

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11772

研究課題名（和文）ファイトケミカルを含むインドール類縁体による難治性肺高血圧症病態制御の可能性

研究課題名（英文）Study on control and prevention of pulmonary arterial hypertension by indol-derivatives including phytochemicals.

研究代表者

斉藤 麻希 (SAITO, Maki)

医療創生大学・薬学部・准教授

研究者番号：40365185

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肺高血圧症は何らかの原因で肺動脈圧が慢性的に上昇し、右心室や肺動脈に代償性的リモデリングを引き起こす進行性の病態である。近年では優れた肺動脈拡張薬が開発され一定の効果を上げている一方、全身性慢性炎症を伴う肺高血圧症患者の生命予後は改善の余地を大きく残している。本研究では、インドール類縁体のいくつかに強い抗炎症作用を有することに着眼し、肺高血圧症病態下で生じる右心室肥大や線維化に対して抑制作用を示すものを見出すことを目的とした。培養細胞を用いた検討により、キャベツ等のアブラナ科野菜に含まれるインドール類縁体は、アンジオテンシンに誘発される心線維芽細胞の活性化を抑制する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、治療抵抗性があるとされる膠原病等全身性慢性炎症を伴う肺高血圧症の生命予後改善を究極目標としている。その背景には、申請者が、肺動脈圧を下降させることができなくても右心室や肺組織における炎症を抑制することで生存率を改善しうることを動物実験レベルで見出せたことがある。本研究において、アブラナ科野菜ファイトケミカルがヒト線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化を抑制しうることを見出したことは、慢性炎症を伴う肺高血圧症の予後を改善しうる新たな作用機序を持つ肺高血圧症治療補助薬の候補化合物を提示するに留まらず、アブラナ科野菜の付加価値向上にも結びつきうる、意義深いものであると確信する。

研究成果の概要（英文）：Pulmonary hypertension is a progressive pathological condition in which the pulmonary arterial pressure is chronically elevated for some reason, causing compensatory remodeling of the right ventricle and pulmonary artery. Nowadays, effective pulmonary artery dilators have been developed and improve the survival rate of the patients.

In the present study, I focused on the fact that some indole analogs have strong anti-inflammatory effects and aimed to find those that show inhibitory effects on right ventricular hypertrophy and fibrosis that occur in pulmonary hypertension. I found that indole analogs contained in Brassica vegetables such as cabbage may suppress the angiotensin-induced activation of cardiac fibroblasts.

研究分野：循環薬理学

キーワード：インドール類縁体 肺高血圧症

## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症 (pulmonary hypertension, PH) は、原因不明の撻承動脈狭窄によって肺動脈圧が選択的に上昇する難治性かつ進行性の病態である。本邦における PH 患者数は、約三千名と少ないものの、診断技術や治療法の向上もあってか、患者は毎年 300 名程度増加している。症状が顕在化するまで数年以上かかることから、潜在的な患者はこれより多いと推察される。死亡原因の半数は、PH に対する代償性の右心肥大や右心線維化に起因する右心不全である。

PH の治療上、最も優先されているのは肺血管拡張薬による肺動脈圧の改善である。現在、エンドセリン受容体遮断薬や一酸化窒素-サイクリック GMP 関連薬を始め、様々な作用機序の肺血管拡張薬が治療に用いられ、PH の生命予後改善に一定の効果を上げている。一方、これら薬剤に対して非感受性の症例も存在するほか、膠原病等の全身性慢性炎症を伴う PH の生命予後は未だ改善の余地を大きく残している。

申請者はこれまでに、①肺動脈への伸展刺激は、肺血管収縮性且つ炎症性プロスタグランジンの 1 つである PGH<sub>2</sub> 産生を引き起こすこと (Saito, M., et al. *Eur J Pharmacol*, 467:151-61, 2003)、②この PGH<sub>2</sub> 産生は炎症性プロスタグランジン産生に関わる分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) 阻害薬 indoxam により抑制されることを報告した (Tanabe, T., Saito, M., et al. *J Pharmacol Sci*, 115:525-31, 2011)。また、③PH モデルラットの肺動脈で sPLA<sub>2</sub> の発現が増大していること (Tanabe, T., Saito-Tanji, M., et al. *J Pharmacol Sci*, 119:271-81, 2012)、④sPLA<sub>2</sub> 阻害薬の長期投与は PH ラットの心肺における炎症性サイトカイン発現を抑制し、生命予後を改善することを見出した (論文執筆中)。さらに、⑤炎症抑制効果が報告されているアンギオテンシン受容体阻害薬 (ARB) オルメサルタンの長期投与も心線維化を抑制し、生命予後を改善することを見出し、投稿準備中である。驚いたことに sPLA<sub>2</sub> 阻害薬やオルメサルタンは、肺血管拡張作用は示さず、PH を改善しなかった。このことから、PH 患者の生命予後改善に炎症抑制の観点を取り入れることの重要性を確信した。

代表的な非ステロイド性抗炎症薬インドメタシンは、インドール骨格を有する抗炎症効果の高い薬物である。本課題の研究協力者である中嶋順一博士 (東京都健康安全研究センター) らは、インドメタシンの構造に着眼して研究を進めた結果、JWH210 を始めとした一連のインドール類縁体が、腫瘍形成抑制作用や強力な抗炎症作用を示すことを報告した (*J Pharm Pharmacol*, 65: 1223-30, 2013)。植物が自身の身を守るために産生する一群のファイトケミカルにもインドール骨格を有するものが存在し、近年では、循環不全にもなう虚血/再灌流傷害時に見られる炎症性応答に対してインドール-3-カルビノールが抑制効果をしめすとの結果 (Ampofo, E., et al. *J Surg Res*, 215:34, 2017) や、TNF-alpha によって引き起こされる炎症反応をブラシニンが抑制したとの結果 (Han, B. H., et al. *Mol Med Rep*, 16:6890, 2017) が培養細胞を用いた系で示された。しかし、それらインドール系ファイトケミカルが循環系疾患を改善するか否か、個体レベルでの検討は十分にはなされていない。

## 2. 研究の目的

PH のなかで治療抵抗性の高い膠原病等の全身性慢性炎症を伴う肺高血圧症患者の予後改善を究極目標とする。そのために、まずは抗炎症作用を有するインドール類縁体のなかに肺高血圧症病態や予後を改善しうる、且つ安全性が高く比較的安価な化合物があるか否かについて、肺高血圧動物および培養細胞を用いたスクリーニングを行うことを当面の目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト心臓線維芽細胞を用いた検討

線維芽細胞はアンジオテンシン II やエンドセリン (ET)-1 の刺激によって細胞外マトリクス合成能が高く収縮性に富んだ筋線維芽細胞に形質転換することが報告されている (Ehanire, T., et al., *J Mol Med (Berl)* 2015, 93:289-302, Duangrat, R., et al., *Int J Mol Sci*, 2023 24: 10.3390/ijms24054475)。本研究では、I 型コラーゲンでコートしたプラスチックディッシュ上に播種したヒト心臓線維芽細胞をアンジオテンシン II (100 nM) で 24 時間処置した際に観察される筋線維芽マーカー遺伝子 *COL1A*, *POSTN*, *ACTA2*, および *CTGF* の発現増強を指標にして、ファイトケミカル等のインドール類縁体の効果について検討した。具体的には、アンジオテンシン II で刺激後に培養上清を除去しリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) で細胞を洗浄した。RNA 抽出用細胞溶解液 (セパゾール RNA I Super G, ナカライテスク) を加えて細胞を回収後、添付文書に従い total RNA を抽出した。その後、常法に従い cDNA を合成し、リアルタイム PCR に供した。

### (2) モノクロタリン誘発肺高血圧 (MCT-PH) ラットを用いた検討

4 週齢の Sprague-Dawley 系ラット (日本 SLC) を購入し、本学動物舎で 1 週間飼養し馴化させたのち、インドール類縁体溶液を充填した浸透圧ミニポンプ (2ML4, Alzet) を背部皮下に留置することでインドール類縁体の持続皮下投与を開始した。また、MCT (crostaline, Sigma) 60 mg/kg を単回皮下投与し、PH を誘導した。飼育・観察を続け、PH が十分成立される 3 週間

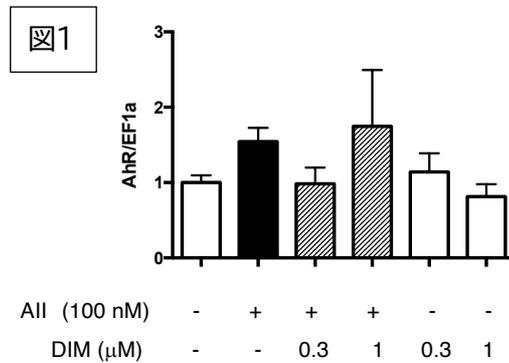
後に過量の麻酔薬により安楽死させ、心肺組織を摘出した。心臓は、右心室 (RV) と左心室および心室中隔 (LV+S) とに分割して重量を測定し、右心室湿重量を左心室および心室中隔湿重量で除した値 (RV/(LV+S)) を心肥大の指標とした。湿重量測定後、直ちに液体窒素で凍結して、炎症性サイトカイン等の発現変動を RT-PCR で検討するための試料とした。

#### 4. 研究成果

(1) アブラナ科野菜ファイトケミカル 3,3'-ジインドリルメタンのアンジオテンシン II 誘発心臓線維芽細胞活性化に対する効果

①ヒト心臓線維芽細胞におけるアリル炭化水素受容体 (AhR) 発現の有無の確認

まず始めに、アブラナ科野菜に含まれるインドール系ファイトケミカルのうち 3,3'-ジインドリルメタン (DIM) の効果について検討することとした。それに先駆け、DIM の受容体とされるアリル炭化水素受容体 (AhR) がヒト心臓線維芽細胞で発現しているか否かについて RT-PCR で確認した。右図に示すように、AhR は心臓線維芽細胞に発現していることが確認された (図 1)。その発現は、アンジオテンシン II (100 nM) 処置や DIM 処置により影響を受けないことが示唆された。



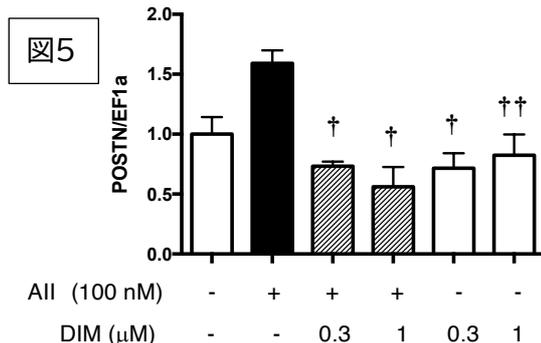
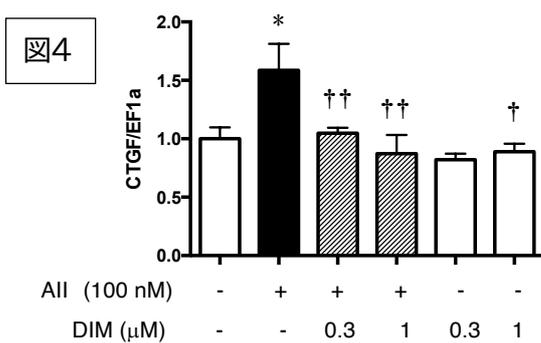
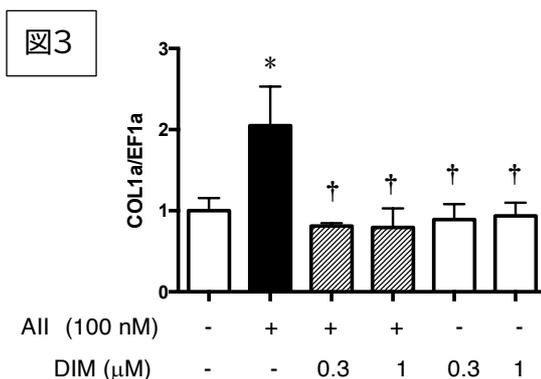
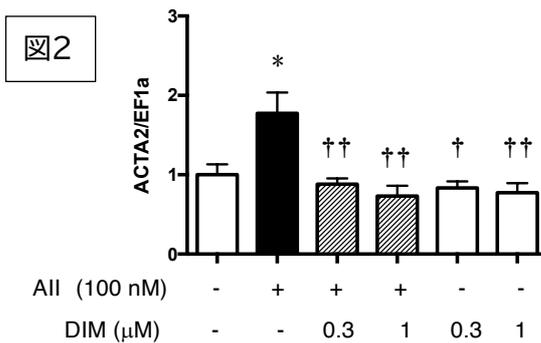
②アンジオテンシン II 誘発心臓線維芽細胞活性化に対する DIM の効果に関する検討

心臓線維芽細胞は、活性化して筋線維芽細胞へ形質転換すると、I 型コラーゲン (COL1A) 合成能が増強されるほか、平滑筋型アクチン (ACTA2)、結合組織増殖因子 (CTGF) やペリオスチン (POSTN) などを発現するようになる。アンジオテンシン II によって誘発されるこの筋線維芽細胞への形質転換に対して DIM が抑制効果を示すのか否かについて RT-PCR 法により検討した。なお、各遺伝子の発現量は elongation factor 1-alpha を内部標準に用いた  $\Delta\Delta Ct$  法にて検討した。

アンジオテンシン II (100 nM) で 24 時間刺激すると、ACTA2 発現が有意に増強されたが、その増強は DIM 0.3 および 1 μM の前処置によって抑制された (図 2)。COL1A および CTGF の発現も同様の挙動を示し、アンジオテンシン II 処置によって有意に増大したが、DIM の前処置によりそのような発現増強は消失した (図 2~4)。ペリオスチンはアンジオテンシン II 刺激により有意ではないものの発現の増強傾向が見られたが、DIM 前処置でそのような発現増大傾向は消失した (図 5)。なお、DIM 自体はこれらの遺伝子発現に影響を与えなかった (図 2~5)。

③モノクロタリン誘発肺高血圧ラット心肺組織における炎症性サイトカイン発現に対するインドール類縁体の効果に関する検討

研究協力者である中島が見出した抗炎症作用を有するインドール類縁体「化合物 A」が肺高血



圧症生命予後改善効果を示すか否かについて、モノクロタリン誘発肺高血圧症（MCT）ラットを用いて検討した。MCT-PH ラットでは、心肥大を示す RV/(LV+S) 値が有意に増大した。肺高血圧誘発と同時に化合物 A（1 mg/kg/day, sc.）の投与を開始した群（MCT+A）でも、RV/(LV+S) 値は同程度であり、化合物 A は右心室湿重量増大に対する抑制効果を示さなかった。

続いて、摘出右心室および肺組織における炎症性サイトカイン類の発現について RT-PCR 法にて検討した。MCT 群の右心室および肺組織では、IL-6 の発現量が有意に増大していたが、MCT+A 群では IL-6 の有意な増大は観察されなかった。予備的検討により、化合物 A が MCT-PH ラットの生命予後を有意に延長させる可能性が見出されている（未発表）。このことと本研究の成果とを考えると、化合物 A はその受容体を介する経路、あるいは受容体を介さない経路のいずれかにより IL-6 を始めとする炎症性サイトカイン産生を抑制することで、肺高血圧生命予後を改善すると推察される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sawa Yohei, Matsushita Naoko, Sato Sachiko, Ishida Nanae, Saito Maki, Sanbe Atsushi, Morino Yoshihiro, Taira Eiichi, Obara Mami, Hirose Masamichi	4. 巻 62
2. 論文標題 Chronic HDAC6 Activation Induces Atrial Fibrillation Through Atrial Electrical and Structural Remodeling in Transgenic Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 616 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Nanae, Saito Maki, Sato Sachiko, Tezuka Yu, Sanbe Atsushi, Taira Eiichi, Hirose Masamichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Mizagliflozin, a selective SGLT1 inhibitor, improves vascular cognitive impairment in a mouse model of small vessel disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/prp2.869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saito Maki, Ishida Nanae, Yamada Hidetoshi, Ibi Miho, Hirose Masamichi	4. 巻 43
2. 論文標題 8-HEPE-Concentrated Materials from Pacific Krill Improve Plasma Cholesterol Levels and Hepatic Steatosis in High Cholesterol Diet-Fed Low-Density Lipoprotein (LDL) Receptor-Deficient Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 919 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Nanae, Saito Maki, Sato Sachiko, Koepsell Hermann, Taira Eiichi, Hirose Masamichi	4. 巻 727
2. 論文標題 SGLT1 participates in the development of vascular cognitive impairment in a mouse model of small vessel disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 134929 ~ 134929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.134929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawa Yohei, Saito Maki, Ishida Nanae, Ibi Miho, Matsushita Naoko, Morino Yoshihiro, Taira Eiichi, Hirose Masamichi	4. 巻 142
2. 論文標題 Pretreatment with KGA-2727, a selective SGLT1 inhibitor, is protective against myocardial infarction-induced ventricular remodeling and heart failure in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 16 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita Naoko, Ishida Nanae, Ibi Miho, Saito Maki, Takahashi Masafumi, Taniguchi Shunichiro, Iwakura Yoichiro, Morino Yoshihiro, Taira Eiichi, Sawa Yohei, Hirose Masamichi	4. 巻 42
2. 論文標題 IL-1 Plays an Important Role in Pressure Overload-Induced Atrial Fibrillation in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 543 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石田 菜々絵、斉藤麻希、佐藤幸子、手塚優、三部篤、平英一、弘瀬雅教
2. 発表標題 慢性的脳虚血誘発認知障害に対する mizagliflozin の効果
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向井 諒一郎、木暮 恵吾、高橋 太志、斉藤 麻希、石田 菜々絵、弘瀬 雅教
2. 発表標題 アデニン誘発慢性腎臓病モデルマウス作製法の改良
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会 (仙台)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮藤麻希
2. 発表標題 Effects of 3,3'-diindolylmethane, a phytochemical in Brassica vegetables, on the activation of cardiac fibroblasts.
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------