

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：22701  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2017  
課題番号：26462342  
研究課題名(和文) VPAC2 アゴニスト発現ベクター構築と肺高血圧治療

研究課題名(英文) Treatment for PH with VPAC2 agonist vector

## 研究代表者

水野 祐介 (MIZUNO, Yusuke)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：80433192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：VIPは血管拡張作用と心収縮力亢進作用を持ち、肺高血圧症(PH)治療薬の一つとされてきた。我々は、VIPの受容体VPAC1,VPAC2に対する各アゴニスト、および関連ペプチドPACAPの肺高血圧ラットの循環への影響を検討した。VPAC2アゴニストはMCT肺高血圧ラットの右室圧および全肺血管抵抗を低下させ、心拍出量を増加させたが、VPAC1アゴニスト,PACAPは改善させなかった。次に、間葉系幹細胞をベクターとし、肺局所でVPAC2アゴニストを発現をさせる方法の検討を開始した。静脈内投与した間葉系幹細胞は肺高血圧ラットの循環動態に影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) have pulmonary vasodilatory via receptors VPAC1 and VPAC2, which possess a similar affinity for both peptides, and PAC1, a PACAP preferring receptor. We investigated the effects of VPAC1 and VPAC2 selective agonists VIP and PACAP to explore treatment for PH. We examined hemodynamic changes in right ventricular systolic pressure (RVSP), systemic blood pressure (SBP), total pulmonary resistance index (TPRI), total systemic resistance index, and cardiac index (CI) in response to their agonists with monocrotaline (MCT)-induced PH. Activation of VPAC2 receptor with BAY 55&#8211;9837 effectively improved RVSP, TPRI, and CI in MCTinduced PH.

研究分野：麻酔科学

キーワード：肺高血圧 VPAC2 VIP 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は肺血管の拡張能低下や器質的变化を基盤とする進行性の疾患であり、根本的な治療は難しく、重症化すると治療は困難であった。近年、病態解明や治療薬の改善が進み、大きく3つの薬剤、エンドセリン受容体遮断薬、ホスホジエステラーゼ5型阻害薬、プロスタサノイド IP 受容体活性薬を基本とする治療成績は向上してきた。しかし、これら治療法改善により長期生存率は向上しているものの、重症例の治療や、手術等の侵襲的処置の周術期における、高い合併症発生率は依然として問題であった。神経伝達物質 Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) は血管拡張作用と心収縮力亢進作用を持ち、肺高血圧症 (PH) 治療薬の一つとされてきたが、肺循環における詳細な機能は不明で、多様な生理活性等が治療薬として問題だった。

我々は、肺高血圧症ラットモデルにおける肺組織中の VIP と関連ペプチド pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) の共通受容体 VPAC1, VPAC2, PAC1 の発現が亢進していることを示してきた。更に予備実験において、選択的 VPAC2 アゴニストの静脈内注入が  $PGI_2$  に匹敵して右室圧低下を示すことを見出した。そこで、まず VPAC2 選択的アゴニストが、肺高血圧ラットにおいて循環動態を改善し心拍出量を増加せしめると仮説を立て、これを検証することで、VPAC2 アゴニストの新たな PH 治療薬となる可能性を検討することとした。

## 2. 研究の目的

まず、VPAC2 アゴニストによる肺高血圧症の血行動態への改善効果を検討した。モノクロタリン誘発ラット肺高血圧モデルを用い、VPAC2 アゴニストの静脈内投与による血行動態への影響を検証した。比較のため、VIP, VPAC2 アゴニスト、PACAP も検討した。次に、VPAC2 アゴニストの長期投与による PH 予防効果の検討に着手した。VPAC2 アゴ

ニストを持続的に発現させるため、間葉系幹細胞に VPAC2 発現プラスミドを導入し、これを培養、静脈内投与し肺動脈にトラップさせることで、持続的な VPAC2 アゴニストの治療法の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

・VPAC2 アゴニスト BAY 55-9837 のモノクロタリン誘発肺高血圧ラットモデルにおける、血行動態への影響の検討。

8週齢雄SDラットにモノクロタリン 60mg/kg を皮下注することで、肺高血圧モデルを作成した。肺血圧が完成する投与4週間後に、血行動態を測定した。全身麻酔下に気管切開を行い陽圧換気で呼吸を維持した。頸静脈からカテーテルを右心まで挿入し、また大腿動脈にカテーテルを留置し、右心圧、体動脈圧を各々連続的にモニターした。心拍出量は熱希釈法にて測定した。全肺血管抵抗、全体血管抵抗を計出

VIP, VPAC2 アゴニスト BAY 55-9837、VPAC1 アゴニスト [Ala(11,22,28)]VIP, PACAP を肺高血圧および正常ラットに静脈内投与し、上記の血行動態への影響を測定した。

・持続的に肺局所で VPAC2 アゴニストを発現させる間葉系幹細胞の構築。

VPAC2 による全身的影響を抑えるため、持続的に肺組織で局所的に作用させるため、間葉系幹細胞に VPAC2 アゴニストを発現させ、静脈内投与し肺組織にトラップさせる方法を検討した。VPAC2 発現用レンチウイルスベクター、プラスミド等を用いて間葉系幹細胞へ導入した。

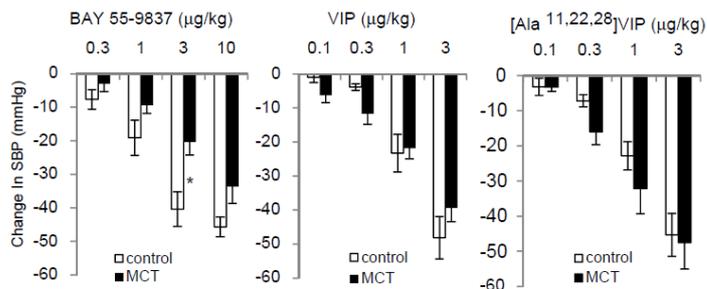
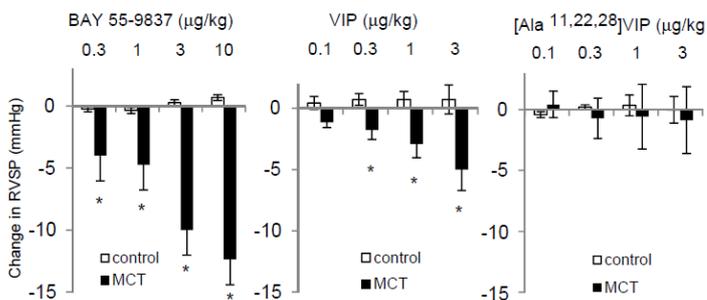
また、先にナイーブ間葉系幹細胞を静脈内投与する影響を肺高血圧ラットにおいて検討した。

## 4. 研究成果

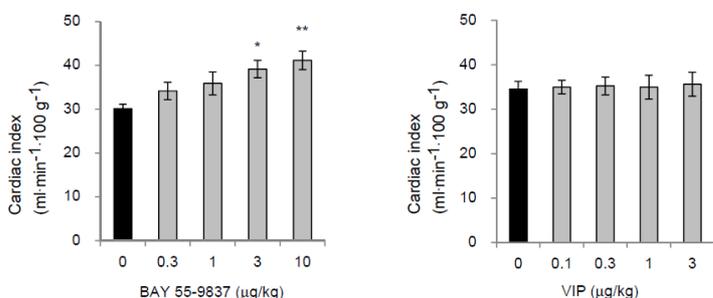
モノクロタリン MCT 投与肺高血圧ラットでは投与4週間後に右心圧、右心/左心重量比が正常ラットと比較し有意に上昇しており、肺

高血圧モデルが作成されていることを確認した。右室収縮期圧； control, MCT ( $26 \pm 2$  vs  $74 \pm 5$  mmHg,  $p < 0.0001$ ), 体血圧； control, MCT ( $106 \pm 5$  vs  $113 \pm 5$ )。心拍出量； control, MCT ( $41.4 \pm 2.4$  vs  $32.5 \pm 0.9$  ml/min/100g,  $p < 0.001$ )。

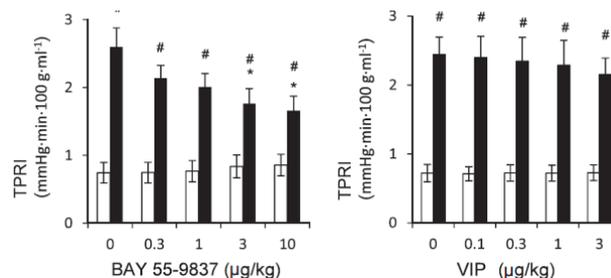
BAY 55-9837 は MCT ラットにおいて、容量依存性に右心収縮期圧 (RVSP) を低下させた。VIP も RVSP を低下させたが、同様な血圧低下作用における比較では BAY 55-9837 より作用は弱く、[Ala(11,22,28)]VIP、PACAP は RVSP を低下させなかった。



また、BAY 55-9837 は MCT ラットの心拍出量 Cardiac Index を改善したが、VIP は改善させなかった。



また、BAY 55-9837 は全肺血管抵抗 total pulmonary resistance index (TPRI) を低下させたが、VIP は変化させなかった。



これらの結果から、VPAC2 アゴニスト BAY 55-9837 は MCT 肺高血圧ラットにおいて、右室圧および全肺血管抵抗を低下させ、心拍出量を増加させることが示された。BAY 55-9837 は VIP より優れて MCT ラットの血行動態を改善することが示された。これらの結果は J Appl Physiol (1985). 2014 15;117(4):383-91 に発表した。

次に、BAY55-9837 を持続的、肺局所的に一定期間投与することで、VPAC2 アゴニストの肺高血圧予防、治療が可能か検討を開始した。BAY55-9837 はペプチドで不安定であるため、頻回の投与が必要と考えられた。そこで、間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) を用いた VPAC2 アゴニストの長期持続発現の検討へ進んだ。

まず、ナイーブ間葉系幹細胞の静脈内投与による影響を検討するため、D-MEM/F12 + 10% FBS 培地で培養した  $10^7$  個の間葉系幹細胞を 1ml の PBS に懸濁させ、ラット尾静脈より投与した。正常ラットには血行動態等特に影響のないことを確認した。次に MCT ラット群に MCT の皮下注入と同時に間葉系幹細胞  $10^7$  個を尾静脈内注射した。投与 4 週間後に上記と同様の方法で血行動態を測定した。

体血圧、右室収縮期圧はそれぞれ  $126.7 \pm 6.6$ ,  $69.6 \pm 2.3$  mmHg と MCT のみの群と変

化な、かった。これらの結果から、ナイーブ MSC 単独では MCT による肺高血圧への予防、治療効果は認められないと考えられた。

我々は VPAC2 発現間葉系幹細胞の構築を開始したが、同時期に安定で長時間作用型の VPAC2 アゴニスト、Vasomera が米国で開発され、心不全に対する治験が開始された (PhaseBio Pharmaceuticals, Inc.)。その後、対象が肺高血圧症へも拡大される clinical trial Phase 1 (NCT03315507) が開始された。我々は、間葉系幹細胞をベクターとした VPAC2 アゴニストを発現させる方法を検討していたが、上記の簡便で幹細胞やウイルスベクターを使用しない長時間作用型 VPAC2 アゴニストの開発により、計画の修正を検討した。既に我々は上記の様に、間葉系幹細胞の MCT ラットに対する静脈内投与の条件は検討しているが、間葉系幹細胞はエクソソーム内の microRNA 等を介し、肺疾患を含む様々な疾患の改善効果が報告されている。そこで、本研究はここで終了するが、将来的に間葉系幹細胞ベクターに肺高血圧に関連する microRNA を発現させることで制御する方法も検討可能と思われた。

#### 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1件)

J Appl Physiol (1985). 2014  
15;117(4):383-91. Role of VPAC2 receptor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.  
Koga M, Mizuno Y, Watanabe I, Kawakami H, Goto T. (査読有)

[学会発表](計3件)

Roles of Protein Kinase D in

Vasoconstriction and Hemodynamics. Y. Sugawara, Y. Mizuno, H. Kawakami, T. Goto  
Experimental Biology, San Diego, USA.  
2016. 4. 3

肺高血圧ラットモデルでのバソプレシンの治療薬としての有効性の検討。菅原陽、中澤亮介、水野祐介、後藤隆久 日本麻酔科学会優秀演題 2017. 6. 8 神戸

Roles and Mechanism of Protein Kinase D in Vasoconstriction. Y. Mizuno, Y. Sugawara, T. Goto. Experimental Biology, San Diego, USA. 2018. 4. 23

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

水野 祐介 (MIZUNO Yusuke)  
横浜市立大学・附属病院・准教授  
研究者番号: 80433192

##### (2)研究分担者

渡辺 至 (WATANABE Itaru)  
横浜市立大学・医学研究科・客員教授  
研究者番号: 20534142

新堀 博展 (SHINBORI Hironobu)  
横浜市立大学・医学研究科・客員准教授  
研究者番号: 60404993

川上 裕理 (KAWAKAMI Hiromasa)

横浜市立大学・市民総合医療センター・講師

研究者番号：90407958

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし