

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09690

研究課題名(和文) ナトリウム利尿ペプチド受容体cGMP恒常産生変異による肺高血圧治療の多角的開発

研究課題名(英文) Multiple development of treatment for pulmonary arterial hypertension by constitutive active natriuretic peptide receptor

研究代表者

小垣 滋豊 (Kogaki, Shigetoyo)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00311754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺高血圧症の病態に最も近いとされるSugen-Hypoxiaラットに対して、既存の薬剤よりも大幅にcGMPを強力に産生する恒常活性型NPR2を、センダイウイルスベクターを用いて肺動脈に導入して安全性と治療効果を検証した。センダイウイルスベクターは肺動脈以外の全身臓器では感染を認めず、安全性が確認できた。NPR2が導入された肺では、肺高血圧の改善と、肺血管の中膜肥厚の改善、閉塞小血管の減少が認められ、本治療法の有効性が実証された。次にコンピューターモデリングを用いて、NPR2の活性を高める低分子化合物の検索を行った。活性中心にアクセスする化合物を複数同定することができた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effect of the induction of constitutive active NPR2, which could produce massive cGMP compared to other drugs. NPR2 was induced by using Sendai-virus vectors into Sugen-Hypoxia model rat which was shown as very similar to human pulmonary hypertension. First we confirmed the safety of this treatment by immunostaining of Sendai virus, which showed no infection except for lungs. The NPR2 induction led significant improvement of pulmonary arterial pressure by catheter examination. In histologically, NPR2 induction demonstrated the improvement of medial wall thickness of pulmonary resistant arteries as well as the suppression of small pulmonary vessel occlusion.

Next, we identified candidate small compounds, which allowed to access and stimulate guanylyl cyclase activity of NPR2 by using in silico modeling of the molecular structure of NPR2. However no small compound showed significant superior stimulative activity compared to existing drugs.

研究分野：循環器学

キーワード：小児循環器学 肺高血圧症 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

近年の先天性心疾患に対する診断・治療の進歩により、成人期まで生存する患者数は現在国内に40万人以上存在する。今後さらに毎年1万人近く増加し、その5-10%は肺動脈性肺高血圧 (pulmonary arterial hypertension; PAH) を発症するとされる。

PAHの病変部位は肺細小動脈であり、その病態については「微細肺細小動脈の収縮」→「肺血管リモデリング」→「肺動脈の器質的な狭窄・閉塞」というシエーマが描かれているが、一方では‘アポトーシス抵抗性細胞の異常な増殖’が観察されることから、「PAHの本態は血管壁の腫瘍性増殖である (cancer paradigm)」という新たな疾患概念の提唱もある。肺高血圧症の治療薬の開発はこのような病態背景をもとに、プロスタグランジン I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) 経路・エンドセリン経路・NO/cGMP 経路の3経路に注目して行われてきた。すでにいくつかの製剤が実用化され、生存率の改善に大きく貢献している。しかしながらこれら内科的治療が奏効しない症例については肺移植以外に手段がなく、あらたな薬剤標的の探索と治療薬の開発が必要とされている。私たちの研究室では肺高血圧症に対する新たな治療薬の開発を目指し、とくに強い肺血管拡張作用をもつNO/cGMP経路に注目して研究を進めてきた。NO経路は細胞内の可溶性グアニル酸シクラーゼ (GC) を活性化してcGMPを合成させることにより血管拡張作用を引き起こす。我々は特徴的な過成長と骨変形を呈する家族例を解析することにより、その病態がC型ナトリウム利尿ペプチド (C-type natriuretic peptide; CNP) に対する受容体 NPR2 (natriuretic peptide receptor 2) に生じた変異 (p.Val883Met) によるものであることを世界で初めて明らかにした (Miura et al. PLoS One 2012)。CNPは血管内皮細胞に多く存在し、平滑筋細胞上のNPR2と結合することでcGMPの産生を促して平滑筋の増殖を抑制していると考えられている。我々の発見した遺伝子変異は、このNPR2を恒常的に活性化させ、cGMPの産生を従来の薬剤と比較して飛躍的に増加させるものである。

## 2. 研究の目的

### 1. ヒトへの遺伝子導入のツールとして期待されているセンダイウイルスを用いた検討

本研究では変異型 NPR2 のより効率的な導入を確立するために、アデノウイルスベクターよりも高い遺伝子導入効率が期待され、また細胞の炎症反応を軽減することができるセンダイウイルスベクターを用いる。センダイウイルスによる遺伝子発現量はアデノウイルスの場合の数千倍～数万倍とも言われるため、短時間の細胞との接触で十分量の遺伝子導入が可能である。また細胞質型 RNA ベクターであるため、核に入り込むこともな

い。近年、下肢慢性動脈閉塞症の患者に対し、センダイウイルスを用いて血管新生因子である塩基性線維芽細胞増殖因子を遺伝子導入するという第一相臨床治験が行われており、すでにその安全性と有効性が確認されている。このセンダイウイルスを用いてラット肺血管への変異型 NPR2 の導入を行い、その治療効果を評価することで、ヒトへの臨床応用の基盤を確立する。

### 2. *in silico* での立体構造解析による新たな創薬ターゲットの検討

一方で、この NPR2 における遺伝子変異が cGMP 恒常的活性化を引き起こすメカニズムを明らかにすることができたならば、新たな創薬ターゲットとなることが期待されるだろう。そこで本研究のもうひとつの柱として、NPR2 の変異によってその機能がどのように変化するのか、とくに‘タンパク質の立体構造の変化’に焦点を当て、配列情報をもとにした *in silico* での立体構造解析によって研究を進める。

## 3. 研究の方法

### A) センダイウイルスを用いた Sugen-Hypoxia PAH ラットモデルへの変異型 NPR2 の導入法の確立と、肺高血圧症に対する効果についての評価

恒常活性型 NPR2 を導入するためのセンダイウイルスは DNAVEC 社への委託により作製した。このセンダイウイルスは短時間の細胞との接触で十分量の遺伝子導入が可能であるという特性をもち、少ない細胞毒性で効率的な遺伝子導入が可能であることが期待される。このセンダイウイルスを既報では最もヒトの肺高血圧病態に近いと言われる Sugen-Hypoxia 肺高血圧症ラットモデルの肺動脈に感染させることによって、変異型 NPR2 の遺伝子導入を行う。これまではアデノウイルスを経気道的噴霧投与によって導入を図っていたが、感染効率が非常に低かった。そこで今回はラットを麻酔下に側開胸し、片側の肺動脈にセンダイウイルスを注入したうえで肺動脈血流を一定時間遮断するという手法をとる。これにより十分な感染と遺伝子導入が可能になる。

NPR2 遺伝子導入の治療効果については、導入2週間後におけるラットの心カテーテル検査による PAH の改善や、肺組織の染色による組織学的評価によって行う。

### B) cGMP 恒常的産生型変異が NPR2 タンパクにもたらす立体構造変化についての *in silico* 解析

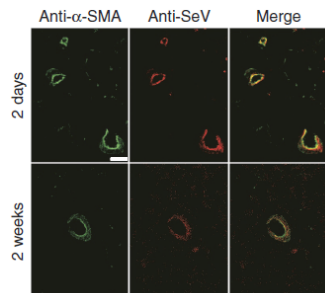
タンパク質の情報は、配列・構造・機能の3つに分けられる。配列が分かれば構造が高確率で予測され、両者の情報によってタンパク質のもつ機能がより明らかとなるだろう。タンパク質立体構造予測サーバーのひとつ、‘I-TASSER’は、国際的なタンパク質立体構

造予測コンテスト (CASP) で近年上位の成績を獲得している最も優秀なサーバーである。標的配列 (200 残基以下) を入力するだけで、そのタンパク質立体構造の予測が可能となる。そこでこの I-TASSER をもちいて、NRP2 の V 883M 変異によってもたらされる立体構造変化を可視化し、そのタンパク質が恒常活性機能を獲得する機序を明らかにする。次に NPR2 の Val833 近傍に作用してグアニリルシクラーゼを活性化させる物質の探索を行う。市販されている低分子化合物を、パーティクルクリーニング用に 3 次元構造へ変換させた網羅的データベース 'ZINC database' と、分子モデリングシミュレーションソフトウェアである 'AutoDock Vina' をもちいることで、約 270 万個の化合物のなかから NPR2 の V833 部位との affinity が高い化合物をスクリーニングすることが可能である。これらの中からグアニリルシクラーゼを活性化させる可能性のある化合物を選び出し、それら化合物を投与した際の作用について *in vitro*, *in vivo* の実験を行い、臨床応用への可能性を探る。

#### 4. 研究成果

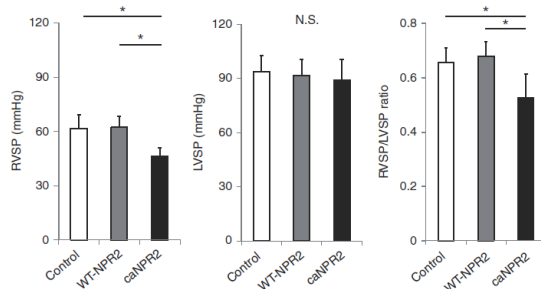
##### A) センダイウイルスを用いた Sugen-Hypoxia PAH ラットモデルへの変異型 NPR2 の導入法の確立と、肺高血圧症に対する効果についての評価

まず、肺高血圧のモデルラットとして、既報の報告で最もヒトの PAH 病態に近いとされる Sugen-Hypoxia モデルラットの作成を行った。これは、230-270g の成体ラットに SU5416 を 20ug/g 腹腔内投与し、その後 50kPa の低酸素チャンパーで 3 週間飼育、その後通常酸素下で 2 週間飼育することによって作成した。作成されたラットでは右室圧の上昇と肺動脈中膜肥厚を確認した。次にこれに対して、センダイウイルスベクターの投与を行った。センダイウイルスベクターは、GFP のみを発現させるコントロールと、野生型 NPR2 を発現させるコントロール、恒常活性型 NPR2 を発現させるベクターとを作成して、それぞれの間での比較を行った。センダイウイルスベクターは、ラットを麻酔のもと、左側開胸にて左肺動脈を露出し、近位端を 2-3 分クランプの間に左肺動脈への直接注入によって行った。NRP2 導入の確認については、GFP 発現センダイウイルスベクターを感染ののちに、左肺の免疫染色にて確認した。肺動脈平滑筋のマーカーとして  $\alpha$ -SMA での染色を行い、抗センダイウイルス抗体との共染色を行うことによって、肺動脈平滑筋に導入されていることを確認した (図 1)

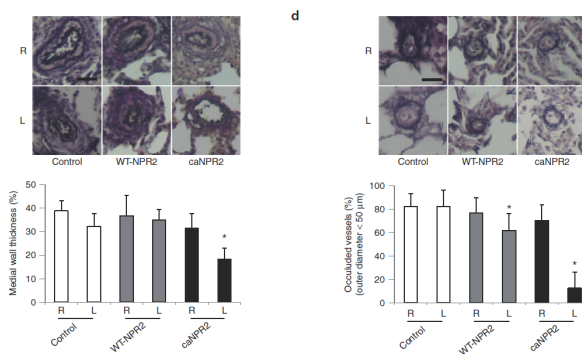


さらに、他臓器への影響についても確認したが、他の全身臓器 (体側の右肺を含む) については、有意な GFP タンパクの発現は確認できなかった。これにより、このセンダイウイルスベクター導入方法の安全性も確認された。

次に、センダイウイルスベクター導入後 2 週間でのラットの血行動態評価を行った。ラットの肺動脈圧と同等と考えられる右室収縮期圧は、恒常活性型 NPR2 の導入ラットにて有意に改善していた。(図 2)



次に、肺の組織学的変化について観察した。まず、中小肺動脈の中膜肥厚については、恒常活性型 NPR2 導入の左肺のみにおいて、有意に他と比較して改善していた。また、末梢の capillary vessel において、sugen-hypoxia モデルラットにおいては、しばしば閉塞性の病変が認められるが、恒常活性型 NPR2 導入によって、その改善も認められた。(図 3)



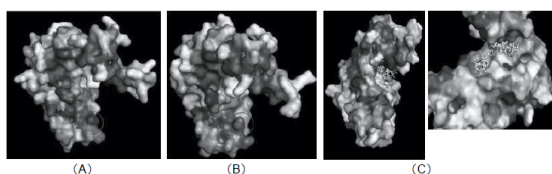
これらの肺高血圧症に対する治療効果が、どのようなメカニズムであるのかを検証するため、中小肺動脈における細胞増殖とアポトーシスの変化を PCNA による免疫染色と caspase3 による免疫染色にて確認したところ、肺動脈平滑筋の増殖が恒常活性型 NPR2 導入によって有意に抑制されており、一方でアポトーシスについては、変化がないことが確認された。

以上より、センダイウイルスベクターを用いた恒常活性型 NPR2 の肺動脈への導入治療は安全であり、また有意に肺高血圧症を改善させ、また肺動脈のリモデリングを抑制するこ

とが確認された。

#### B) cGMP 恒常的産生型変異が NPR2 タンパクにもたらす立体構造変化についての in silico 解析

まず、NPR2 変異が恒常活性を獲得する機序を明らかにするために in silico での立体構造解析を行った。I-TASSER(Nat Protoc. 2010;5:725-38)を用いて、野生型・変異体 NPR2 において、homology modeling で解析したところ、変異が起こった Val 883 は活性に重要と考えられている NPR2 グアニリルシクラーゼドメインの疎水性ポケットの近傍に位置していることが判明した。また、変異により立体構造変化が起こり、疎水性の Valine の位置が回転し、親水性の Thr 884 が表面に露出することにより、周囲の基質に対する親和性を変化させるものと考えられた(図 A, B)。



すなわち恒常活性化には、Val 883 周囲の立体構造が重要であることが示されたので、Val 883 周囲の疎水性ポケットに作用してグアニリルシクラーゼを活性化させるような物質を探索した。そのために、ZINC database(J Chem Inf Model. 2012;52:1757-68)に登録されている化合物を、AutoDock Vina(J Comput Chem. 2010;31:455-61)を用いて、コンピューター上で NPR2 野生体、変異体に docking を行った。それによって変異体の恒常活性部位と affinity の高い化合物について 10 つの候補を上げて検討を行ってみた(図 1 C)。これらの候補低分子化合物を、ヒト肺血管平滑筋細胞の培養上清中に添加し、細胞内 cGMP 濃度の上昇について検討した。しかし、これらの候補低分子化合物の添加によっては、幾分か細胞内 cGMP 濃度は上昇する物質も認められたものの、既存薬剤であるシルデナフィルやリオシグアトに比して細胞内 cGMP を有意に上昇させる化合物は見つけることが出来なかった。

#### 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 2 件)

1. Chida A, Inai K, Sato H, Shimada E, Nishizawa T, Shimada M, Furutani M, Furutani Y, Kawamura Y, Sugimoto M, Ishihara J, Fujiwara M, Soga T, Kawana M, Fuji S, Tateno S, Kuraiishi K, Kogaki S, Nishimura M, Ayusawa M, Ichida F, Yamazawa H, Matsuoka

R, Nonoyama S, Nakanishi T. Prognostic predictive value of gene mutations in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. Heart Vessels, 32(6): 700-707, 2016 doi: 10.1007/s00380-016-0920-0. (査読有)

2. Nawa N, Ishida H, Katsuragi S, Baden H, Takahashi K, Higeno R, Torigoe F, Mihara S, Narita J, Miura K, Nakamura K, Kogaki S, Ozono K. Constitutively active form of natriuretic peptide receptor 2 ameliorates experimental pulmonary arterial hypertension. Mol Ther Methods Clin Dev, 3 : 16044, 2016 doi: 10.1038/mtm.2016.44 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 馬殿洋樹, 桂木慎一, 那波伸敏, 石田秀和, 成田淳, 高橋邦彦, 小垣 滋豊, 大藪恵一. B型ナトリウム利尿ペプチド受容体(NPR-B)機能獲得変異体による心不全予防効果の検討. 第52回日本小児循環器学会総会・学術集会: 2016年07月06日~2016年07月08日, 東京
2. Nawa N, Ishida H, Katsuragi S, Baden H, Takahashi K, Kogaki S, Higeno R, Torigoe F, Mihara S, Narita J, Miura K, Ozono K. Intravascular injection of Sendai virus vector carrying continuously cGMP producing mutant of type B Natriuretic Peptide Receptor can ameliorate pulmonary arterial hypertension. American Heart Association (AHA) Scientific Sessions 2015(国際学会):2015年11月07日~2015年11月11日, Orlando, Florida, United States
3. 那波伸敏, 石田秀和, 馬殿洋樹, 桂木慎一, 高橋邦彦, 小垣滋豊, 廣瀬将樹, 鳥越史子, 髭野亮太, 三原聖子, 成田淳, 三浦弘司, 大藪恵一. CNP受容体恒常活性型変異体を用いた肺高血圧症の新たな治療法. 第4回日本肺循環学会・第3回日本肺高血圧学会 合同学術集会: 2015年10月03日~2015年10月04日, 東京
4. 那波伸敏, 石田秀和, 馬殿洋樹, 高橋邦彦, 小垣滋豊, 廣瀬将樹, 桂木慎一, 髭野亮太, 三原聖子, 成田淳, 三浦弘司, 大藪恵一. センダイウイルスベクターを用いた肺動脈性肺高血圧症(PAH)に対する新たな遺伝子治療の可能性. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会:

2015年07月16日～2015年07月18日，東京

5. Nawa N, Ishida H, Baden H,  
Takahashi K, Higeno R, Mihara S,  
Ishii R, Ichimori H, Yabushita-Okada  
Y, Miura K, Kogaki S, Ozono K.  
Therapeutic application of  
constitutively active type B  
natriuretic peptide receptor for  
pulmonary arterial hypertension. 第  
79回日本循環器学会学術集会: 2015年  
04月24日～2015年04月26日，大阪

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 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・招へい教員  
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・招へい教員  
研究者番号：30617543

那波 伸敏 (NAWA, Nobutoshi)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：60644614

馬殿 洋樹 (BADEN, Hiroki)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：60644614

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )