中膜の肥厚ないし内膜の細胞性増殖を認め、Heath-Edwards分類のgrade Iないしgrade IIであった。VSD症例の肺組織HO-1発現について図4に示した。症例4は、筋性肺動脈に肺高血圧性変化を認めず(図4A)、HO-1発現は、組織全体では陰性か淡く陽性の肺胞マクロファージが中心であり、肺胞マクロファージのHO-1発現は“weak”であった(図4B)。症例13では、筋性肺動脈の中膜の肥厚を認めており(図4C)、HO-1発現は、組織全体では肺胞マクロファージは比較的均一に濃く染色されるものが主であり、肺胞マクロファージのHO-1発現は“moderate”であった(図4D)。各々の症例のHO-1発現については表2に示した。気道上皮については、一部の症例で弱くHO-1の発現が認められたが臨床データとの関連は明らかではなかった。次に肺胞マクロファージのHO-1陽性pointとPHの関係を検討した。PHを伴う症

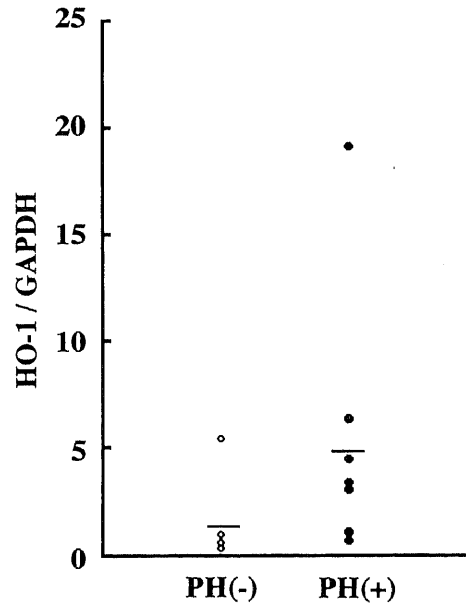


Fig. 6. Quantitative analysis of HO-1 mRNA expression in the lung. The levels of HO-1 mRNA and GAPDH (internal control) mRNA were quantified by a real time PCR method in each of samples from VSD with (close circles) or without PH (open circles). The ratio of relative quantity of HO-1 and GAPDH expressions (HO-1/GAPDH normalized) was compared in each type. Mean values were indicated as horizontal bars.

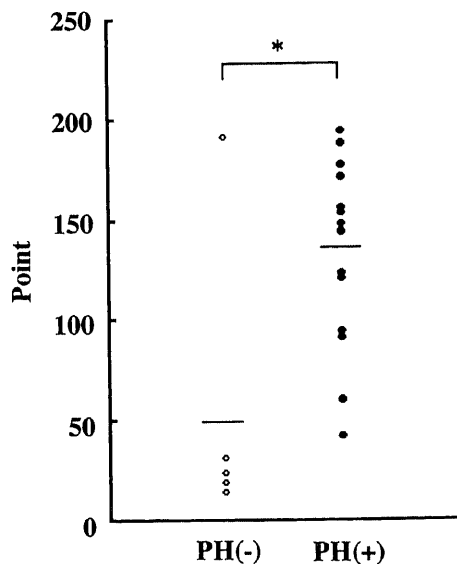


Fig. 5. Relation between PH with VSD and intensity of HO-1 expression in alveolar macrophages. Point was compared between VSD with (close circles) or without PH (open circles). Mean values were indicated as horizontal bars. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test).

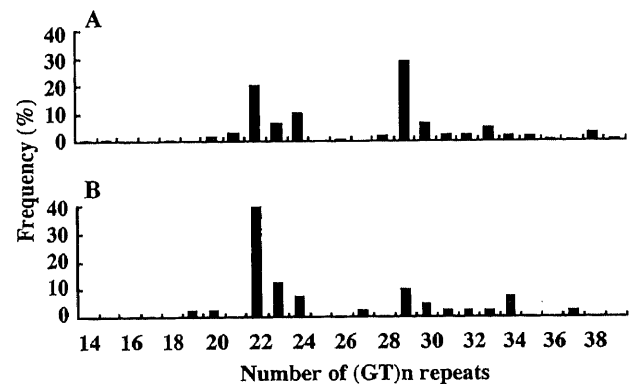


Fig. 7. Distributions of the number of (GT)n repeats. (A) Normal control (n=143). (B) VSD with PH (n=20).

例 (16例) では, PHを伴わない症例 (6例) と比較して肺胞マクロファージのHO-1陽性pointは有意に高値を示していた (図5) (Mann-Whitney検定, $P < 0.05$). さらにQp/Qsが1.5以上の高肺血流症例 (19例) に関して, Rpが2.0以上の症例 (15例) は, Rpが2.0未満の症例 (4例) と比較して有意にHO-1陽性pointは高値を示していた (Mann-Whitney検定, $P < 0.05$). すなわち高肺血流性PHを伴うVSD症例では, 肺組織において肺胞マクロファージのHO-1発現の増強が認められた.

II. リアルタイム定量的PCR法を利用した肺組織におけるHO-1mRNA発現の定量的検討

VSD症例において肺組織から抽出した総RNAよりcDNAを得て, リアルタイム定量的PCR法にてHO-1mRNA発現の定量を行った. 各検体についてGAPDHとの比 (HO-1/GAPDH) を比較した (図6). PHを伴ったVSD症例 (8例) では, PHを伴わないVSD症例 (4例) と比較してHO-1mRNA発現量が高い傾向が認められたが, 統計学的に有意差は認められなかった (4.9 ± 2.2 versus 1.8 ± 1.2 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)).

III. HO-1遺伝子プロモーター領域のDNA多型とPHとの関連

正常対照143名, PHを伴うVSD症例20名について, HO-1プロモーター領域のGT反復配列の多型解析をGene Scan法にて行った. HO-1遺伝子のプロモーター領域のGT反復配列数は, 14から39までの値を示し, GT反復数のピークは22ないし29に認められた (図7). GT反復数をL (32以上), M (26-31), S (25以下) の3つにわけ, 対立遺伝子の頻度と組み合わせにより比較した. 正常対照群とPHを伴うVSD群では, 対立遺伝子の頻度に有意差はなかった. 対立遺伝子の組み合わせとしてはS/Mが最も高頻度に認められ, S/S, L/Sが比較的高頻度に認められた (表3). Lアリルの有無により“S/S, S/M, M/M”と“L/S, L/M, L/L”に分類したが, PHを伴うVSD群と正常対照群を比較してLアリルをもつ頻度に有意差は認めなかった.

Table 3. Distribution of genotype and allele frequencies

Alleles	Number of patients(%)	
	Control	VSD with PH
S	122(42.6)	26(65)
M	117(41.0)	8(20)
L	47(16.4)	6(15)
Genotypes		
S/S	26(18.2)	8(40)
S/M	49(34.2)	6(30)
M/M	26(18.2)	0(0)
L/S	21(14.7)	4(20)
L/M	16(11.2)	2(10)
L/L	5(3.5)	0(0)

S, ≤ 25 repeats; M, 26-31 repeats; L, ≥ 32 repeats.

考 察

近年PPHに代表される重症の肺動脈高血圧症の遺伝学的, 血管生物学的発症機序に関して新たな知見が得られている. とりわけプロスタサイクリンやNO, ETなどの血管作動性物質による肺血管トーンのバランスの破綻についての研究の進展が実際の治療に効果を上げつつあるが, PHの病態に関しては依然不明点も多い¹⁷⁾¹⁸⁾. COはNOと類似作用を示す可能性のあるもう一つのガス状伝達物質であり, 生体内でヘム蛋白からHOにより産生される. HOの3つのアイソフォームのうちHO-1は誘導型で, 血管平滑筋細胞も産生能を有し血管トーンの調節だけでなく血管リモデリングに関与している事が予想されている. COはNO同様に可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化, 細胞内cGMP増加を介して作用する⁷⁾. またin vitroの系で血管平滑筋細胞由来のCOがET-1や血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor-B) の産生を抑制することによって血管平滑筋を弛緩させ, また転写因子E2F-1の調節を介して血管平滑筋の分化を抑制する⁸⁾¹⁹⁾. 一方COは腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α) などの炎症性サイトカインの産生抑制と, 抗炎症性サイトカインであるインターロイキン10の産生増強をもたらし, 抗炎症作用を発揮することが示唆されている²⁰⁾²¹⁾. さらにこのHO/CO系とPHの関連については, 低酸素暴露PHモデルラットで, HO/CO系の誘導によってPHの発症が抑制されたこと¹⁰⁾, またHO-1ノックアウトマウスでは低酸素暴露によってPHの悪化と著明な右室肥大が認められたことが報告されている²²⁾. このことから, HO/CO系は肺血管床においても血管拡張作用と抗炎症作用を介してPHの病態に関与している可能性が考えられる. 本研究ではヒトの種々のPHにおいてHO/CO系の関与について明らかにするため, PHの肺組織におけるHO-1発現の特徴について検討した.

HO-1欠損症と比較して非心疾患の肺組織において気道上皮や肺胞マクロファージに軽度のHO-1産生が認められた. Yachierらは以前末梢血においては, 単球がHO-1産生の主体でありストレス刺激下では単球が著明に反応することを明らかにした²³⁾. 肺胞マクロファージは臓器に常在する単球系の細胞であるが, 正常肺, 気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患などの他の呼吸器疾患において, 肺組織のHO-1産生は主に肺胞マクロファージや気道上皮細胞に認められることが報告されている²⁴⁾²⁷⁾. 肺組織では, 肺胞マクロファージや気道上皮細胞において酸化ストレスなどの日常的ストレスに対してHO-1が保護的な作用をしており, 組織の機能恒常性維持に重要であると考えられた.

本研究では血管炎に続発したPH, PPHおよびPHを伴うVSDと種々の成因によるPHを検討したが, 各々肺胞マクロファージにおいて様々な程度のHO-1発現の増強が認められた. 肺胞マクロファージ由来HO/CO系が血管拡張および炎症抑制作用を介してPHの病態に関与している可能性が考えられる. 血管炎に続発したPHでは気道周囲や肺動脈周囲に浸潤するマクロファージに強いHO-1発現が認められたが, これに対しPPH例ではこのような所見は認められなかった. すなわち, PHの成因によってHO/CO系の関与が異なる可能性があると考えられた. なお両者とも組織学的には筋性肺動脈には中膜の著しい肥厚及び内膜の増殖および血管内腔の狭小化を認めたが, いずれにおいても中膜の血管平滑筋細胞においてHO-1の発現は観察されなかった. in vitroでは血管平滑筋細胞がHO-1

遺伝子を発現し酵素産物であるCOを産生していること、低酸素刺激によりラット血管平滑筋細胞におけるHO-1遺伝子の転写活性が亢進しCO産生が増大することが示され、血管平滑筋細胞がHO-1発現能をもつことが示唆されている⁷⁾。肺血管中膜を構成する平滑筋細胞は通常収縮型という表現型で存在しているが、PHではこの血管平滑筋細胞が、ET-1などの血管収縮物質が作用して肥大、増殖し、さらに合成型へと表現型の変化が生じることが示唆されている²⁸⁾²⁹⁾。PH症例で肥厚した中膜の血管平滑筋細胞においてHO-1の発現を認めなかったのは、この血管平滑筋細胞の表現型の変化が関与している可能性があると考えられた。

VSDでは、PHを伴う症例で肺組織において肺胞マクロファージのHO-1発現の増強が認められた。なおVSD例のPHを伴わない症例5では肺胞マクロファージのHO-1陽性pointが高値を示していたが、これはRpが2以上と高いことを反映しているのかもしれない。またPHを伴わない症例3では肺組織HO-1mRNAの発現が増強していたが、肺動脈弁狭窄により右室圧が高い状態であったため、PH以外の因子が関与している可能性が考えられた。PHを伴うVSD症例で肺胞マクロファージのHO-1陽性pointが有意に高値を示したが、肺組織HO-1mRNA量の検討では明らかな有意差が認められなかった。しかし、HO-1mRNAレベルはPHを伴う症例で高値を示すものがあり、今後症例を増やし検討を続けるべきであると考えられた。

VSD症例において肺胞マクロファージのHO-1発現の違いが遺伝的に規定された発現能の差であるのかについて、HO-1遺伝子のプロモーター領域のGT反復配列の多型を検討した。日本人喫煙者を対象にHO-1遺伝子GT反復配列と肺気腫発症との関連性を検討したYamadaら¹⁰⁾の報告では、反復数の長いアリルを有する喫煙者は肺気腫発症のハイリスク群であり、逆に反復数の短いアリルはそのリスクを低下させる可能性が示された。またHO-1遺伝子反復配列は酸化ストレス下でのHO-1産生誘導量を制御している可能性が示されている¹³⁾¹⁴⁾。同様に経皮的バルーン血管形成術後の再狭窄発症や2型糖尿病患者での冠動脈病変発症との関連性など、種々の血管病変の発症と関連する可能性が報告されている³⁰⁾³²⁾。本研究で解析したHO-1遺伝子のプロモーター領域のGT反復配列数は、14から39までの値を示し、22ないし29にそのピークを認めた。本研究では、PHを伴うVSD例において、反復数32以上の長いアリルを有する割合を正常対象と比較したが両者に有意な差は認めなかった。すなわち遺伝的背景は、肺胞マクロファージによるHO-1産生を規定する重要な因子とはなっていないが、重症度やHO-1産生レベル、GT反復配列の多型との関係については多数症例での比較検討が必要と思われる。

VSD症例の肺胞マクロファージによるHO-1産生の増強は、特に高肺血流かつ肺血管抵抗が高い症例で認められた。Wagnerら³³⁾は、ラットの培養血管平滑筋細胞において血管壁ずり応力 (shear stress) によってHO-1遺伝子発現およびCO産生が増加したことを示している。肺胞マクロファージのHO-1発現の増強は、肺血流増加による血管壁ずり応力によって誘導された可能性がある。さらにPHを伴うVSD症例では、心不全状態であり全身ストレスも大きく、肺胞マクロファージのHO-1産生の増強は、全身性のHO-1産生亢進を反映している可能性も考えられる。一方、モノクロタリン誘発PH動物モデルでは、病理学的には早期より肺動脈内皮細胞の傷害と血管周囲を中心

とした炎症細胞の浸潤がみられ、その後中膜の肥厚や細胞外マトリックスの合成や沈着が引き起こされることが特徴である³⁴⁾。血管周囲を中心とした炎症細胞の浸潤は外膜へのマクロファージの集積を示しており、マクロファージの浸潤がPHへの進展に重要な役割を果たしていると考えられている³⁵⁾。このモノクロタリン誘発PH動物モデルで、HO-1がモノクロタリンによる血管炎症性変化に対し抗炎症作用を示すことが示唆されている³⁶⁾。PHを伴うVSDにおいても、肺胞マクロファージによるHO-1産生の増強は、抗炎症機構により誘導された可能性が考えられる。

以上より、PHを伴うVSDにおける肺胞マクロファージのHO-1産生は、PHの進行に伴う種々のストレス、すなわち血管壁ずり応力、炎症、全身ストレスなどを反映した二次的な変化であると考えられた。結果として肺胞レベルでのHO-1産生の増強はガス状伝達物質としてのCOを供給することによって、局所での還流調節や抗炎症作用など、PHの病態を緩和する機能を果たしている可能性が示唆された。PHを伴うVSDに対する新しい予防、治療戦略を考える上で重要な示唆を与えると考えられる。

結 論

PHにおけるHO-1の役割を明らかにするために、種々の小児PHの肺組織においてHO-1発現を検討し、以下の結果を得た。

1. ヒトの肺組織でのHO-1発現は主に気道上皮と肺胞マクロファージにおいて認められた。
2. PH例において、肺高血圧性肺血管病変での中膜の血管平滑筋細胞においてHO-1産生が観察された例はなかった。
3. 血管炎に伴うPHでは気道上皮、肺胞マクロファージのHO-1発現は増強し、さらに気道周囲や肺動脈壁に浸潤する肺胞マクロファージに強いHO-1産生が観察されたが、PPHではそのようなHO-1発現の増強は認めなかった。
4. VSDのうち高肺血流量性PH症例で肺胞マクロファージのHO-1発現が増強していたが、肺胞マクロファージのHO-1発現の違いは、HO-1遺伝子のプロモーター領域のGT反復配列の多型と関連している可能性は少ないと考えられた。
5. 以上より肺組織におけるHO-1発現は日常的ストレスを反映し、組織の機能恒常性維持に重要であると考えられた。PHにおいて肺胞マクロファージ由来HO/CO系が肺血管拡張に寄与している可能性があり、またその関与はPHの成因によって異なる可能性が示唆された。PHを伴うVSDにおいては、肺胞マクロファージ由来HO-1産生はPHの進行に伴う種々のストレスを反映した二次的な変化であり、肺胞レベルでCOを供給することによって、局所での還流調節や抗炎症作用などのPHの病態を緩和する機能を果たしている可能性が考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学分野 小泉晶一教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接御指導、御教示賜りました金沢大学医学部保健学科医学検査講座 谷内江昭宏教授に心から謝意を表します。また本研究の遂行に際して御助言、御協力をいただきました金沢大学血管発生発達病態学分野 太田邦雄助手および富山県立中央病院心臓血管外科 星野修一先生、同臨床病理科 三輪淳夫先生に厚く御礼を申し上げます。また金沢大学血管発生発達病態学分野の皆様から感謝申し上げます。なお、本論文の要旨の一部は第38回日本小児循環器学会学術集会(2002年、東京)において発表しました。

文 献

- 1) Bush A, Busst CM, Haworth SG, Hislop AA, Knight WB, Corrin B, Shinebourne EA. Correlations of lung morphology, pulmonary vascular resistance, and outcome in children with congenital heart disease. *Br Heart J* 59: 480-485, 1988
- 2) Heath D, Edwards J. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease. A description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* 18: 533-547, 1958
- 3) Archer S, Rich S. Primary Pulmonary Hypertension. *Circulation* 102: 2781-2791, 2000
- 4) Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557-2568, 1998
- 5) Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett* 245: 173-176, 1989
- 6) Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defence against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: 1028-1037, 2000
- 7) Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1475-1479, 1995
- 8) Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 96: 2676-2682, 1995
- 9) Wang R, Wang Z, Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol* 121: 927-934, 1997
- 10) Christou H, Morita T, Hsieh CM, Koike H, Arkonac B, Perrella MA, Kourembanas S. Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by enhancement of endogenous heme oxygenase-1 in the rat. *Circ Res* 86: 1224-1229, 2000
- 11) Shibahara S, Sato M, Muller RM, Yoshida T. Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur J Biochem* 179: 557-563, 1989
- 12) Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, Itoyama Y, Saito H, Takahashi K, Shibahara S. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Hum Genet* 100: 145-147, 1997
- 13) Hirai H, Kubo H, Yamaya M, Nakayama K, Numasaki M, Kobayashi S, Suzuki S, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 102: 1619-1621, 2003
- 14) Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 66: 187-195, 2000
- 15) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 16) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams M. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994, 1996
- 17) Christman BW, Mcpherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327: 70-75, 1992
- 18) Giaid A, Saleh D. Reduced expression of nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333: 214-221, 1995
- 19) Morita T, Mitsialis A, Koike H, Liu Y, Kourembanas S. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272: 32804-32809, 1997
- 20) Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Lu HT, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AMK. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6: 422-428, 2000
- 21) Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8: 240-246, 2002
- 22) Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Christou H, Kourembanas S, Lee ME. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest* 100: 1209-1216, 1999
- 23) Yachie A, Toma T, Mizuno K, Okamoto H, Shimura S, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. *Exp Biol Med* 228: 550-556, 2003
- 24) Lakari E, Pylkäs P, Runtti PP, Pääkkö P, Soini Y, Kinnula VL. Expression and regulation of heme oxygenase 1 in healthy human lung and interstitial lung disease. *Hum Pathol* 32: 1257-1263, 2001
- 25) Lim S, Gronberg D, Fischer A, Adcock I, Barnes PJ, Chung KF. Expression of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1912-1918, 2000
- 26) Harju T, Soini Y, Pääkkö P, Kinnula VL. Up-regulation of heme oxygenase-1 in alveolar macrophages of newly diagnosed asthmatics. *Respir Med* 96: 418-423, 2002
- 27) Maestrelli P, Messleman AH, Fina OD, Nowicki Y, Saetta M, Mapp C, Fabbri LM. Increased expression of heme oxygenase (HO)-1 in alveolar spaces and HO-2 in alveolar walls of smokers. *Am J Respir Care Med* 164: 1508-1513, 2001
- 28) Newby AC, George SJ. Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies. *Cardiovasc Res* 27: 1173-1183, 1993
- 29) Battistini B. Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 68: 600-628, 1993
- 30) Exner M, Schillinger M, Minar E, Mlekusch W, Haumer M, Mannhalter C, Wagner O. Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with restenosis after percutaneous transluminal angioplasty. *J Endovasc Ther* 8: 433-

440, 2001

31) Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Rumpold H, Mannhalter C, Wagner O, Minar E. Heme oxygenase-1 genotype is a vascular anti-inflammatory factor following balloon angioplasty. *J Endovasc Ther* 9: 385-394, 2002

32) Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Wu TC, Chen LC, Ding PY, Pan WH, Jou YS, Chau LY. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet* 111: 1-8, 2002

33) Wagner CT, Durante W, Christodoulides N, Hellums JD, Schafer AI. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*

100: 589-596, 1997

34) Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Lame MW, Estep JE, Morin D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22: 307-325, 1992

35) Sugita T, Hyers TM, Dauber IM, Wagner WW, McMurtry IF, Reeves JT. Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol* 54: 371-374, 1983

36) Goto J, Ishikawa K, Kawamura K, Watanabe Y, Matsumoto H, Sugawara D, Maruyama Y. Heme oxygenase-1 reduces murine monocrotaline-induced pulmonary inflammatory responses and resultant right ventricular overload. *Antioxid Redox Signal* 4: 563-568, 2002

Characteristic Patterns of Heme Oxygenase-1 Expression in the Lung Tissue of Pediatric Patients with Pulmonary Hypertension Nami Nakamura, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **113**, 23 — 33 (2004)

Key words heme oxygenase-1, carbon monoxide, pulmonary hypertension, alveolar macrophage

Abstract

Heme oxygenase (HO) s function as the rate limiting enzymes in heme degradation. Among three different isoforms of HOs, HO-1 is rapidly induced upon stimulation with various oxidative stress. It has been suggested that HOs exert potent vasodilatory and anti-inflammatory effects through its production of carbon monoxide (CO) and affects circulatory systems in various vascular tissues. Furthermore, it is recently suggested that length polymorphism of GT repeats within the promoter region of HO-1 gene is closely associated with the severity of various vascular disorders, by regulating the transcription of HO-1 mRNA and controlling the production of HO-1 protein. In this study, the characteristics of HO-1 expression in the lung tissues of childhood pulmonary hypertension (PH) were examined. Included in this study are 3 cases of PH associated with vasculitis, a case of primary PH, 22 cases of ventricular septal defect (VSD), a case of non cardiac disease and a case of HO-1 deficiency. HO-1 protein expression was examined by immunohistochemistry and HO-1 mRNA level was determined by real time PCR. GT repeat length polymorphism within HO-1 promoter region was analyzed by Gene scan program. HO-1 protein was not detectable within the lung tissue in HO-1 deficiency. Bronchial epithelium and alveolar macrophages from normal lung tissue showed low, but detectable levels of HO-1. In PH associated with vasculitis, HO-1 expression was significantly enhanced within alveolar macrophages, and within macrophages infiltrating the peribronchial tissue and pulmonary arterial walls. In contrast, HO-1 expression was only moderately enhanced within alveolar macrophages and it was not detectable within the peribronchial tissue or the pulmonary artery in primary PH. Among VSDs, cases with high pulmonary vascular resistance and high pulmonary blood flow tended to express higher levels of HO-1, suggesting that association of PH leads to enhanced HO-1 production in VSD. There was no significant correlation between GT repeat lengths within HO-1 promoter region and the levels of HO-1 expression in these patients. These results indicate that lung tissue is constantly exposed to a certain level of oxidative stress even in normal individuals and that HO-1 within the lung tissue plays significant roles in maintaining the functional homeostasis of the alveoli. Furthermore, HO/CO production by alveolar macrophages may exert important protective roles in the development of PH. In the future study, further investigations are required to disclose the reason why the levels and the patterns of HO-1 expression differ significantly among PH cases of different etiology.