

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10965

研究課題名(和文)肺高血圧症の新規治療薬としてのトロンビン受容体拮抗薬の可能性

研究課題名(英文)Thrombin receptor antagonists as a novel therapeutic agent for pulmonary hypertension

研究代表者

牧 盾(Maki, Jun)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10368665

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)：ラットおよびマウスに大動脈-下大静脈シャントを作成し、肺血流増多による肺高血圧症モデルの作成を試みた。過去の報告通り、右心負荷により右室の拡大から右心不全を呈したが、右室の収縮は低下し肺高血圧症の指標である右室肥大を来さなかった。また、肺の組織においても肺高血圧症の特徴である肺動脈狭窄やplexiform lesionは観察されなかった。そこで、協力施設から肺高血圧モデル仔羊および対照モデル仔羊から摘出した肺動脈・肺静脈の提供を受け、肺高血圧モデルでトロンビン受容体の発現が増加していることを発見した。トロンビンが肺高血圧の病態に関与していることが明らかになり、論文として発表準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症はしばしば先天性心疾患に合併する。近年新たな治療薬が開発されているが、肺高血圧症の進行を止める効果的な治療は未だ開発されていない。そこで、肺高血圧症の進行を抑え、症状を軽快する治療薬の開発が望まれる。これまでトロンビンが肺動脈を収縮することを明らかにしてきたが、ことトロンビンが肺高血圧症の進行に関連し、トロンビン受容体拮抗薬が肺高血圧の治療薬として可能性があると仮説を立てて研究を行った。肺高血圧症モデル動物において、肺動脈のトロンビン受容体が増加していることを発見し、仮説が正しいことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：I examined the usefulness of the Aorto-caval shunt in either rats and mice as an experimental model for our research of pulmonary hypertension caused by increased pulmonary blood flow. Increased venous return through aorto-caval shunt caused enlargement of right ventricle, and then developed right ventricle failure, as described before. However, right ventricle hypertrophy as a sign of pulmonary hypertension was not caused by aorto-caval shunt. Histological findings of lung from aorto-caval shunt rats and mice failed to show either pulmonary artery stenosis or plexiform lesion known as characteristic findings of pulmonary hypertension. Then I asked a cooperative laboratory to provide samples of pulmonary artery and vein from pulmonary hypertension model and control lamb. I showed the increase of thrombin receptor expression in both pulmonary artery and vein from model animals, elucidating the relationship of thrombin and pathophysiology of pulmonary hypertension.

研究分野：肺高血圧研究

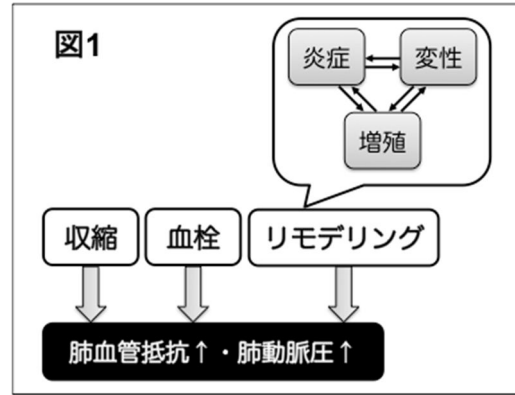
キーワード：肺高血圧症 先天性心疾患 トロンビン トロンビン受容体

1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症 (PH)

肺動脈圧と肺血管抵抗が上昇する病態で、肺動脈病変は図1のような機序で進展する。

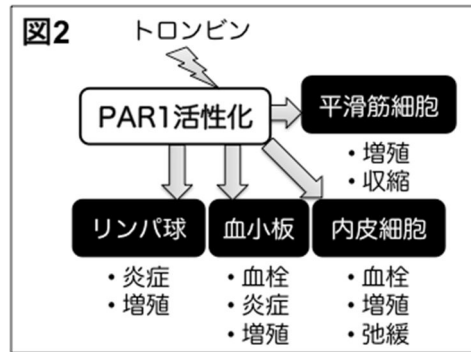
- 先天性心疾患 (CHD) に起因する PH  
肺血流増加によるずり応力と圧負荷が、肺動脈の内皮障害、平滑筋増殖とリモデリングを引き起こすと考えられているが、他の病因による PH と比べて研究が遅れている。また、PH が進行すると CHD の根治術が不可能で予後不良となる。  
そのため、CHD に起因する PH の発症機序の解明と治療法の開発が急務である。



- プロテイナーゼ活性化型受容体-1 (PAR<sub>1</sub>)  
PAR<sub>1</sub> はトロンビン受容体の1つであり、図2に示すような血管への作用を持つ。これは PH の肺動脈病変の進展に PAR<sub>1</sub> が関与していることを示唆している。

代表研究者はこれまで、以下のような研究を行ってきた。

1. トロンビンによる肺動脈収縮  
ブタ肺動脈において、トロンビンは PAR<sub>1</sub> を活性化し、Rho キナーゼや活性酸素を介した肺動脈収縮を引き起こす<sup>1,2</sup>
2. CHD に起因する PH モデル動物での肺動脈のトロンビンに対する反応性の増強



大動脈-肺動脈 (A-P) シヤントによる PH ヒツジ (下記) では、肺動脈のトロンビンに対する反応性が増強する

以上より、CHD に起因する PH において PAR<sub>1</sub> は肺動脈収縮に関与しており、病変形成への関与も予想される。そうであれば、PAR<sub>1</sub> は PH 治療のターゲットになり得る。

PH 研究における動物モデル

PH 研究では、モノクローリンラット、低酸素マウス、遺伝子改変マウスなどが用いられるが<sup>3</sup>、CHD に起因する PH はこれらの動物モデルと発症機序が異なる。前述の A-P シヤントによる PH ヒツジモデルが唯一の CHD による PH の病態モデルであるが<sup>4</sup>、技術面、コスト面および設備面での制約が大きく、これを用いる実験は事実上不可能である。

1. Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H and Hirano K. Involvement of reactive oxygen species in thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182:1435-1444.
2. Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H and Hirano K. Thrombin activation of proteinase-activated receptor 1 potentiates the myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and induces vasoconstriction in porcine pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2010;159:919-27.
3. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ and McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;297:32.
4. Reddy VM, Meyrick B, Wong J, Khoor A, Liddicoat JR, Hanley FL and Fineman JR. In utero placement of aortopulmonary shunts. A model of postnatal pulmonary hypertension with increased pulmonary blood flow in lambs. *Circulation*. 1995;92:606-613.

2. 研究の目的

先天性心疾患に起因する肺高血圧症 (PH) において、

1. 肺動脈病変の進展、肺動脈の収縮におけるトロンビン受容体 (プロテイナーゼ活性化型受容体-1: PAR<sub>1</sub>) の役割を明らかにする。
2. PAR<sub>1</sub> 拮抗薬の PH 進展予防効果について検討する。

3. 研究の方法

- ラットの下降大動脈-下大静脈 (Ao-IVC シヤント)  
容量負荷に伴う心不全研究において、ラットの Ao-IVC シヤントモデルは用いられてきた<sup>6,7</sup>。このモデルの作成方法は以下の通りである。
  1. 全身麻酔下に開腹する
  2. Ao を遮断し、Ao 側から IVC に 18G 針を貫通させる

3. その間を生体接着剤で接着し、18G 針を抜去する
4. Ao 遮断を解除し、止血を確認して閉腹する
5. 4~6 週間で右心不全になる。  
このモデルは左-右短絡の作成部位は異なるが、肺血流量が増加する点は A-P シャントモデル同じであり、右心肥大など共通する所見が多い
6. 肺の病理組織で肺動脈性肺高血圧症の所見を確認する

- 培養細胞を用いた研究

培養細胞に shear stress を加える方法を肺動脈に応用する 5。

1. 細胞：ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) の細胞株を用いる
2. 方法：チャンバー内で培養した HPAEC 上で培地を高流速で循環させ、shear stress に暴露する

- 肺血流量増加による平滑筋の増殖・リモデリングの検討

1. 培養細胞を用いて、MAPK-ERK 経路、PI3K-Akt 経路の関与するタンパク、遺伝子発現、リン酸化の程度を測定する。
2. ラット Ao-IVC シャントを用いた免疫蛍光染色で、これらの程度と局在を明らかにする。

- PAR<sub>1</sub> 発現変化に関する検討

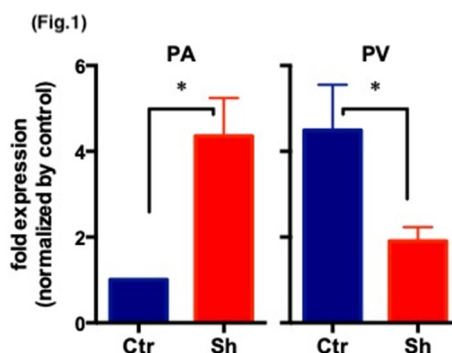
培養細胞、ラット Ao-IVC シャントモデルから抽出したサンプルを用いて以下のについて検討する

1. Western blot、qRT-PCR： 、 のサンプルから PAR1 タンパク、遺伝子の発現を評価する。
2. 免疫蛍光染色： の組織を用いて、PAR1 発現の局在を評価する。

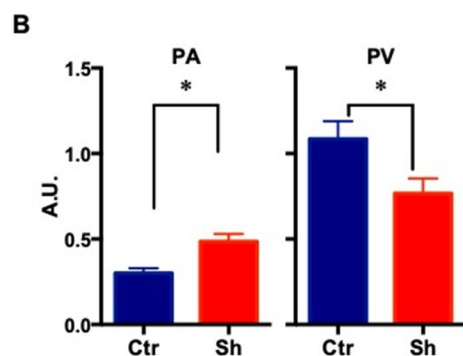
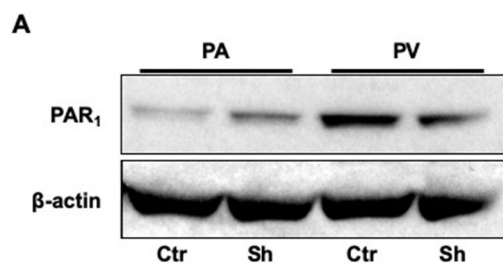
5. *Kytai Truong N, Suzanne GE, Cam P, Marschall SR and Larry VM. Shear Stress Reduces Protease Activated Receptor-1 Expression in Human Endothelial Cells. Annals of Biomedical Engineering. 2001.*
6. *Flaim SF, Minter WJ, Nellis SH and Clark DP. Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat. The American journal of physiology. 1979;236:704.*
7. *Linardi D, Rungtatscher A, Morjan M, Marino P, Luciani GB, Mazzucco A and Faggian G. Ventricular and pulmonary vascular remodeling induced by pulmonary overflow in a chronic model of pretricuspid shunt. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. 2014.*

#### 4. 研究成果

- ラットに大動脈-下大静脈シャントを作成し、肺血流量増加による肺高血圧症モデルの作成を試みた。過去の報告通り、右心負荷により右室の拡大から右心不全を呈したが、右室の収縮は低下し肺高血圧症の指標である右室肥大を来さなかった。また、肺の組織においても肺高血圧症の特徴である肺動脈狭窄や plexiform lesion は観察されなかった。また、マウスを用いて同様のモデル作成を試みたが、急激に右心不全が進行したと思われる多臓器不全で、致命的だった。マウス、ラットにおける Ao-IVC シャントモデルは、PH の動物モデルとしては適切でないことが明らかになった。
- 培養細胞を高流速で灌流した環境下で培養する実験手法は、冠動脈内皮細胞などの実験でしばしば用いられる。コラーゲンによる処理をしたスライドガラスなどを用いて培養を試みたが、HPAEC は灌流中に細胞がスライドガラスから剥がれた。HPAEC の接着力が弱いためか、灌流速度などの実験条件にもんだがあるのか、検証を試みたが解明に至らなかった。
- そこで、協力施設から肺高血圧モデル仔羊および対照モデル仔羊から抽出した肺動脈・肺静脈の提供を受け、肺高血圧モデルでトロンビン受容体の遺伝子 (Fig.1)、タンパク (Fig.2) 発現が増加していることを発見した。トロンピンが肺高血圧の病態に関与していることが明らかになり、論文として発表準備中である。



(Fig.2)



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。