

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04816

研究課題名(和文) 基礎研究の臨床応用による心血管病の新しい早期診断・予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new early diagnosis, prevention and treatment of cardiovascular disease by clinical application of basic research

研究代表者

佐藤 公雄 (Sato, Kimio)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・准教授

研究者番号：80436120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変動物を用いた基礎研究により、CyPAが肺高血圧症にとって重要蛋白であることを確認した。さらに、ヒト肺高血圧症患者の末梢血での血漿中CyPA濃度の測定法を開発し、患者群で健常者群に比較して、濃度が上昇していることを確認した。さらに、CyPA高濃度群と低濃度群に分け、長期的な予後調査を行ったところ、血漿中CyPA濃度が高い群で、明らかに生命予後が不良であった。さらに、患者由来の組織や血液検体およびハイスループット・スクリーニング(HTS)システムを用い、CyPA分泌抑制・細胞外CyPA受容体阻害に着目した治療薬のスクリーニングを進め、肺高血圧モデルマウスにおける有効性を検証した。

研究成果の概要(英文)：We have performed basic research using genetically modified mice and confirmed that CyPA is an important protein for the development of pulmonary hypertension (PH). Next, we developed a method for measuring the plasma CyPA concentration in patients with PH and confirmed that the concentration was elevated in patients compared with healthy controls. Moreover, patients with high plasma CyPA showed poorer prognosis compared with those with low CyPA levels. Third, we performed screening of therapeutic molecules focusing on inhibition of CyPA and extracellular CyPA receptor (basigin) by using high throughput screening system, and validated the effectiveness in animal models of PH.

研究分野：循環器内科

キーワード：循環器・高血圧 肺高血圧症 医歯薬学 内科系臨床医学 循環器内科学 分子血管学 臨床応用研究

### 1. 研究開始当初の背景

心血管病発症には、低酸素ストレスや酸化ストレスが強力な促進因子として働いている。これまで、ストレス刺激で血管平滑筋細胞より分泌される新規蛋白サイクロフィリン A (CyPA)を同定した。また、分泌された細胞外 CyPA が酸化ストレスを誘導することから、酸化ストレス増幅作用を有することを発見した。さらに、酸化ストレスによる CyPA の分泌は Rho キナーゼ依存性であり、両者が密接に絡み合って相加・相乗効果を形成することを発見した。我々は、この細胞外 CyPA が動脈硬化・大動脈瘤・心肥大・肺高血圧症発症の重要蛋白であることを報告した。さらに、これまで不明であった血管平滑筋細胞の細胞外 CyPA 受容体として Basigin を同定し、その遺伝子欠損マウスを用いて肺高血圧症発症における重要性を証明した。また、細胞外 CyPA は Basigin に作用して、多くのサイトカインや増殖因子の分泌および血管平滑筋細胞の増殖・遊走を促進することを証明した。

### 2. 研究の目的

心血管病発症における酸化ストレス分泌蛋白 CyPA およびその受容体 Basigin の基礎研究成果を基盤とし、臨床応用研究を加速させ、迅速診断薬開発や治療薬スクリーニングを行うことにある。遺伝子改変動物を用いた基礎研究を行い、CyPA が動脈硬化・大動脈瘤・心不全・肺高血圧症にとって重要蛋白であることを報告した。そこで、心血管疾患患者由来の組織や血清および新たに導入されたハイスループット・スクリーニングシステムを用い、CyPA 分泌抑制・細胞外 CyPA 受容体阻害・細胞外 CyPA 吸着の3つの機序による治療薬開発を進める。

### 3. 研究の方法

本研究は大きく3つの計画研究から成る。研究方法としては、CyPA 分泌阻害・CyPA 受容体阻害・細胞外 CyPA 吸着の3つの方法により、細胞外 CyPA の作用を抑制する薬剤の開発を行う。臓器特異的遺伝子改変マウス(CyPA, Basigin, ROCK1, ROCK2)を用いた分子生物学的な解析に加えて、生理実験や CyPA 阻害薬のモデル動物(肺高血圧症・動脈硬化・大動脈瘤・圧負荷心肥大)への慢性投与実験を行う。また、各計画研究において、その臨床的意義を確認するために、当科で得られた患者由来組織や樹立細胞・血漿サンプルを用いて、ヒト組織における反応性や発現変動の解析を行う。また、CyPA と免疫抑制剤シクロスポリンの強力な結合性を利用した CyPA 特異的センサー分子による CyPA 阻害薬の治療効果を評価する。

### 4. 研究成果

1. CyPA 分泌抑制に着目した新しい心血管病治療薬開発：既に臨床応用されている既存薬剤ライブラリープレートを利用し、CyPA

分泌阻害という切り口で、心血管病治療効果を有する分子のスクリーニング(HTS)を進めた。既に、選択的 Rho キナーゼ阻害薬やスタチンは血管平滑筋細胞からの CyPA 分泌を抑制することを確認した。降圧薬や糖尿病薬、脂質異常症治療薬など、直接的もしくは間接的に心血管組織の酸化ストレス抑制効果のある既存薬剤の中から、より効率的に CyPA 分泌を抑制できる薬剤をスクリーニングした。

2. CyPA 受容体 Basigin 阻害に着目した新しい治療薬開発：CyPA/Basigin 阻害による酸化ストレス制御に着目した新しい治療薬の開発を進めた。当科の遺伝子改変動物(CyPA, ROCK1, ROCK2, Basigin)を駆使し、分子学的機序の基礎研究を実施した。また、動物モデルでの有効性を確認した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計31件)全て査読あり

1. Kikuchi N, Satoh K, Kurosawa R, Yaoita N, Md. Elias Al-Mamun, Mohammad Abdul Hai Siddique, Omura J, Satoh T, Nogi M, Sunamura S, Miyata S, Shimokawa H. Selenoprotein P promotes vascular smooth muscle cell proliferation and pulmonary hypertension -A possible novel therapeutic target- Circulation 2018 (in press). doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033113
2. Satoh K, Shimokawa H. Recent advances in the development of cardiovascular biomarkers. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2018;38:e61-e70. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310226.
3. Kozu K, Sugimura K, Aoki T, Tatebe S, Yamamoto S, Yaoita N, Shimizu T, Nochioka K, Sato H, Konno R, Satoh K, Miyata S, Shimokawa H. Sex differences in hemodynamic responses and long-term survival to optimal medical therapy in patients with pulmonary arterial hypertension. Heart Vessels. 2018 Feb 13. doi: 10.1007/s00380-018-1140-6.
4. Satoh K. AMPK $\alpha$ 2 regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stability and neutrophil survival to promote vascular repair after ischemia. Circ Res. 120:8-10, 2017. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310217
5. Satoh T, Satoh K, Yaoita N, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Numano K, Md. Elias-Al-Mamun, Mohammad Abdul Hai Siddique, Sunamura S, Nogi M, Suzuki K, Miyata S, Morser J, Shimokawa H. Activated TAFI promotes the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension -A possible novel therapeutic target- Circ Res. 120:1246-1262, 2017. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310640

6. Ohtsuki T, Satoh K, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, Nogi M, Sunamura S, Yaoita N, Aoki T, Tatebe S, Sugimura K, Takahashi J, Miyata S, Shimokawa H. Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin A in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37:685-693, 2017. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308986
7. Shimokawa H, Kikuchi N, Satoh K. Shrinking basic cardiovascular research in Japan: A tip of the iceberg. *Circ Res.* 121:331-334, 2017. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310845
8. Satoh K. Development of novel therapies for cardiovascular diseases by clinical application of basic research (Review for the 2016 SATO award). *Circ J.* 81:1557-1563, 2017. doi: 10.1253/circj.CJ-17-1029
9. Satoh K, Takahashi J, Matsumoto Y, Tatebe S, Aoki T, Kikuchi Y, Hao K, Ohyama K, Nogi M, Suda A, Kasahara S, Sato K, Ichijo S, Shimokawa H. European society of cardiology (ESC) annual congress report from Barcelona 2017. *Circ J.* 81:1758-1763, 2017. doi:10.1253/circj.CJ-17-1103
10. Aoki T, Sugimura K, Tatebe S, Miura M, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Kozu K, Konno R, Miyata S, Nochioka K, Satoh K, Shimokawa H. Comprehensive evaluation of the effectiveness and safety of balloon pulmonary angioplasty for inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension - Long-term effects and procedure-related complications - *Eur Heart J.* 38:3152-3159, 2017. doi:10.1093/eurheartj/ehx530
11. Kina-Tanada M, Sakanashi M, Tanimoto A, Kaname T, Matsuzaki T, Noguchi K, Uchida T, Nakasone J, Kozuka C, Ishida M, Kubota H, Taira Y, Totsuka Y, Kina SI, Sunakawa H, Omura J, Satoh K, Shimokawa H, Yanagihara N, Maeda S, Ohya Y, Matsushita M, Masuzaki H, Arasaki A, Tsutsui M. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. *Diabetologia.* 60:1138-1151, 2017. doi: 10.1007/s00125-017-4259-6
12. Satake Y, Satoh K, Nogi M, Omura J, Godo S, Miyata S, Saito H, Tanaka S, Ikumi Y, Yamashita S, Kaiho Y, Tsutsui M, Arai Y, Shimokawa H. Crucial roles of nitric oxide synthases in  $\beta$ -adrenoceptor mediated bladder relaxation in mice. *Am J Physiol.* 312:F33-F42, 2017. doi: 10.1152/ajprenal.00137.2016
13. Tatebe S, Sugimura K, Aoki T, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Kozu K, Konno R, Satoh K, Fukuda K, Adachi O, Saito R, Nakanishi N, Morisaki H, Oyama K, Saiki Y, Okada Y, Shimokawa H. The efficacy of a genetic analysis of the BMPR2 gene in a patient with severe pulmonary arterial hypertension and an atrial septal defect treated with bilateral lung transplantation. *Intern Med.* 56:3193-3197, 2017. doi: 10.2169/internalmedicine.8686-16
14. Omura J, Satoh K, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, Nogi M, Otsuki T, Kozu K, Numano K, Suzuki K, Sunamura S, Tatebe S, Aoki T, Sugimura K, Miyata S, Hoshikawa Y, Okada Y, Shimokawa H. Protective roles of endothelial AMP-activated protein kinase against hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circ Res.* 119:197-209, 2016. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.308178
15. Suzuki K, Satoh K, Ikeda S, Sunamura S, Otsuki T, Satoh T, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Nogi M, Numano K, Sugimura K, Aoki T, Tatebe S, Miyata S, Mukherjee R, Spinale FG, Kadomatsu K, Shimokawa H. Basigin promotes cardiac fibrosis and failure in response to chronic pressure-overload in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:636-646, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306686
16. Kudo S, Satoh K, Nogi M, Suzuki K, Sunamura S, Omura J, Kikuchi N, Kurosawa R, Satoh T, Minami T, Ikeda S, Miyata S, Shimokawa H. SmgGDS as a crucial mediator of the inhibitory effects of statins on cardiac hypertrophy and fibrosis -Novel mechanism of the pleiotropic effects of statins- *Hypertension* 67:878-889, 2016. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.07089
17. Yaoita N, Satoh K, Satoh T, Sugimura K, Tatebe S, Yamamoto S, Aoki T, Miura M, Miyata S, Kawamura T, Horiuchi H, Fukumoto Y, Shimokawa H. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:1293-1301, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306845
18. Yaoita N, Satoh K, Shimokawa H. Novel therapeutic targets of pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:e97-e102, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308263
19. Minami T, Satoh K, Nogi M, Kudo S, Miyata S, Tanaka S, Shimokawa H. Statins up-regulate SmgGDS through  $\beta$ 1-integrin/Akt1 pathway in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 109:151-161, 2016. doi: 10.1093/cvr/cvv253
20. Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. RhoA/Rho-kinase in the cardiovascular system. *Circ Res.* 118:352-366, 2016. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532
21. Jiang L, Konishi H, Nurwidya F, Satoh K, Takahashi F, Ebinuma H, Fujimura K, Takasu K, Jiang M, Shimokawa H, Bujo H, Daida H. Deletion of LR11 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation with medial thickening in mice.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol. 36:1972-1979, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307900
22. Tatebe S, Sugimura K, Aoki T, Miura M, Nochioka K, Miyamichi-Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Multiple beneficial effects of balloon pulmonary angioplasty in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J*. 80:980-988, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1212
23. Sato H, Ota H, Sugimura K, Aoki T, Tatebe S, Miura M, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Satoh K, Takase K, Shimokawa H. Balloon pulmonary angioplasty improves biventricular functions and pulmonary flow in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J*. 80:1470-1477, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1187
24. Aoki T, Sugimura K, Nochioka K, Miura M, Tatebe S, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Kozu K, Miyata S, Satoh K, Shimokawa H. Effects of balloon pulmonary angioplasty on oxygenation in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension - Importance of intrapulmonary shunt. *Circ J*. 80:2227-2234, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-16-0254
25. Sato H, Miura M, Yaoita N, Yamamoto S, Tatebe S, Aoki T, Satoh K, Ota H, Takase K, Sugimura K, Shimokawa H. Pulmonary arterial hypertension associated with congenital portosystemic shunts treated with transcatheter embolization and pulmonary vasodilators. *Intern Med*. 55:2429-2432, 2016. doi: 10.2169/internalmedicine.55.6557
26. Takahashi J, Satoh K, Fukuda K, Sugimura K, Matsumoto Y, Nakano M, Tsuburaya R, Aoki T, Hao K, Nishimiya K, Ito K, Sakata Y, Shimokawa H. Overview of the 80th annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society - The past, present and future of cardiovascular medicine in Japan - *Circ J*. 80:1689-1694, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-16-0644
27. Satoh K, Kikuchi N, Kurosawa R, Shimokawa H. PDE1C negatively regulates growth factor receptor degradation and promotes vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*. 116:1098-1100, 2015. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306139
28. Satoh K. Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases. *Tohoku J Exp Med*. 235:1-15, 2015. (Review) doi: 10.1620/tjem.235.1
29. Ellawindy A, Satoh K, Sunamura S, Kikuchi N, Suzuki K, Minami T, Ikeda S, Tanaka S, Shimizu T, Enkhjargal B, Miyata S, Taguchi Y, Handoh T, Kobayashi K, Kobayashi K, Nakayama K, Miura M, Shimokawa H. Rho-kinase inhibition during early cardiac development causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35:2172-2184, 2015. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305872
30. Shimokawa H, Satoh K. 2015 ATVB plenary lecture: translational research on Rho-kinase in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35:1756-1769, 2015. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305353
31. Shimokawa H, Satoh K. Light and dark of reactive oxygen species for vascular function. *J Cardiovasc Pharmacol*. 65:412-418, 2015. (Review) doi: 10.1097/FJC.0000000000000159
- 〔学会発表〕(計 250 件)
1. 第 82 回日本循環器学会学術集会(3 月 23 日 ~ 25 日、2018 年、大阪市) Satoh K, Ohtsuki T, Miyata S, Miura M, Nochioka K, Sunamura S, Suzuki K, Nogi M, Kurosawa R, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Aoki T, Tatebe S, Sugimura K, Sakata Y, Shimokawa H. Prognostic Impacts of Soluble Form of Basigin in Patients with Chronic Heart Failure -From a Prospective Large Clinical Trial with 1,147 Patients
- 〔図書〕(計 7 件)
1. Satoh K, Sugimura K, Shimokawa H. Rho-kinase as a therapeutic target for pulmonary hypertension. In: Fukumoto Y (ed), *Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. From Bench to Bedside*, pp. 67-76. Springer Nature, Singapore, 2017.
2. Shimokawa H, Satoh K. Reactive Oxygen Species in Cardiovascular System. *Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health*. (book chapter) June 1, 2016 by CRC Press, Reference - 543 Pages - 32 Color & 73 B/W Illustrations, ISBN 9781498735452 - CAT# K26429
3. Satoh K, Shimokawa H. Cyclophilin A: Novel biomarker for oxidative stress and cardiovascular diseases. In: Preedy VR, Patel VB (eds), *General Methods in Biomarker Research and Their Applications*, pp. 405-438, Springer Reference, London, 2015.
4. 佐藤 公雄、下川 宏明. 科学評論社 『循環器内科』特集/SGLT2 心腎連関 解説 Cyclophilin A VoL.82 No.4, p.391 ~ 397. (2017 年 10 月号)
5. 佐藤 公雄、下川 宏明. 「動脈硬化予防」メディカルビュー社 「動脈硬化の臨床評価指標」 VoL.15(No.4): p.82 ~ 84, 2016 年 12 月.
6. 佐藤 公雄. 南江堂 「循環器専門医」(2016 年 2 月) 「喫煙と循環器疾患 up to date: 喫煙による酸化ストレスと動脈硬化性疾患」 VoL.24(No.1): p.134 ~ 138, 2016 年 2 月.
7. 佐藤 公雄、下川 宏明. 科学評論社 「循環器内科」特集/循環器疾患と分子遺伝学 (2015 年 4 月) 肺高血圧症の分子基盤 第 77

〔産業財産権〕

出願状況 (計 6 件)

1. 名称: セレノプロテイン P 活性阻害作用を有する成分を含有する、肺高血圧症の予防又は治療剤

発明者: 下川宏明、佐藤公雄、菊地順裕

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-121034

PCT 出願番号: PCT/JP2017/ 12713

出願年月日: 2016 年 (平成 28 年) 6 月 17 日

国内外の別: 国内外

2. 名称: 生薬成分を含む肺高血圧症の予防又は治療剤

発明者: 下川宏明, 徳山英利, 植田浩史, 青木淳賢, 土井隆行, 可野邦行, 佐藤公雄, 黒澤亮

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-120901

PCT 出願番号: PCT/JP2017/12717

出願年月日: 2016 年 (平成 28 年) 6 月 17 日

国内外の別: 国内外

3. 名称: 不飽和複素 5 員環含有化合物を含有する肺高血圧症の予防又は治療剤

発明者: 下川宏明, 大島吉輝, 菊地晴久, 青木淳賢, 土井隆行, 可野邦行, 佐藤公雄, 黒澤亮

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-140474

PCT 出願番号: PCT/JP2017/25822

出願年月日: 2016 年 (平成 28 年) 7 月 15 日

国内外の別: 国内外

4. 名称: PPAR アゴニストを含有する、肺高血圧症の予防又は治療剤

発明者: 下川宏明, 佐藤公雄, 佐藤大樹

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-141942

PCT 出願番号: PCT/JP2017/26313

出願年月日: 2016 年 (平成 28 年) 7 月 20 日

国内外の別: 国内外

5. 名称: 生薬成分を含む肺高血圧症の予防又は治療剤

発明者: 下川宏明, 佐藤公雄, 黒澤亮

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-160588

PCT 出願番号: PCT/JP2017/29685

出願年月日: 2017 年 (平成 29 年) 8 月 18 日

国内外の別: 国内外

6. 名称: メベンダゾール及びノもしくはイトラコナゾール又はその塩を含有する、肺高血圧症の予防又は治療剤

発明者: 下川宏明、佐藤公雄、大村淳一、菊地順裕、黒澤亮

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-233034

出願年月日: 2017 年 (平成 29 年) 12 月 8 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 2 件)

1. 名称: サイクロフィリン A による心血管疾患の検査方法

発明者: 下川宏明、佐藤公雄

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号:

特許第 6316200 号

米国特許; 特許第 9,791,461 号

取得年月日: 登録日 2017 年 10 月 17 日

国内外の別: 国内外

2. 名称: 肺高血圧症の検査方法

発明者: 下川宏明、佐藤公雄、菊地順裕

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特許第 6188929 号

取得年月日: 2017 年 8 月 10 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cardio.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 公雄 ( SATOH KIMIO )

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・准教授

研究者番号: 80436120