

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19360

研究課題名(和文)慢性血栓塞栓性肺高血圧症の新しい早期発見・予防・治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutic target in chronic thromboembolic pulmonary hypertension

研究代表者

矢尾板 信裕 (Yaoita, Nobuhiro)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：00735368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)患者の血栓は線溶能が低下しており、血漿中Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor(TAFI)の抗原量及び活性化が上昇していた。さらにCTEPH患者ではTAFIの抗原量を増加させるSNPsが認められた。また、活性化TAFI阻害剤やプロスタグランジンE1によりCTEPH患者の線溶能が改善した。

また、TAFI過剰発現マウスを低酸素暴露することにより、肺動脈内の器質化血栓と著しい肺高血圧症の増悪を認めた。さらに、平滑筋細胞にTAFIを投与することで増殖能が亢進し、CTEPHの末梢病変形成にも関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The clot of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) patients was more resistant to fibrinolysis than that of non-PH patients or pulmonary arterial hypertension (PAH) patients. The plasma levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and the activation of TAFI were increased in CTEPH patients. Moreover, SNPs of cpb2, which induced the plasma levels of TAFI, was found in CTEPH patients. The impairment of fibrinolysis in CTEPH patients was improved with the inhibitor of activated TAFI.

In the TAFI overexpression mice, pulmonary hypertension was worse than wild type mice with hypoxic exposure and organized thrombi were found in pulmonary artery. Moreover, TAFI increased the proliferation of smooth muscle cells of human.

These data suggest that TAFI could be a novel biomarker and realistic therapeutic target of CTEPH.

研究分野：循環器内科

キーワード：循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)は肺動脈内に器質化血栓を生じ、肺高血圧症から右心不全に進展し、死に至る難治性疾患である。肺動脈内に器質化血栓を生じることから凝固線溶系の異常が関与していると考えられているが、凝固線溶系の異常で報告されているものは抗リン脂質抗症候群のみで、CTEPH 発症の病因は不明であった。

最近我々は、CTEPH 患者の全線溶能が低下していること、血小板が活性化していること、線溶系を阻害する Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor(TAFI)が CTEPH 患者で高いことを突き止めた。しかし、TAFI が CTEPH 患者で上昇している原因、及び TAFI の上昇が CTEPH 発症につながるかどうかは不明であった。そこで、本研究では CTEPH における TAFI の関与を、ヒト血漿とマウスを用いて検討した。

2. 研究の目的

CTEPH 患者で TAFI が上昇している原因と TAFI 過剰発現マウスを用いて CTEPH のマウスモデルを作成し、TAFI が CTEPH の新たな診断方法及び治療標的となるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1)肺血栓塞栓症患者の血液を使用し、Whole blood clot lysis assay と Plasma clot lysis assay を施行し、全線溶能を評価する

(2)肺血栓塞栓症患者の血漿中 TAFI を ELISA で測定する。さらに活性化 TAFI を Western blot で評価する。

(3)CTEPH 患者で TAFI の血漿中抗原量及び活性化に関与している一塩基変異多型(SNPs)を検討する。

(4)TAFI 過剰発現マウス及びノックアウトマウスを使用し、in vivo における肺循環線溶能を評価する。この際にトロンピン尾静脈注射モデルや低酸素暴露モデルを使用する。

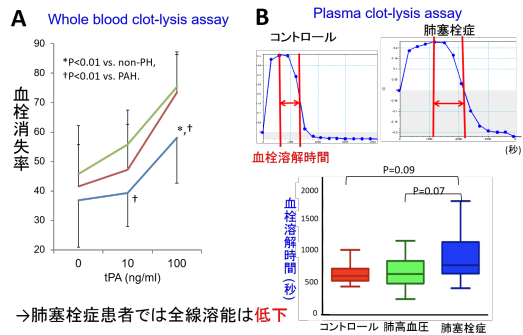
(5)TAFI が CTEPH 患者で認められる肺動脈末梢病変(肺動脈平滑筋の増殖や内皮の増殖、炎症性細胞の浸潤など)に影響を及ぼすか検討する。

(6)TAFI 活性化阻害薬や TAFI の発現を低下させる薬剤を使用して TAFI が CTEPH の新たな治療標的となるかどうか検討する。

4. 研究成果

(1)肺血栓塞栓症患者では Whole blood clot lysis assay ではウロキナーゼに対する線溶能は有意差を認めなかったが、tPA に対する線溶能が有意に低下していた。さらに、血漿のみを分離して行った Plasma clot lysis assay においても肺血栓塞栓症患者の線溶能は有意に低下していた。

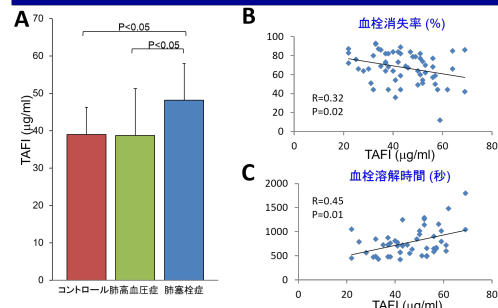
図1 全線溶能の評価



→肺血栓症患者では全線溶能は低下

(2)ELISA で血漿中 TAFI の抗原量を測定したところ、肺血栓塞栓症患者では有意に TAFI 抗原量が上昇していた。さらに、血漿中 TAFI 抗原量は Whole blood clot lysis assay 及び Plasma clot lysis assay で認められた線溶能の低下と有意な相関を示し、本研究で認められた線溶能の低下は TAFI と関与していることが示唆された。また、CTEPH 患者の TAFI を Western blot で確認すると、健常者ではほとんど認められなかった活性化 TAFI が CTEPH 患者の血漿では認められ、血漿中抗原量が増加しているのみならず、その活性化著しく増加していることがわかった。

図2 肺血栓症におけるTAFIの血漿中抗原量



→ TAFI の血漿中抗原量は肺血栓症患者で有意に高く、線溶能の低下の程度と相関

た。

(3)CTEPH 患者において、血漿中 TAFI 抗原量が増加している原因と TAFI の活性化が亢進している病因に関して検討するため、それらにかかわる SNPs をサンガー法にて検討した。TAFI の活性化に関与する SNPs は健常人コホートと頻度に差が認められなかったが、TAFI の血漿中抗原量を増加させる SNPs(-1120G/T)が東アジアで報告はなかったが、CTEPH 患者では認められ、この SNPs が TAFI の血漿中抗原量の増加の原因の 1 つと考えられた。TAFI の活性化の原因に関しては、血小板活性化阻害剤(プロスタグランジ

図3 肺血栓症患者のCPB2のSNPs

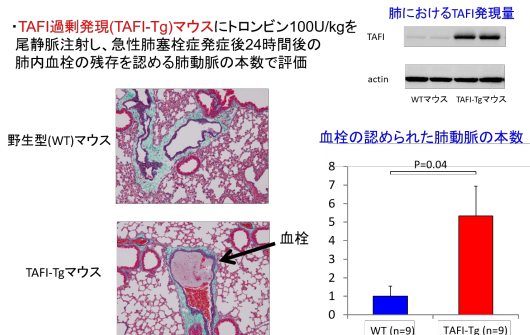
SNPs	TAFIへの関与	CTEPH患者の頻度	東アジア人の頻度
-1120 G/T	抗原量増加	24%	0%
-1583 A/T	抗原量増加	24%	24%
Thr325/Ile	活性化増加	35%	42%

→-1120G/TのSNPsの頻度が肺血栓症患者に多い
欧米人と同様の頻度である

ンE1)を Whole blood clot lysis assay に加えると線溶能が改善することから血小板を介した活性化機構が示唆された。

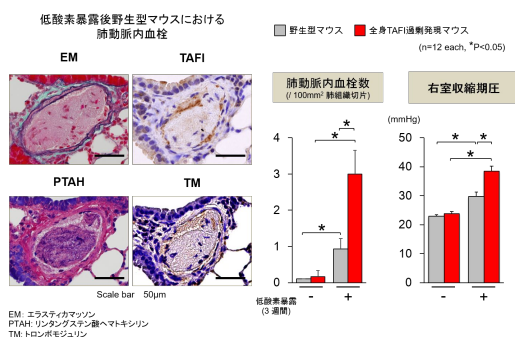
(4)TAFI 過剰発現マウスにトロンピンを尾静脈注射にて急性肺塞栓症を発症させたところ、24 時間後に肺動脈内に器質化が開始された血栓が認められることがわかった。従って、トロンピン尾静脈注射を施行し、24 時間後の肺動脈内血栓の量を評価した。トロンピン尾静脈注射によるマウスの死亡率は野生型マウスと TAFI 過剰発現マウスでは差はなかったが、24 時間後に残存する肺動脈内血栓に関して TAFI 過剰発現マウスは野生型マウスに比べ有意に増加していた。このことから、TAFI は急性肺塞栓症の重症度には関与しないが、その後肺動脈内の血栓消失に強く関与

図4 In vivoにおけるTAFIの肺内血栓への影響 (マウス肺塞栓症モデル)



していることが示唆された。さらに、トロンピン尾静脈注射を複数回繰り返すことで、肺高血圧症を来すと考え、検討した。しかしながら、5 回のトロンピン尾静脈注射では最終的な肺動脈内器質化血栓の量は TAFI 過剰発現マウスで有意に多いものの、右室肥大に関しては野生型マウスと TAFI 過剰発現マウスでは有意差を認めず、肺高血圧症は来さなかった。そこで、TAFI 過剰発現マウスと野生型マウスを低酸素暴露とし、肺高血圧症を生じさせた。その結果 TAFI 過剰発現マウスは野生型マウスと比較し、有意に多く死亡し、さらに肺高血圧症が有意に増悪した。また、TAFI 過剰発現マウスでは肺動脈内に器質化血栓を形成しており、器質化血栓により肺高血圧症が増悪している可能性が示唆された。このモデルはCTEPHの病態に近い世界で初めて

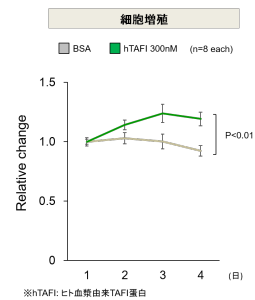
図5: TAFIによる低酸素誘発性肺高血圧と肺動脈内血栓形成の促進



のマウスモデルと考えられた。

(5)TAFI 過剰発現マウスでは肺高血圧症が増悪することから、CTEPH における末梢病変(平滑筋の肥厚や炎症性細胞の浸潤)の形成にも関与している可能性が考えられた。そこで、ヒトの平滑筋細胞を培養し、そこにリコンビナント TAFI を投与したところ、有意に平滑筋細胞が増殖した。このことから TAFI は線溶系を抑制するだけではなく、平滑筋細胞にも直接影響を与える可能性が考えられた。このことから、TAFI を阻害することはCTEPH 患者における末梢病変の進行の抑制

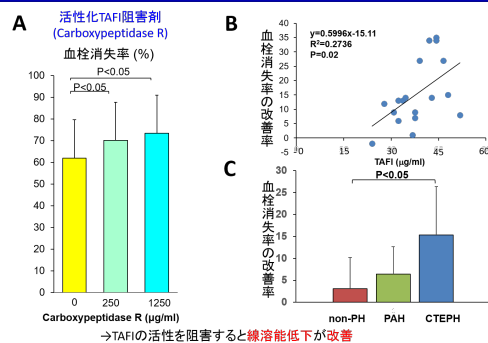
図6: TAFIによる肺動脈平滑筋細胞の増殖



にもつながる可能性が示唆された。

(6)さらに TAFI がCTEPH の治療ターゲットになるかどうか検討した。最初に Whole blood clot lysis assay を用いて、活性化 TAFI 阻害剤に関してCTEPH の線溶能を改善するかどうか検討した。活性化 TAFI 阻害剤を加えた所、CTEPH 患者で認められた線溶能の低下が有意に改善した。さらに、線溶能の低下の改善率は血漿中 TAFI 抗原量と有意な正の相関を認めた。また、非肺高血圧症患者や肺動脈性肺高血圧症患者の血液に加えても線溶能に対してほとんど影響を与えず、血漿中 TAFI 抗原量の多いCTEPH 患者で、線溶能の改善率が有意に高かった。このことから活性化 TAFI 阻害剤はCTEPH の線溶能改善

図7 CTEPH患者の線溶抵抗性への活性化TAFI阻害剤の検討



の新たな治療標的となることが考えられた。さらに、TAFI 過剰発現マウスに血漿中 TAFI 抗原量を低下させる PPAR α アゴニストを投与すると、低酸素暴露における肺高血圧症の程度は改善し、さらに、TAFI ノックアウトマウスを低酸素暴露した場合でも肺高血圧症の程度を改善した。これらのことから in vivo においても TAFI がCTEPH の新たな治

療標的となる可能性が示唆された。

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)

発表論文は全て査読あり

(雑誌論文)(計8件)

1. Satoh T, Satoh K, Yaoita N, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Numano K, Elias-Al-Mamun M, AbdulHai Siddique MAH, Sunamura S, Nogi M, Suzuki K, Miyata S, John Morser J, Shimokawa H. Activated TAFI promotes the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension - A possible novel therapeutic target - **Circ Res.** 2017 (in press)

2. Ohtsuki T, Satoh K, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, Nogi M, Sunamura S, Yaoita N, Aoki T, Tatebe S, Sugimura K, Takahashi J, Miyata S, Shimokawa H. Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin A in patients with coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 37:685-693,2017.

3. Yaoita N, Satoh K, Shimokawa H. Novel Therapeutic Targets of Pulmonary Hypertension. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 36:e97-e102, 2016.

4. Yamamoto S, Suzuki H, Sugimura K, Tatebe S, Aoki T, Miura M, Yaoita N, Sato H, Kozu K, Ota H, Takanami K, Takase K, Shimokawa H. Focal reduction in cardiac ¹²³I-Metaiodobenzylguanidine uptake in patients with Anderson-Fabry disease. **Circ J.** 80:2550-2551, 2016.

5. Yaoita N, Satoh K, Satoh T, Sugimura K, Tatebe S, Yamamoto S, Aoki T, Miura M, Kawamura T, Horiuchi H, Fukumoto Y, Shimokawa H. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 36:1293-1301,2016.

6. Aoki T, Sugimura K, Nochioka K, Miura M, Tatebe S, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Kozu K, Miyata S, Satoh K, Shimokawa H. Effects of balloon pulmonary angioplasty on oxygenation in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension - Importance of intra-pulmonary shunt - **Circ J.** 80:2227-2234,2016

7. Sato H, Ota H, Sugimura K, Aoki T, Tatebe S, Miura M, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Satoh K, Takase K, Shimokawa H. Balloon pulmonary angioplasty improves biventricular functions and pulmonary flow in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Circ J.** 80:1470-1477,2016.

8. Takagi H, Ota H, Sugimura K, Otani K, Tominaga J, Aoki T, Tatebe S, Miura M, Yamamoto S, Sato H, Yaoita N, Suzuki H, Shimokawa H, Takase K. Dual-energy CT to estimate clinical severity of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: comparison with invasive right heart catheterization. **Eur J Radiol.** 9:1574-80, 2016.

(学会発表)(計6件)

1. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor Promotes Development of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension-A Possible Novel Therapeutic Target. T Satoh, K Satoh, N Yaoita, N Kikuchi, J Omura, R Kurosawa, S Sunamura, M Nogi, T Otsuki, K Numano, Elias Al-Mamun, Mohammad Abdul Hai Siddique, S Tatebe, T Aoki, K Sugimura, J Morser, H Shimokawa 2016年11月14日 アメリカ心臓病学会 ニューオーリンズ(アメリカ)

2. Cardiopulmonary Best Abstract Award: A Disintegrin and Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs 8 Downregulates AMP-activated Protein Kinase and Promotes Matrix Metalloproteinases Activation and Pulmonary Hypertension. J Omura, K Satoh, N Kikuchi, T Satoh, R Kurosawa, M Nogi, S Sunamura, T Ohtsuki, K Kozu, K Numano, K Sugimura, S Tatebe, T Aoki, K Suzuki, N Yaoita, H Shimokawa 2016年11月13日 アメリカ心臓病学会 ニューオーリンズ(アメリカ)

3. Crucial role of thrombin-activated fibrinolysis inhibitor in the pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. N Yaoita, T Satoh, K Satoh, K Sugimura, S Tatebe, S Yamamoto, T Aoki, M Miura, Y Fukumoto, H Horiuchi, H Shimokawa. 2015年9月29日 ヨーロッパ呼吸器学会 アムステルダム(オランダ)

4. Thrombin-activated fibrinolysis inhibitor in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. N Yaoita, K Satoh, T Satoh, K Sugimura, S Tatebe, S Yamamoto, T Aoki, M Miura, T Kawamura,

H Horiuchi, Y Fukumoto, H Shimokawa.
2015年11月10日 アメリカ心臓病学会
オーランド(アメリカ)

5. Crucial role of thrombin-activated
fibrinolysis inhibitor in the pathogenesis of
chronic thromboembolic pulmonary
hypertension. N Yaoita, K Satoh, T Satoh,
N Kikuchi, J Omura, R Kurosawa, M Nogi,
T Otsuki, K Kozu, K Numano, K Suzuki, S
Sunamura, S Tatebe, T Aoki, K Sugimura,
H Horiuchi, H Shimokawa. 2016年3月20
日 日本循環器学会 仙台市 国際センタ
ー

6. Influence of discontinuation of
medications after successful percutaneous
transluminal pulmonary angioplasty in
patients with chronic thromboembolic
pulmonary hypertension. N Yaoita, K
Sugimura, S Tatebe, S Yamamoto, T Aoki,
M Miura, K Satoh, H Shimokawa. 2016年3
月20日 日本循環器学会 仙台市 国際セ
ンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾板 信裕 (Nobuhiro, Yaoita)
東北大学 東北メディカル・メガバンク機
構・助教
研究者番号：00735368