

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：85306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860632

研究課題名(和文)肺高血圧症の発症進展に寄与するthrombinシグナルの分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating molecular mechanism of thrombin signaling involved in pathogenesis and progression of pulmonary hypertension

研究代表者

小川 愛子(Ogawa, Aiko)

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター(臨床研究部・その他部局等・その他)

研究者番号：40572748

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究課題では、肺高血圧症の発症・進展におけるthrombinシグナル伝達の役割を明らかにすることを目的として、肺高血圧症症例から得られた肺組織と肺動脈平滑筋細胞を用いて検討を行った。その結果、肺高血圧症症例の肺動脈平滑筋細胞ではthrombinの受容体protease activated receptor 1 (PAR1)の発現が亢進していること、肺血管リモデリングの進展にはthrombin /PAR1を介したAkt/mTOR経路やp38MAPキナーゼ伝達経路の活性化が重要な役割を担っていることが明らかとなった。従って、これらのシグナリングが肺高血圧症の新たな治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文):To elucidate the role of thrombin signaling in pathogenesis and progression of pulmonary hypertension, we performed the present study by using lung tissues and isolated pulmonary arterial smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension. Protease activated receptor 1 (PAR1), which acts as a thrombin receptor, was highly expressed in pulmonary arterial smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension. We demonstrated that thrombin/PAR1 signaling and its downstream pathways (Akt/mTOR signaling and p38 signaling) play important roles in progression of pulmonary vascular remodeling. These results indicate that thrombin and its downstream signaling pathways may be novel therapeutic targets in pulmonary hypertension.

研究分野：肺高血圧

キーワード：肺高血圧 平滑筋細胞 トロンピン 細胞内カルシウム シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は、何らかの原因で肺小細動脈の血管内腔が狭小化・閉塞するリモデリングにより肺血管抵抗・肺動脈圧が上昇し、右心不全に至る難治性疾患である。肺血管リモデリングの本態は肺動脈平滑筋細胞(PASMC: pulmonary artery smooth muscle cells)、内皮細胞、線維芽細胞等の異常増殖と考えられているものの、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。肺高血圧症の原因疾患の代表的なものとして特発性肺動脈性肺高血圧症(idiopathic pulmonary arterial hypertension: IPAH)と慢性血栓性肺高血圧症(chronic thromboembolic pulmonary hypertension: CTEPH)がある。現在、IPAH に関しては有効な薬剤が複数開発されている。これに対し、CTEPH において有効な内科的治療薬は確立されておらず、CTEPH の詳細な発症機序の解明と効果的な治療法の開発が急務である。

IPAH については動物モデル等を用いた基礎研究により、platelet-derived growth factor が病態に関与することが明らかとなっている。一方、CTEPH に関する研究では有用な動物モデルも存在せず、ほとんどがヒト肺組織を用いた病理組織学的な検討にとどまっていた。上記のような状況下で申請者は、病態の進展に関与すると考えられる PASMC を CTEPH の血栓内膜摘除術時に得られた器質化血栓から単離・培養することに世界で初めて成功した(Ogawa A, et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009)。さらに、申請者は上記の PASMC を用いて、platelet-derived growth factor が CTEPH の病態進展に関与することを明らかにしてきている(Ogawa A, et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2012)。

CTEPH では、急性肺塞栓症における肺動脈内の血栓が溶解されず残存することが発症に関与することが提唱されている。血栓形成には複数の因子が関与することが知られており、それらの中でも凝固因子 thrombin は特に重要な役割を担うと考えられることから、thrombin が CTEPH の進展に関与することが予想された。

2. 研究の目的

本研究課題では、thrombin 受容体である protease activated receptor 1 (PAR1)の肺高血圧症における発現パターンの検討、thrombin による肺血管リモデリング進展機構の解明、thrombin/PAR1 を標的とした肺高血圧症治療の可能性に関する検討により、肺高血圧症の発症における thrombin シグナルの果たす役割を詳細に明らかにし、thrombin シグナル伝達系を標的とした新たな肺高血圧症治療の確立を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

肺高血圧症症例の肺組織・細胞における PAR1 の発現の解析

CTEPH 症例の血栓内膜摘除術により摘出さ

れた組織と、IPAH 症例の移植あるいは剖検時に得られた肺組織をホルマリン固定・パラフィン包埋処理した後、免疫組織染色法により PAR1 の発現様式を比較検討した。なお、コントロールとしては肺癌等の症例の摘出肺を用いた。さらに、CTEPH および IPAH の罹患肺の小肺動脈から PASMC を単離・培養した。なお、コントロールとしては市販の正常ヒト PASMC を用いた。これらの培養細胞を用いて、免疫細胞染色法や定量 RT-PCR 法により PAR1 の発現様式を比較した。

thrombin による肺血管リモデリング進展機構の解明

肺高血圧症症例から得られた PASMC に thrombin を投与して、以下の検討を行った。各種の特異抗体を用いたウェスタンブロット法により、mTOR をはじめとする細胞内シグナル伝達分子の発現量やリン酸化修飾等に対する thrombin の効果を検討した。また、定量 RT-PCR 法を用いて、細胞内シグナル伝達分子等の mRNA 発現量を解析した。並行して、Fura-2AM を用いて細胞内カルシウム動態の解析を行うとともに、細胞の増殖や生存、遊走能に対する thrombin の作用を検討した。上記の結果を肺組織切片での結果と比較し、培養細胞の肺高血圧モデルとしての有用性を検証した。

thrombin/PAR1 を標的とした肺高血圧症治療の可能性に関する検討

培養細胞による肺高血圧モデルに対して thrombin 受容体拮抗薬や thrombin 阻害薬を用いて、上記で検討した項目について解析し、その治療効果を検討した。

4. 研究成果

肺高血圧症症例の肺組織・細胞における PAR1 の発現の解析

肺高血圧症例とコントロール例の肺組織を用いて、thrombin の受容体である PAR1 の発現様式を免疫組織染色法により比較した。その結果、コントロール肺では PAR1 の発現は肺動脈の内皮細胞に局限しているのに比べ、CTEPH 症例の肺組織では、内皮細胞のみならず PASMC においても PAR1 が発現していることが見出された。また、肺高血圧症症例から単離・培養した PASMC での検討でも、コントロールの細胞に比べて PAR1 の発現が亢進していた。

thrombin による肺血管リモデリング進展機構の解明

platelet-derived growth factor やエンドセリンなどの肺高血圧症を誘発する物質や低酸素刺激を加えることにより、細胞レベルで肺高血圧症疑似状態を作製して行われた研究成果はこれまでも多く報告されている。そこで、CTEPH 症例の肺動脈から得られた PASMC に対して thrombin を投与したところ、細胞増殖が誘導された。即ち、thrombin 投与により、これまでに報告されている

肺高血圧症細胞モデルと類似の反応が誘導されることが明らかとなった。さらに、各種の細胞内シグナル伝達分子を解析したところ、thrombin 刺激により Akt/mTOR 経路や p38MAP キナーゼ経路が活性化を受けることが観察された。

また、Fura-2AM を用いて細胞内カルシウム動態を解析したところ、肺高血圧症症例から単離培養した PASMIC において、thrombin 刺激によりストア作動性カルシウム流入による細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。さらに、thrombin 刺激により、ストア作動性カルシウム流入の調節分子である STIM1 と Orai1 の mRNA の発現が誘導されることから、thrombin がこれらの分子の発現調節を介して細胞内カルシウム濃度を調節していることが示唆された。

thrombin/PAR1 を標的とした肺高血圧症治療の可能性に関する検討

肺高血圧症例の PASMIC に対して thrombin 受容体拮抗薬や thrombin 阻害薬を投与したところ、細胞内カルシウム濃度の上昇が抑制され、同時に細胞増殖も低下した。そこで、thrombin の受容体である PAR1 に対するアゴニストを投与したところ、thrombin 刺激時と同様の効果が認められた。従って、thrombin は PAR1 を介して PASMIC の肺高血圧症疑似状態を進展させることが示唆された。

さらに、thrombin の存在下で Akt/mTOR 阻害薬を投与したところ、アポトーシスが誘導されるとともに、細胞増殖も抑制された。一方、p38 阻害剤処理により、thrombin 刺激に伴う STIM1 と Orai1 の発現の増加が抑制されるとともに、ストア作動性カルシウム流入と細胞増殖が抑制された。また、thrombin 刺激の阻害により、アポトーシスの指標となる caspase-3 の活性化が観察された。

以上の結果から、肺高血圧症の進展には thrombin /PAR1 を介した Akt/mTOR 経路や p38MAP キナーゼ経路の活性化が重要な役割を担っており、上記のシグナリングが肺高血圧症の新たな治療標的となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 18 件)

- (1) Ogawa A, Matsubara H. Balloon pulmonary angioplasty: a treatment option for inoperable patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Front Cardiovasc Med**, 2(4):1-7(2015). 【査読有】【総説】
- (2) Kitani M, Ogawa A, Sarashina T, Yamadori I, Matsubara H. Histological changes of pulmonary arteries treated by balloon pulmonary angioplasty in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Circ Cardiovasc Interv**, 7:857-9(2014). 【査読有】
- (3) Ogawa A, Matsubara H. Letter by Ogawa

and Matsubara regarding article, "Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERA)". **Circulation**, 130:e109(2014). 【査読有】

- (4) Matsubara H, Ogawa A. Treatment of idiopathic/hereditary pulmonary arterial hypertension. **J Cardiol**, 64:243-9(2014). 【査読有】【総説】
- (5) Ogawa A, Kitani M, Mizoguchi H, Munemasa M, Matsuo K, Yamadori I, Andou A, Matsubara H. Pulmonary microvascular remodeling after balloon pulmonary angioplasty in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Intern Med**, 53:729-33(2014). 【査読有】
- (6) Adachi S, Hirashiki A, Kondo T, Nakaguro M, Ogawa A, Miyaji K, Matsubara H, Yokoi T, Murohara T. Imatinib is partially effective for the treatment of pulmonary capillary hemangiomatosis. **Intern Med**, 53:603-7(2014). 【査読有】
- (7) Ogawa A, Ejiri K, Matsubara H. Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan. **Life Sci**, 118:414-9(2014). 【査読有】
- (8) Ogawa A, Firth AL, Ariyasu S, Yamadori I, Matsubara H, Song S, Fraidenburg DR, Yuan JX. Thrombin-mediated activation of Akt signaling contributes to pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. **Physiol Rep**, 1:e00190(2013). 【査読有】
- (9) Ogawa A, Yamadori I, Matsubara O, Matsubara H. Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy with circulatory failure treated with imatinib. **Intern Med**, 52:1927-30(2013). 【査読有】
- (10) Ogawa A. Importance of differential diagnosis of pulmonary hypertension. **JC Cases**, e186-e187(2013). 【査読無】
- (11) Miura A, Akagi S, Nakamura K, Ohta-Ogo K, Hashimoto K, Nagase S, Kohno K, Kusano K, Ogawa A, Matsubara H, Toyooka S, Oto T, Ohtsuka A, Ohe T, Ito H. Different sizes of centrilobular ground-glass opacities in chest high-resolution computed tomography of patients with pulmonary veno-occlusive disease and patients with pulmonary capillary hemangiomatosis. **Cardiovasc Pathol**, 22:287-93(2013). 【査読有】
- (12) 小川 愛子、血栓形成に関わる因子の肺高血圧症進展に果たす役割の解明、日本応用酵素協会誌、2014、49 号、pp.92-93 【査読無】

- (13) 小川 愛子, 慢性血栓性肺高血圧症: 治療と研究の進歩, 日本心臓血管作動物質学会機関誌「血管」, 2014, 37 巻, 3 号, pp.99-106 【査読無】【総説】
- (14) 小川 愛子, PVOD: 診断と治療, 日本胸部臨床, 2014, 73 巻, 3 号, pp.256-263 【査読無】
- (15) 小川 愛子, 慢性血栓性肺高血圧症の肺血管リモデリングにおける thrombin の重要性, 日本応用酵素協会誌, 2013, 48 号, pp.98-99 【査読無】【総説】
- (16) 小川 愛子, 症例から学ぶ肺高血圧症, CardioVascular Contemporary, 2013, 2 巻, 3 号, pp.54-62 【査読無】
- (17) 小川 愛子, 慢性血栓性肺高血圧症のカテーテル治療 ~ 外科手術不適例も根治可能となったか ~, 月刊循環器「CIRCULATION」, 2013, 3 巻, 10 号, pp.96-105 【査読無】
- (18) 小川 愛子, Pulmonary veno-occlusive disease/pulmonary capillary hemangiomatosis の治療, Therapeutic Research, 2013, 34 巻, 9 号, pp.1191-1192 【査読無】

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 小川 愛子, 松原 広己, トロンピンシグナル阻害による慢性血栓性肺高血圧症の新たな治療法の可能性, 第 44 回日本心臓血管作動物質学会 (香川, Feb 6 2015)
- (2) 小川 愛子, 2. PVOD の臨床診断 Clinical diagnosis of pulmonary veno-occlusive disease. 第 2 回日本肺高血圧学会 (JPHS) 第 3 回日本肺循環学会 (JPCS) 合同学術集会 (東京, Oct 4 2014) 【招待】
- (3) Ogawa A, Ariyasu S, Shinno Y, Yamadori I, Matsubara H, Yuan JX, Role of Thrombin in Vascular Remodeling in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. International CTEPH Conference 2014 (フランス パリ, Jun 2 2014)
- (4) 小川 愛子, 宮地 克維, 宗政 充, 松原 広己, 特発性肺動脈性肺高血圧症における肺微小循環不全の改善, 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 (大阪, Apr 25 2014)
- (5) Ogawa A, Tsukuda S, Sato S, Miyaji K, Munemasa M, Matsubara H, Increased platelet-derived microparticle levels in patients with pulmonary hypertension. The 18th International Vascular Biology Meeting (Kyoto, Apr 15 2014)
- (6) 小川 愛子, 宮地 克維, 宗政 充, 松原 広己, 肺静脈閉塞症/肺毛細血管腫症の臨床的特徴, 第 67 回国立病院総合医学会 (石川, Nov 9 2013)
- (7) 小川 愛子, 佐藤 徹, 田村 雄一, 松原 広己, 特発性/遺伝性肺動脈性肺高血圧症の長期予後と関連する因子の検討, 第 61 回日本心臓病学会学術集会 (熊本,

Sep 21 2013)

- (8) Ogawa A, Miyaji K, Matsubara H, Long-term survival in Japanese patients with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension, The Thirteenth International Conference on Endothelin (東京, Sep 10 2013)
- (9) Ogawa A, Miyaji K, Matsubara H, Clinical prediction rule for identifying patients with pulmonary veno-occlusive disease/pulmonary capillary hemangiomatosis, ESC Congress 2013 (オランダ アムステルダム, Aug 31 2013)
- (10) Ogawa A, Shimokawahara H, Matsubara H, Balloon Pulmonary Angioplasty for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (大阪, Jul 5 2013)【招待】
- (11) Ogawa A, Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (大阪, Jul 4 2013)【招待】
- (12) Ogawa A, Matsubara H, Yuan JX, 慢性血栓性肺高血圧症における肺血管リモデリング進展の分子機構 Molecular Mechanisms for Development of Pulmonary Vascular Remodeling in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension, 第 2 回日本肺循環学会学術集会 (東京, Jun 22 2013)【招待】
- (13) 小川 愛子, 宗政 充, 宮地 克維, 松原 広己, PVOD/PCH 臨床診断スコア, 第 53 回日本呼吸器学会 (東京, Apr 20 2013)

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 小川 愛子, 93 . 肺高血圧症における AGES/RAGE 系の役割について教えてください, 老化物質 AGES ワールドに迫る! アンチエイジングのための 100 の質問, メディカルレビュー社, 2013, pp.204-205

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 愛子 (Aiko Ogawa)

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター・臨床研究部・医師

研究者番号: 40572748