

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461197

研究課題名(和文)血管内皮間葉転換を標的とした新規の肺高血圧症治療薬の開発

研究課題名(英文) Novel treatment for pulmonary arterial hypertension targeting endothelial mesenchymal transition.

研究代表者

長岡 鉄太郎 (Nagaoka, Tetsutaro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70407295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PDGF、FGF、VEGFを抑制するTKIであるNintedanibの肺高血圧症(PH)治療薬としての有用性を検証した。ヒト肺動脈の血管内皮細胞と平滑筋細胞を用いて、内皮間葉転換(EndMT)と平滑筋細胞増殖に対するNintedanibの抑制効果と、PAHラットへの慢性投与の効果を確認した。Nintedanibは、平滑筋細胞の増殖とリン酸化ERK/AKTの発現を減少させ、内皮細胞のEndMT誘導を抑制した。PAHラットへの慢性投与により、肺血行動態と肺動脈中膜と内膜の増殖が改善した。以上より、NintedanibはEndMTと平滑筋増殖の抑制を介して新規PAH治療薬になり得ると考えた。

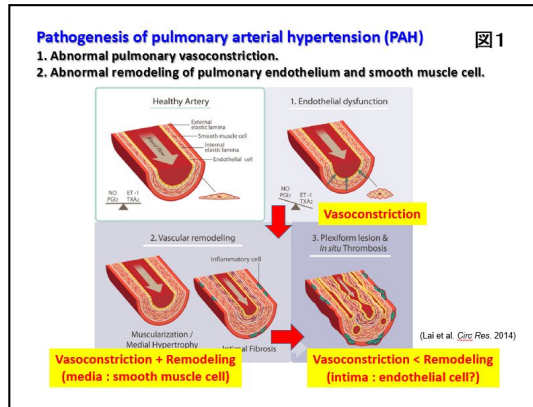
研究成果の概要(英文)：We aimed to evaluate the usefulness of nintedanib, the triple TKI against PDGF, FGF and VEGF, as a novel treatment for pulmonary arterial hypertension (PAH) in vitro and in vivo. We, first, assessed the inhibitory effect of nintedanib on both human pulmonary arterial smooth muscle cell (HPASMC) proliferation induced by PDGF-BB and endothelial mesenchymal transition (EndMT) in human pulmonary microvascular endothelial cell (HPMVEC). Next, we tested the therapeutic effect of chronic treatment with nintedanib in PAH model rat. Nintedanib reduced the HPASMC proliferation and expression of pERK/pAKT, and also inhibited the augmented mesenchymal marker expression in EndMT induced HPMVEC. Chronic treatment with nintedanib ameliorated the pulmonary hemodynamics and medial and intimal proliferated lesion of pulmonary arteries were decreased in PAH model rat. As a conclusion, nintedanib may be a novel treatment of PAH via inhibition of smooth muscle cell proliferation and EndMT.

研究分野：肺高血圧・肺循環障害

キーワード：肺高血圧症 血管内皮間葉転換 血管平滑筋 PDGF FGF VEGF

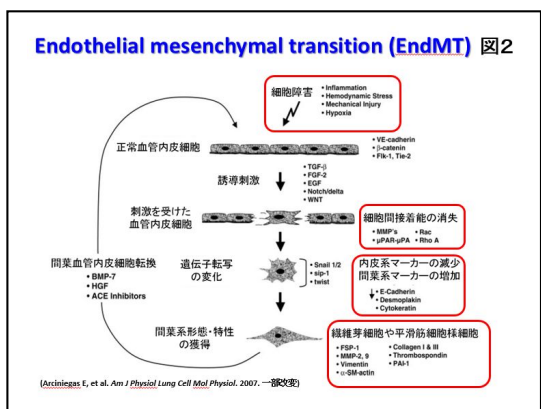
1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension: PAH) は、各種治療の開発によって著しく予後が改善しているが、重症例では未だ移植を必要とする重篤な疾患である。病態の進行には、異常な血管収縮と血管中膜・内膜のリモデリングが関与しており、特に進行期においては血管内腔を閉塞する増殖性病変が病態に強く関与することが知られている (図 1)。



Plexiform lesion を代表とする増殖性内膜病変は、内皮系と間葉系の両方の特徴を有する細胞によって構成されることが報告されている。しかしながら、現在臨床で使用できる PAH 治療薬は全て血管拡張薬であり、血管リモデリングを標的とした新規治療薬の開発が待たれる。

PAH の血管リモデリングの成因に関しては、TGF と BMP シグナルの不均衡、炎症性のサイトカインやケモカイン、さらには血小板由来増殖因子 (Platelet derived growth factor: PDGF) や線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF) の関与が報告されている。PAH に特徴的な血管内膜病変進展のメカニズムは未だ明らかでない点も多いが、近年になり血管内皮間葉転換 (Endothelial mesenchymal transition : EndMT) の関与が示唆されている。EndMT を誘導する代表的な因子は TGF であるが、PAH においては BMP シグナルの減少に伴って TGF シグナルが増加する。また、PDGF や FGF は主に平滑筋細



胞の増殖に関与することが知られている (図 2)。

Imatinib は慢性骨髄性白血病や消化管間葉腫瘍の治療薬として臨床使用されているが、平滑筋増殖に関与する PDGF を抑制する Tyrosine kinase inhibitor (TKI) であることから、抗リモデリング効果を有する新規 PAH 治療薬として期待された。しかし、PAH に対する第 III 相臨床試験では、運動耐用量や肺血行動態などの臨床指標の十分な改善を認めたと関わらず、主に副作用のために臨床適応が得られなかった。

一方、PDGF、FGF および血管内皮由来増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) を抑制する TKI である Nintedanib は、特発性肺線維症に対する第 III 相試験において、拘束性換気障害の進行と急性増悪の頻度を有意に減少させた。忍容性も良好であり、本邦においても 2015 年から臨床使用が可能となっている。しかし、血管構成細胞の増殖に関わる PDGF や FGF を抑制する薬剤であるにも関わらず、これまでに心血管系疾患に対する有用性を示す報告はない。そこで、我々は Nintedanib が Imatinib と同様に PAH の進展抑制効果を有する、と仮説をたてて実験を行った。

2. 研究の目的

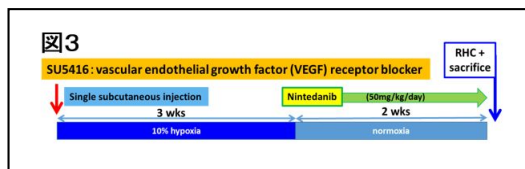
Nintedanib の細胞増殖抑制効果に注目し、抗リモデリング効果を有する新規 PAH 治療薬としての有用性を検証する。

3. 研究の方法

まず我々は、*in vitro* における Nintedanib の細胞増殖抑制効果を検証した。最初に、PDGF-BB 刺激によって増殖したヒト肺動脈平滑筋細胞 (Human pulmonary arterial smooth muscle cell: HPASMC) における Nintedanib の細胞増殖抑制効果を、CCK8 assay を用いて検証した。また、WB 法を用いて、PDGF や FGF の下流シグナルにあたる ERK や AKT のリン酸化に対する Nintedanib の効果を確認した。次に、TGF、TNF および IL-1 を用いてヒト肺微小動脈内皮細胞 (Human pulmonary microvascular endothelial cell: HPMVEC) に EndMT を誘導した。細胞の形態的な変化に加えて、内皮系マーカーとしては、vonWillebrand Factor (vWF) と CD31、間葉系マーカーとしては Fibronectin と Collagen1 を用いて、WB 法で EndMT 誘導を確認すると共に、Nintedanib による EndMT 抑制効果を検証した。

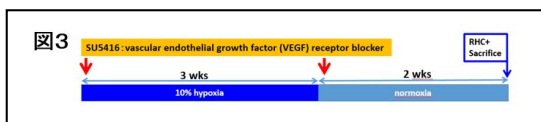
つづいて、*in vivo* における Nintedanib の肺高血圧症に対する効果を検証した。我々は、VEGFR2 阻害薬 (SUGEN5416) と慢性低酸素曝露によって、ヒト PAH に非常に近い血管病理所見を有する PAH モ

デルラット (SuHx PH rat) を作成し実験に使用した。SUGEN5416 の単回投与と 3 週間の低酸素曝露によって肺高血圧が確立した SuHx PH rat に対して、Nintedanib をさらに 2 週間治療的に経口投与した (図 3-1)。



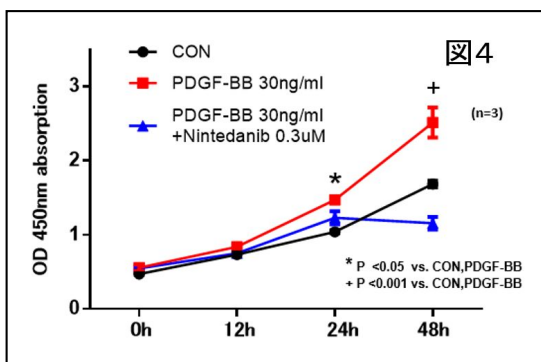
右心カテテルを行って、CON 群、SuHx 群、SuHx + Nintedanib 群のそれぞれの肺血行動態を評価した後に、ラットの心肺を摘出して血管中膜や内膜増殖病変の血管病理像を確認した。さらに、血管のリモデリング部位における PDGF、FGF シグナルの関与を検証するため、免疫染色を用いて増殖性血管病変の FGF/リン酸化 FGF レセプター-1 および PDGF/リン酸化 PDGF レセプター の発現を確認した。

PDGF や FGF が PAH の進展に関与することは広く認知されているが、進行 PAH における VEGF の役割については未だ明らかでない。今回使用した Nintedanib は VEGF シグナルも阻害する TKI であることから、我々は確立した PAH に対する VEGF 阻害の影響を検証するための実験を行った。SUGEN5416 の単回投与と 3 週間の低酸素曝露後に、再度同量の SUGEN5416 を投与し、2 週間室内気で飼育後に肺血行動態を検証した (図 3-2)。

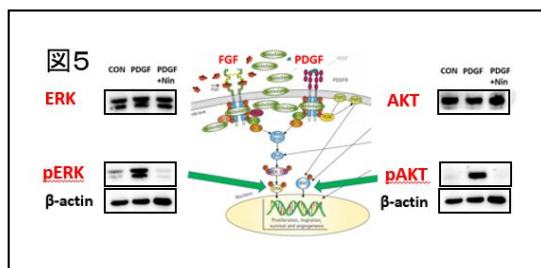


4. 研究成果

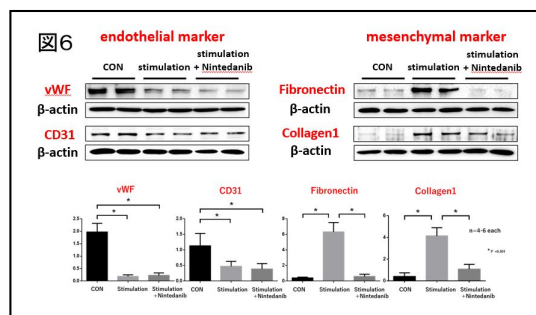
HPASMC において、Nintedanib は PDGF-BB 刺激による細胞増殖作用を有意に抑制した (図 4)。



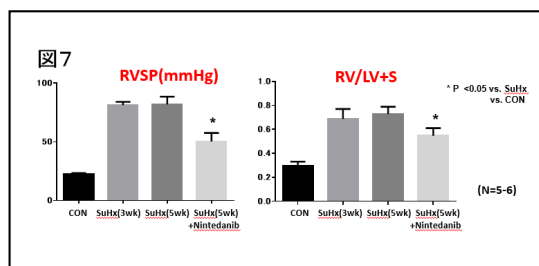
また、増殖した HPASMC では、PDGF と FGF の下流シグナルにあたるリン酸化 ERK および AKT のタンパク発現が増加しており、その増加は Nintedanib によって有意に抑制された (図 5)。



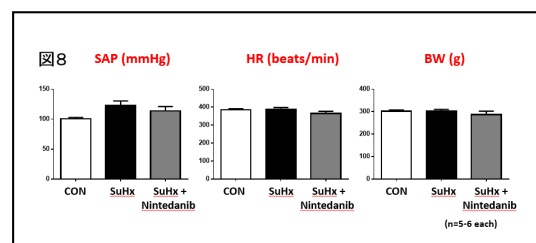
EndMT を誘導された HPMVEC では、細胞形態が敷石状から紡錘形に変化した。WB による評価では、内皮系マーカー (vWF、CD31) のタンパク発現が減少し、間葉系マーカー (Fibronectin、Collagen 1) のタンパク発現が増加していた。Nintedanib の投与によって、EndMT を誘導された HPMVEC における間葉系マーカーの増加が有意に抑制された。しかし、内皮系マーカーの減少は改善しなかった (図 6)。



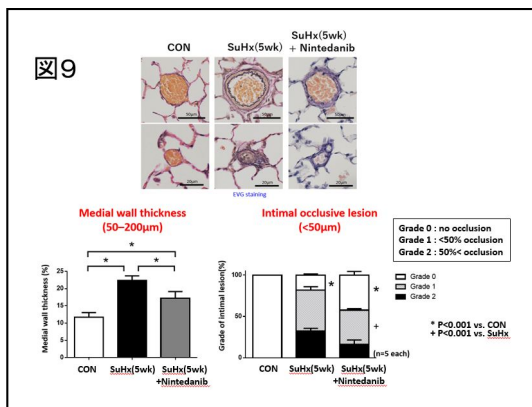
SuHx PH rat の右室収縮期圧 (RVSP) と右室肥大 (RV/LV+S) は CON 群と比較して著しく上昇しており、Nintedanib の慢性投与によって有意に改善した。Nintedanib 投与前の 3 週間の低酸素曝露終了時の RVSP、RV/LV+S と比較しても有意な改善であり、少なくとも本研究のプロトコールにおいては、Nintedanib は確立した肺高血圧に対する治療的な効果を有すると考えられた。 (図 7)。



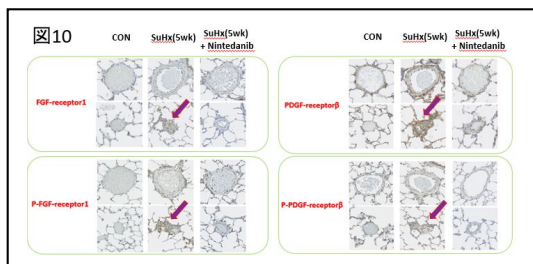
一方で、Nintedanib の慢性投与は、体血圧 (SAP) ・ 脈拍 (HR) ・ 体重 (BW) には明らかな影響を与えなかった (図 8)。



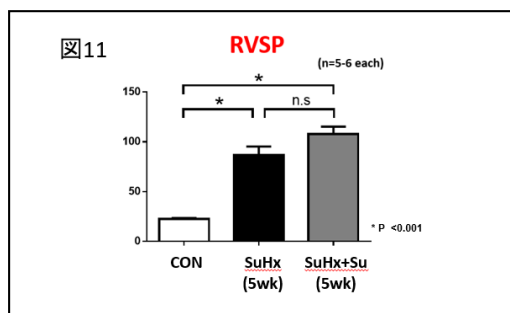
次に、SuHx PH rat の肺動脈中膜の肥厚と内膜増殖性病変の程度を評価した。直径 50 ~ 200 μm の小肺動脈では中膜肥厚を評価し、直径 50 μm 以下の微小肺動脈の閉塞性病変は、内腔閉塞の程度によって、閉塞なし (Grade0)・50%未満の内腔閉塞 (Grade1)・50%以上の内腔閉塞 (Grade2) に分けて、それぞれの Grade の割合を検証した。肺動脈の中膜肥厚と末梢閉塞性病変の程度は、CON 群と比べて SuHx 群で著しく増加しており、SuHx + Nintedanib 投与群においては、血管中膜および内膜のリモデリングは共に明らかに改善した (図 9)。



肥厚した肺動脈中膜および末梢の増殖性血管病変において、リン酸化 FGF レセプター1 およびリン酸化 PDGF レセプター の発現が増加していた。Nintedanib の投与により、それらのリモデリングは改善し、リン酸化した各レセプターの発現も減少した (図 10)。



前述のように、SUGEN5416 の単回投与と 3 週間低酸素曝露後に、再度同量の SUGEN5416 を投与し、肺血行動態を検証した結果、SUGEN5416 の再投与群では、右室収縮期圧は上昇傾向を認めたが、有意な増加ではなかった (図 11)。この結果は、PAH においても VEGF シグナルの阻害が



肺高血圧進展に作用する可能性があることを示唆する一方で、PSGF と FGF の 2 系統の増殖因子の阻害によって、VEGF シグナル阻害の不利益を上回る肺高血圧進展抑制効果を有することも示すと考えている。

上記の結果をまとめると、*in vitro* においては、Nintedanib は PDGF-BB 刺激に伴う HPASMC の増殖を抑制し、TGF β 、TNF α および IL-1 β によって誘導された HPMVEC の EndMT を抑制した。*In vivo* においては、SuHx PH rat に対する Nintedanib の治療的投与によって、肺血行動態と右室肥大が改善し、肺動脈の中膜肥厚および末梢増殖性内膜病変が減少した。血管中膜や内膜の増殖性病変では、リン酸化した FGF・PDGF レセプターの発現が亢進しており、同部位が Nintedanib の治療標的となることが示唆された。Nintedanib の投与によって、それらのレセプターの発現は減少した。Nintedanib は、正常状態では血管保護的な作用を有する VEGF シグナルも阻害するが、PH が確立した SuHx PH rat の VEGF シグナルを再阻害しても、有意な血行動態の悪化は認めなかった。

以上の結果から、Nintedanib は血管平滑筋の増殖抑制と血管内皮細胞の EndMT 抑制効果を介して、抗リモデリング効果を有する新規 PAH 治療薬になりうる、と結論づけた。Nintedanib は既に臨床使用されているおり、忍容性に大きな問題がないことも確認されている。本薬剤が、特発性間質性肺炎に加えて PAH に対する適応拡大を獲得すれば、Imatinib に代わる待望のリモデリングを標的とした初めての治療薬として、PAH 治療に革新的な進歩をもたらす可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者は下線あり)

[雑誌論文](計 0 件・投稿準備中)

[学会発表](計 3 件)

第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 (2017 年 4 月東京フォーラム、東京)

“Nintedanib は肺高血圧治療薬になり得るか? -*in vitro*, *in vivo* における検討”

堤建男、長岡鉄太郎、鈴木宜史、吉田隆司、栗山祥子、高橋史行、守尾嘉晃、高橋和久

2017 American thoracic society, annual international meeting (2017 年 5 月 Washington DC, USA).

“Chronic treatment of nintedanib ameliorates the development of pulmonary hypertension in rat model”

Takeo Tsutsumi, Tetsutaro Nagaoka, Yoshifumi Suzuki, Takashi Yoshida, Sachiko Kuriyama, Yoshiteru Morio,

Kazuhisa Takahashi.

第2回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
(2017年6月さっぽろ芸文館、札幌)

“Nintedanibは肺動脈性肺高血圧症治療薬になり得るか?”

堤建男、長岡鉄太郎、鈴木宜史、吉田隆司、
栗山祥子、高橋史行、守尾嘉晃、高橋和久
Young Investigator Award 優秀賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 鉄太郎 (NAGAOKA, Tetsutaro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70407295

(2) 研究分担者

高橋 史行 (TAKAHASHI, Fumiyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70327823

守尾 嘉晃 (MORIO, Yoshiteru)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30365663