

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03666

研究課題名(和文)動物モデルを用いた第3群肺高血圧症の治療戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of strategy of treatment for the group 3 pulmonary hypertension in a novel animal model

研究代表者

花岡 正幸 (Hanaoka, Masayuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20334899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺疾患に伴う肺高血圧症(第3群肺高血圧症)の動物モデルにおける、肺血管拡張薬(シルデナフィル)投与による肺血行動態の改善を検討した。血管内皮成長因子(VEGF)受容体阻害薬の皮下注射後、酸素濃度15%の低酸素環境下で6週間ラットを飼育し、肺血管拡張薬を連日投与して肺血行動態を評価した。ホーミングペプチド(CAR)との併用効果を検証し、肺血管拡張薬単剤、およびCARと同時投与した場合、解剖時点での肺血行動態が改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第3群肺高血圧症に対する薬物治療の選択肢として、肺血管拡張薬(シルデナフィル)とホーミングペプチド(CAR)併用療法が効果的である可能性が示唆された。第3群肺高血圧症患者に対する薬物療法は確立されておらず、治療方法および治療薬の開発にあたり、血管内皮成長因子(VEGF)受容体阻害薬と持続低酸素による本動物モデルの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was to investigate the effects of combined administration of sildenafil and homing peptide (CAR) on the hemodynamic deterioration in the group 3 pulmonary hypertension rat model induced by vascular endothelial growth factor receptor inhibitor (SU5416) plus hypoxia. The mean linear intercept was significantly higher in the SU5416/hypoxia rats than the control rats, suggesting enlargement of airspaces in the SU5416/hypoxia rats. In addition, the mean pulmonary arterial pressure (mPAP) was significantly higher in the rats treated with SU5416/hypoxia than the control rats. However, this increase of mPAP in the SU5416/hypoxia rats was significantly inhibited by the concurrent treatment of sildenafil and CAR with an effective improvement of the pulmonary hemodynamics. The concurrent oral administration of sildenafil and CAR improves pulmonary hemodynamics in the rats exposed simultaneously to VEGF receptor inhibitor and hypoxia.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：第3群肺高血圧症 肺気腫 VEGF受容体阻害薬 低酸素 選択的肺血管拡張薬 組織貫通型ホーミングペプチド ラット

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は様々な原因により持続的な肺動脈圧の上昇を認める疾患の総称であり、右心不全から死亡へと至る予後不良の疾患である。慢性肺疾患に伴う肺高血圧症は 2018 年第 6 回肺高血圧症ワールドシンポジウムで提案された肺高血圧症臨床分類（ニース分類）の第 3 群に相当し、左心性心疾患に伴う第 2 群に次いで症例数が多いとされる。多くの第 3 群肺高血圧症では肺動脈圧上昇の程度は軽度であるが、慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease : COPD）や気腫合併肺線維症（combined pulmonary fibrosis and emphysema : CPFE）の一部において高度の肺高血圧症症例が存在するため、その病態に関心が集まっている。肺高血圧症の発症機序は多様であり、肺疾患に伴う肺高血圧症のメカニズムとして想定される成因には、低酸素に関連した機序（肺血管収縮、肺血管リモデリング、炎症、成長因子の活性化）と、低酸素非依存性の機序（喫煙による肺血管内皮の機能低下、肺血管症床の減少）が関与すると考えられているが、確定的なものはない。肺動脈性肺高血圧症（pulmonary arterial hypertension : PAH）は、肺動脈の増殖性変化に伴う血管内腔の狭窄、閉塞により持続的な肺動脈圧上昇をきたす疾患群である。PAH の病因を解明するため様々な動物実験が行われてきたが、本症に認められる進行した病理像（求心性内膜過形成、plexiform 病変）を再現することは難しかった。昨今、血管内皮成長因子（vascular endothelial growth factor : VEGF）受容体阻害薬である SU5416 を皮下注射し、低酸素下で 3 週間、常酸素下で 10 週間飼育することで、PAH の病理像を再現したラットの肺高血圧症モデルが報告された。このラットモデルにおいて、一酸化窒素（nitric oxide : NO）系やエンドセリン系に作用する薬剤など、幾つかの薬剤の肺血管拡張効果が示されている。一方、薬剤投与と同時に組織貫通型のホーミングペプチド（CARSKNKDC : CAR）を投与することで肺血管拡張効果が増強するという、薬剤送達システム（drug delivery system : DDS）の研究も報告されている。すなわち、CAR を用いることで肺血管特異的に薬剤を効率良く送達できる可能性があり、肺高血圧症における治療効果の向上が期待される。SU5416 皮下注射と低酸素曝露などの PAH モデルを用いることにより、様々な薬剤の肺血管拡張効果の検証とその機序の検討、DDS の研究が可能となったが、肺気腫など慢性肺疾患に伴う肺高血圧症（第 3 群肺高血圧症）の動物モデルは確立していない。

## 2. 研究の目的

VEGF 受容体阻害薬（SU5416）の投与と低酸素曝露によるラットモデルにおいて、以下を明らかにする。

- 1) SU5416/低酸素曝露による肺気腫合併肺高血圧症ラットモデルの確立
- 2) 本ラットモデルにおける肺動脈性肺高血圧症治療薬投与による肺動脈圧低下効果の検討
- 3) ホーミングペプチド（CARSKNKDC : CAR）を用いた肺血管拡張増強効果の検討

## 3. 研究の方法

- 1) 4 週齢のオス SD ラットに SU5416 を皮下注射し、低酸素環境下で飼育することで肺気腫、肺高血圧の発症を確認する。
- 2) このラット肺気腫合併肺高血圧症モデルに、ホスホジエステラーゼ 5（phosphodiesterase 5 : PDE-5）阻害薬であるシルデナフィルを投与し、その肺血管拡張効果を評価する。
- 3) シルデナフィルと CAR を同時投与し、肺血管拡張効果をはじめ薬理作用の変化を検討する。
- 4) 肺気腫合併肺高血圧症ラットモデルを用いて炎症や酸化ストレス、アポトーシスの評価、VEGF-NO/NO 合成システムとの関連を検討し、作用機序の解明を試みる。同時に肺気腫抑制効果についても検討を加える。

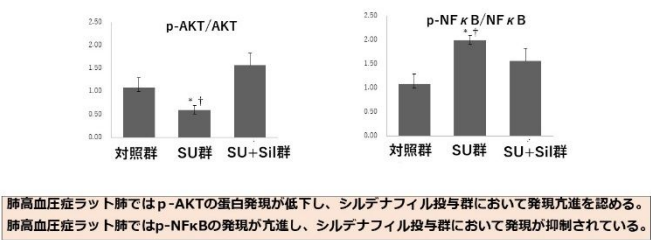
## 4. 研究成果

血管内皮成長因子（vascular endothelial growth factor : VEGF）受容体阻害薬（SU5416）投与と低酸素曝露による第 3 群肺高血圧症（肺気腫合併肺高血圧症）モデルを用いた肺血管拡張薬の投与による肺血行動態の評価を目的として、以下の検討を行った。生後 4 週齢のオス Sprague-Dawley ラット（Charles River Laboratories, Yokohama, Inc.）をコントロール群、SU5416/低酸素曝露群、SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル投与群の 3 群に分けた。SU5416 は 20mg/kg を day1、8、15 に皮下注射し、15% の低酸素下に 6 週間飼育した。シルデナフィル投与群では、初日から連日シルデナフィルを経口投与した。初回の SU5416 皮下注射から 6 週後に肺血行動態を測定し、解剖を行った。

その結果、SU5416/低酸素曝露群はコントロール群と比較して有意な平均肺動脈圧の上昇を認めた。一方、SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル投与群では SU5416/低酸素曝露群と比較して、平均肺動脈圧の有意な低下が認められた。両群において、Heath-Edwards 分類で grade 1~2（中

膜肥大～内膜増殖)の肺動脈病変を認め、叢状病変はみられず、ヒトにおける肺気腫に伴う肺高血圧症(第3群肺高血圧症)に類似していた。肺高血圧症形成に関わるシグナル伝達のうち、一酸化窒素(nitric oxide: NO)合成に重要な AKT と、炎症性シグナルとして NF- $\kappa$ B に着目し、それぞれのウエスタンブロットを行った(図1)。SU5416/低酸素曝露群の肺ホモジネートでは p-AKT の蛋白発現が低下し、SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル投与群において有意に回復していた。一方 NF- $\kappa$ B については、SU5416/低酸素曝露群の核蛋白においてその発現が亢進し、SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル投与群において有意に抑制されていた。シルデナフィル投与における p-AKT 蛋白の発現亢進は、VEGF 受容体阻害/低酸素曝露による酸化ストレスおよび shear-stress に対しての臓器保護的な活性化をみていると考えられた。シルデナフィル投与による p-NF- $\kappa$ B の発現低下は、モノクロタリン誘発肺高血圧症ラットモデルにおいて報告されており、本動物モデルにおいても同様の傾向が観察された。シルデナフィルは細胞質における AKT リン酸化亢進や核内における NF- $\kappa$ B シグナルの抑制を介して肺動脈を拡張し、肺動脈圧を低下させたと考えられ、第3群肺高血圧症発症早期においては肺血管拡張薬に対する反応性が保持されていることが示唆された。

図1 シルデナフィル投与による肺保護効果



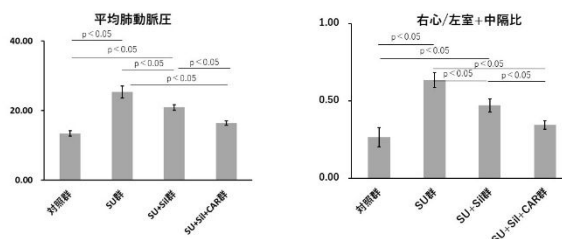
肺高血圧症ラット肺では p-AKT の蛋白発現が低下し、シルデナフィル投与群において発現亢進を認める。肺高血圧症ラット肺では p-NF $\kappa$ B の発現が亢進し、シルデナフィル投与群において発現が抑制されている。

SU群: SU5416 (day1, 8, 15) 投与群, SU+Sil群: SU5416+シルデナフィル投与群

続いて、シルデナフィルにホーミングペプチド(CAR)を併用する検討を行った。本研究ではSU5416投与と低酸素環境下で飼育したラットに、シルデナフィルとCARを併用投与し、その効果を検証した。ラットにSU5416を皮下注射し(day1, 8, 15)6週間低酸素環境下で飼育した。解剖5日前よりシルデナフィルおよびCARの経口投与を連日行った。コントロール群、SU5416/低酸素曝露群、SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル投与群、SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル/CAR投与群の4群に分けて解析した。

SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル投与群と比較し、SU5416/低酸素曝露/シルデナフィル/CAR投与群において、肺血行動態がさらに改善した(図2)。SU5416/低酸素曝露群における肺動脈病変は主として中膜平滑筋層の肥厚が観察され、ヒト第3群肺高血圧症の病理所見に類似していた。また、SU5416/低酸素曝露群では肺気腫の各指標(mean linear intercept:MLI, destructive index:DI)が高値であった。アポトーシスの指標としてカスパーゼ3免疫染色を行いその陽性細胞を計測し、apoptotic index(AI)として算出した。AIはSU5416/低酸素曝露群において有意に高く、肺気腫形成にアポトーシスの関与が示唆された(図3)。肺ホモジネートを用いたウエスタンブロットでは、アポトーシスの指標であるカスパーゼ3の亢進が、シルデナフィルとCARを同時投与した群において最も抑制されていた。シルデナフィルとCARを同時投与した群において、一部のMAPキナーゼ(p38MPAK)のリン酸化が最も抑制されていた。第3群肺高血圧症の発症機序として鍵となる低酸素曝露により亢進したカスパーゼ3およびMAPキナーゼの発現を抑制し得る治療戦略として、シルデナフィルとCARの併用が有望であることが示唆された。

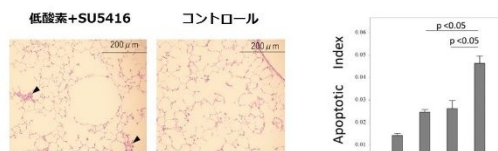
図2 CAR併用による肺血管拡張効果



CAR併用により、肺動脈圧低下と右心肥大の改善を認める。

SU群: SU5416 (day1, 8, 15) 投与群, SU+Sil群: SU5416+シルデナフィル投与群, SU+Sil+CAR群: SU5416+シルデナフィル+CAR投与群

図3 肺高血圧症ラット肺におけるアポトーシスの亢進



肺高血圧症ラット群における肺動脈の中膜肥厚(矢印頭)と気腫の開大、およびアポトーシスの亢進を認める

CONT: コントロール群, SC群: SU5416+シルデナフィル+CAR投与群, SS群: SU5416+シルデナフィル投与群, SU群: SU5416 (day1, 8, 15) 投与群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kinjo T, Kitaguchi Y, Droma Y, Yasuo M, Wada Y, Ueno F, Ota M, Hanaoka M	4. 巻 10
2. 論文標題 The Gly82Ser mutation in AGER contributes to pathogenesis of pulmonary fibrosis in combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) in Japanese patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69184-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuo M, Kitaguchi Y, Tokoro Y, Kosaka M, Wada Y, Kinjo T, Ushiki A, Yamamoto H, Hanaoka M	4. 巻 15
2. 論文標題 Differences between central airway obstruction and chronic obstructive pulmonary disease detected with the forced oscillation technique	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease	6. 最初と最後の頁 1425-1434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/COPD.S246126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Droma Y, Kinjo T, Nozawa S, Kobayashi N, Yasuo M, Hanaoka M	4. 巻 39
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor gene (VEGF) polymorphisms in Sherpa highlanders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Mountain Medicine	6. 最初と最後の頁 32-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 安尾将法, 和田洋典, 北口良晃, 花岡正幸
2. 発表標題 III群肺高血圧症モデルを使用した肺高血圧症の病態解明
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wada Y, Kitaguchi Y, Yasuo M, Hanaoka M
2. 発表標題 Reduction of antioxidant activity in rats of emphysema with pulmonary hypertension induced by SU5416/Hypoxia: Potential roles of vascular endothelial growth factor
3. 学会等名 The 24th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花岡正幸
2. 発表標題 Year Review in Assembly 肺循環・肺損傷学術部会
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤憲彦, 和田洋典, 北口良晃, 安尾将法, 花岡正幸
2. 発表標題 SU5416/低酸素暴露PHラットモデルにおけるシルデナフィル早期投与の効果
3. 学会等名 第5回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hanaoka M
2. 発表標題 Assembly Symposium 15: Pulmonary Circulation: Topics of hypoxia induced pulmonary hypertension: Experimental and clinical approach for pulmonary hypertension due to lung disease
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goto N, Wada Y, Kitaguchi Y, Yasuo M, Hanaoka M
2. 発表標題 Activation of cleaved caspase 3 in young rats of emphysema with pulmonary hypertension induced by SU5416
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花岡正幸
2. 発表標題 低酸素性肺血管攣縮 (Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: HPV) と肺疾患 基礎から臨床 HPV総論
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花岡正幸
2. 発表標題 教育講演 呼吸器疾患における肺高血圧症診療
3. 学会等名 第31回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	安尾 将法  (Yasuo Masanori)  (20402117)	信州大学・学術研究院保健学系・教授   (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北口 良晃  (Kitaguchi Yoshiaki)  (40447751)	信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・講師    (13601)	
研究分担者	和田 洋典  (Wada Yosuke)  (80848739)	信州大学・医学部附属病院・助教    (13601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	後藤 憲彦  (Goto Norihiko)		
研究協力者	雲登 卓瑪  (Yunden Droma)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関