

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591567

研究課題名(和文)cGMP恒常産生ナトリウム利尿ペプチド受容体を用いた肺高血圧治療薬開発

研究課題名(英文) Type B Human Natriuretic Peptide Receptor with a novel gain-of-function mutation provides therapeutic potential in the treatment of pulmonary arterial hypertension.

研究代表者

小垣 滋豊 (Kogaki, Shigetoyo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00311754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Mut-NPR-Bを導入した肺動脈平滑筋細胞においては、細胞内cGMPの著明な増加を認め、増殖能の低下を認めた。動物実験モデルとしてはSugenPAHモデルラットを作成した。SU5416を皮下注射して、低酸素環境下で飼育し、また通常酸素濃度に戻して作成したSugenPAHモデルラットは肺高血圧症を発症し、右室肥大を認め、組織においては肺動脈の中膜肥厚と内膜病変を認めた。Mut-NPR-Bを経気道的にラットの肺内に投与し、治療効果を確認したところ、肺動脈の中膜肥厚が改善し、肺高血圧における血管リモデリングが改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, we have reported a novel missense mutation in the NPR-B gene (2647G>A; Val 883 Met) in a family case showing overgrowth and bone anomalies. We have found that overexpression of the mutated protein in human pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) induced significant increase in cGMP levels compared to WT-NPR-B or GFP control in a ligand-independent manner. Overexpression of Mut-NPR-B suppressed proliferation in PASMCs. In vivo, rats treated with the combination of SU5416 and hypoxia developed pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy and pulmonary vascular obstructive lesions. Intratracheal administration of adenoviral vectors carrying Mut-NPR-B resulted in tendency toward an improvement in vascular remodeling as measured by medial wall thickness of pulmonary vessels compared to WT-NPR-B or GFP control (GFP, 52±13%; WT-NPR-B, 50±4%; Mut-NPR-B, 44±2%, n=4).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：肺高血圧症 CNP ナトリウム利尿ペプチド受容体 cGMP

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は様々な原因により肺動脈圧の上昇(安静時平均肺動脈圧>25mmHg)を認める病態の総称である。罹患率は、特発性・遺伝性 PAH は 100 万人に約 2-3 人(2005 年度厚生労働省調査:患者数約 700 名)と稀であるが、二次性に PAH をきたす疾患は多岐にわたり、中でも先天性心疾患や膠原病に伴う PAH は頻度も高く臨床的にも重要である。例えば、先天性心疾患は新生児の約 1%に発症するが(年間約 1 万人発症)、治療の進歩により成人期まで生存する患者が増え現在少なくとも国内に 20 万人存在し、今後 1 万人/年近く増加するといわれている(Niwa K et al. Int J Cardiol. 2004;96:211-6)。これらの約 5-10%は肺高血圧を伴っており(Diller GP, Gatzoulis MA. Circulation. 2007;115:1039-50)、肺高血圧症の治療が必要な患者数は今後増大するものと考えられる。

近年、肺高血圧発症機序として multiple-hit theory が提唱されており、肺血管収縮因子、肺血管リモデリング、血小板凝集など様々な要因が挙げられているが、血管内皮由来の一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリン(PGI₂)などの血管拡張因子の慢性的な産生障害、血管収縮因子であるエンドセリン-1(ET-1)の発現増加が、肺血管の収縮のみならずリモデリングにも関与する重要な経路とされている。これまでこの3つの主要な分子経路をターゲットとして治療薬が開発実用化されており、1980年代では68%であった一年生存率が近年では85%(Thenappan T et al. Eur Respir J. 2007;30:1103-10)にまで改善傾向にある。しかしながら、これらの内科的治療が無効な場合は肺移植以外に治療手段がなく、本疾患の確立した治療法がないのが現状であり、更なる治療法の開発が望まれている。

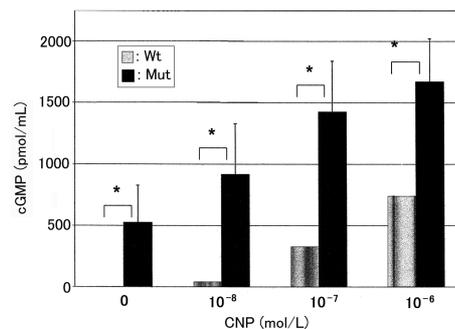
NO が関与するシグナル伝達経路について

は、NO - cGMP - cGMP-dependent kinase(cGK)が活性化することにより、血管拡張効果や細胞増殖抑制を期待するものである。NOの直接吸入では、フリーラジカルを増加させる可能性が指摘され、PDE5の阻害や可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)を活性化させる方が安全と考えられており、これらが治療薬開発のターゲットとなっている。

今回我々は、特異な骨系統疾患家系の解析から、リガンド刺激がなくとも恒常的に cGMP を産生するナトリウム利尿ペプチド B 受容体変異(変異型 NPR-B)を発見した(【図 1】)。恒常的に cGMP を産生する系の発見は世界初である。肺血管において、この遺伝子変異を導入する、あるいは NPR-B を修飾することにより、恒常的に細胞内 cGMP - cGK のシグナルを活性化させることが可能になれば、新たな肺高血圧治療薬の開発に応用できる。

【図 1】変異型 NPR-B の cGMP 活性

* : 野生型 NPR-B 発現細胞の cGMP 生産量に対して、 $P < 0.05$)



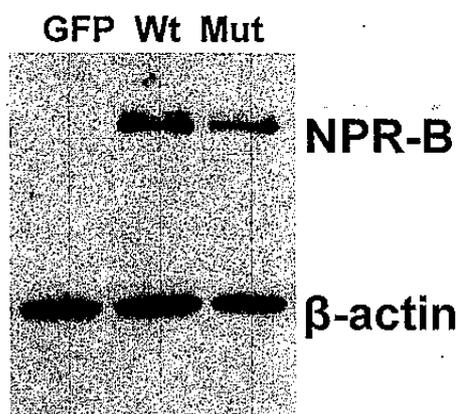
2. 研究の目的

肺高血圧の発症・伸展に関与する重要な分子機構のひとつに、肺血管壁の一酸化窒素(NO) cGMP 系がある。現在 cGMP 系をターゲットとした肺高血圧治療薬は NO 吸入と PDE 阻害剤が実用化されているのみである。最近我々は細胞内 cGMP を恒常的に産生する系(ナトリウム利尿ペプチド B 型受容体変異)を世界で初めて発見した。この系を用いた肺高血圧の新規治療薬の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アデノウイルスベクターを用いて変異型 NPR-B、野生型 NPR-B の発現ベクターを作成(【図 2】)。細胞培養系を用い、ヒトおよびラット肺動脈平滑筋細胞に変異型 NPR-B、野生型 NPR-B を遺伝子導入し、cGMP および cAMP の発現動態(代表的なリガンドである CNP 添加無、CNP 添加有)を解析する。遺伝子導入した培養細胞を通常酸素下および低酸素下で培養し、cGMP の発現変化、増殖に対する影響、細胞死への影響を解析する。

【図 2】野生型 NPR-B 及び変異型 NPR-B の発現



(2) 200 g の Sprague-Dawley オスラットを用い、VEGF 受容体拮抗薬である SU5416 を皮下注射して、低酸素環境下で飼育し、また通常酸素濃度に戻して SugenPAH モデルラットを作成する。

(3) モデルラットの心臓超音波検査、右心カテーテル検査、右室/左室心筋重量比、肺病理組織の染色により、肺高血圧所見を認めていることを確認する。

(4) In vivo でアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行う。ラットに対して気管内噴霧による in vivo 遺伝子導入を行い、遺伝子導入効率の確認を、肺病理組織切片を用いて、導入遺伝子に特異的な抗体による免疫組織染色法で行う。

(5) ラットを、偽手術群、野生型 NPR-B 導入群、変異型 NPR-B 導入群に分け遺伝子導入を

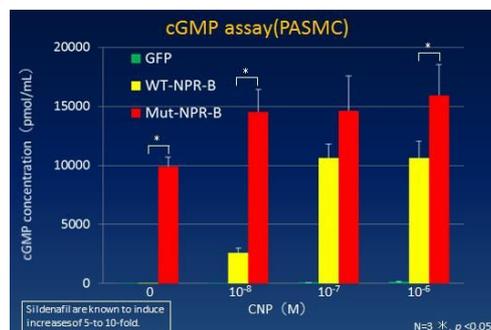
行った後、さらに低酸素チャンバーで1週間飼育する。

(6) 肺高血圧の所見を右室/左室心筋重量比、心臓超音波検査、右心カテーテル検査、肺病理組織の H-E 染色、免疫組織染色を用いて評価する

4. 研究成果

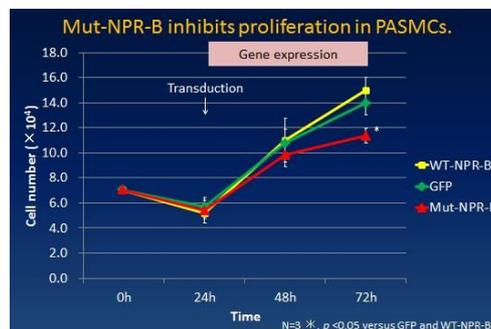
(1) NPR-B 変異体による細胞内 cGMP への影響。恒常活性型 NPR-B 変異体を導入した肺動脈平滑筋細胞では、細胞内 cGMP は GFP コントロールや NPR-B 野生体を導入した群と比較して著増し (GFP, 0.097 ± 0.050 pmol/L; WT, 0.084 ± 0.039 pmol/L; Mut, 18.09 ± 1.39 pmol/L) リガンドである CNP の添加によりさらに増加を認めた(【図 3】)。

【図 3】



(2) NPR-B 変異体による細胞増殖への影響。恒常活性型 NPR-B 変異体を導入した肺動脈平滑筋細胞では、遺伝子導入 48 時間後の細胞数は対照群に比して変異体発現細胞で有意に減少しており、増殖能の低下を認めた(【図 4】)。

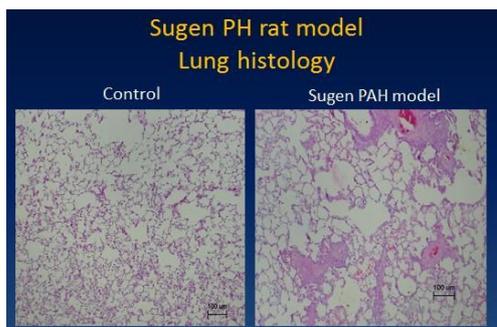
【図 4】



(3) Sugen PAH モデルラットの作成

SU5416 を皮下注射して、低酸素環境下で飼育し、また通常酸素濃度に戻して作成した SugenPAH モデルラットは肺高血圧症を発症し、右室肥大を認め、組織においては肺動脈の中膜肥厚と内膜病変を認めた(【図 5】)。

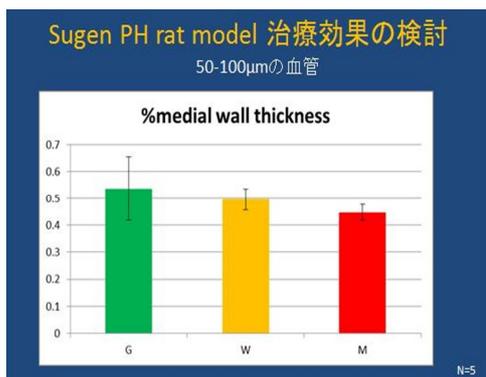
【図 5】



(4) NPR-B 変異体の PAH model rat への治療効果

SugenPAH モデルラットに対して、Mut-NPR-B を遺伝子導入したところ、右室圧および肺動脈中膜肥厚(GFP, $52 \pm 13\%$; WT, $50 \pm 4\%$; Mut, $44 \pm 2\%$, n=4) が改善される可能性が示された(【図 6】)。

【図 6】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

Nawa N, Ishida H, Baden H, Takahashi K, Kogaki S, Yabushita-Okada Y, Ichimori H, Ishii R, Mihara S, Higano R, Miura K, Ozono K.

Therapeutic Application of Type B Natriuretic Peptide Receptor With a Novel Gain-of-function Mutation in the

Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension.

American Heart Association, Scientific Sessions 2013:2013.11.16-20, 米国 Dallas

那波伸敏, 石田秀和, 馬殿洋樹, 高橋邦彦, 小垣滋豊, 市森裕章, 石井 良, 髭野亮太, 藪下陽子, 三浦弘司, 大園恵一

C-type natriuretic peptide(CNP)受容体(NPR-B)の機能獲得型変異体を用いた、肺高血圧症に対する新たな治療アプローチ(第3報).

第49回日本小児循環器学会総会:

2013.07.11-13, 東京

那波伸敏, 石田秀和, 馬殿洋樹, 高橋邦彦, 小垣滋豊, 市森裕章, 内川俊毅, 石井 良, 髭野亮太, 岡田陽子, 三浦弘司, 大園恵一.

C-type natriuretic peptide (CNP) 受容体(NPR-B)の機能獲得型変異体を用いた、肺動脈性高血圧症(PAH)に対する新たな治療アプローチ.

第19回日本小児肺循環研究会:2013.02.02, 東京

那波伸敏, 石田秀和, 高橋邦彦, 小垣滋豊, 市森裕章, 内川俊毅, 藪下陽子, 三原聖子, 馬殿洋樹, 三浦弘司, 大園恵一.

C-type natriuretic peptide(CNP) 受容体(NPR-B)の機能獲得型変異体を用いた、肺動脈性肺高血圧症に対する新たな治療アプローチ(第2報).

第48回日本小児循環器学会学術集会:

2012.07.05-07, 京都

那波伸敏, 石田秀和, 高橋邦彦, 小垣滋豊, 市森裕章, 内川俊毅, 成田 淳, 岡田陽子, 三浦弘司, 大園恵一.

C-type natriuretic peptide (CNP) 受容体(NPR-B)の機能獲得型変異体を用いた、肺動脈性高血圧症(PAH)に対する新たな治療アプローチ.

第18回日本小児肺循環研究会:2012.2.4, 東京

Nawa N, Ishida H, Kogaki S, Uchikawa T, Okada Y, Narita J, Maekawa S, Ichimori H, Miura K, Ozono K.

Type B Human Natriuretic Peptide Receptor with a novel gain-of-function mutation provides therapeutic potential in the treatment of pulmonary arterial hypertension.

American Heart Association Scientific Sessions 2011, 2011年11月14日, 米国 オーランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小垣 滋豊 (KOGAKI, Shigetoyo)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)
・ 講師
研究者番号: 00311754

(2) 研究分担者

高橋 邦彦 (TAKAHASHI, Kunihiko)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)
・ 特任助教(常勤)
研究者番号: 10610230

市森 裕章 (ICHIMORI, Hiroaki)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 60467553

那波 伸敏 (NAWA, Nobutoshi)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 30617543

石田 秀和 (ISHIDA, Hidekazu)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 50467552

(備考 平成 24 年 4 月 9 日留学のため削除)