

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：35307

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17658

研究課題名（和文）RAGEを標的とした肺高血圧症の新規バイオマーカー及び治療標的因子の探索

研究課題名（英文）Exploratory research on novel biomarker and therapeutic target for pulmonary hypertension with a focus on inflammation especially in RAGE

研究代表者

出石 恭久（Izushi, Yasuhisa）

就実大学・薬学部・講師

研究者番号：80791847

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：難治性疾患である慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）は、新たな視点に基づいたバイオマーカーや治療法の開発が急務である。本研究では、平均肺動脈圧による重症度が治療により顕著に改善したCTEPH患者の治療前後の血漿を用いて凝固線溶系や炎症時の生体反応を調節している高ヒスチジン糖タンパク質（HRG）と肺炎症で重要な終末糖化産物受容体の可溶性分子種（sRAGE）の量的変動を評価した。その結果、健常者と比べて重症度の高いCTEPH患者の血漿中のHRGは有意に低値を示し、sRAGEは有意に高値を示すこと、および治療後の重症度の改善によりこの両因子は健常者と同じレベルまで有意に改善する可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CTEPH患者の治療前の平均肺動脈圧を指標とする重症度が極めて高い状態と治療後の顕著な改善によって血漿中のHRGとsRAGEが有意に変動し、治療後は健常者と同じレベルに改善する可能性が見出された。従って、この両因子の重症度に応じた量的変動はCTEPHの肺動脈特異的な閉塞病変の病態にこれらの炎症関連分子が何らかの形で関与している可能性が考えられる。この研究成果を進展させ、CTEPHの病態形成におけるHRGとRAGEの役割を解明することは学術的意義があり、さらに臨床的指標との関係性を明らかにしていくことは今後のCTEPHの新たな治療戦略の基盤となる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH), an intractable disease, urgently requires the development of biomarkers and treatments based on new perspectives. In this study, pre- and post-treatment plasma from CTEPH patients whose severity of disease, as measured by mean pulmonary arterial pressure, improved markedly with treatment, was used to assess the quantitative variability. It was found that HRG was significantly lower and sRAGE was significantly higher in the plasma of patients with severe CTEPH than in healthy controls, and that both factors could be significantly improved to the same level as in healthy subjects owing to a marked improvement in the severity of the disease after treatment.

研究分野：薬物治療学、肺炎症、肺高血圧症、精神神経薬理学

キーワード：肺高血圧症 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 肺炎症 HRG sRAGE 平均肺動脈圧

## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症 (PH: pulmonary hypertension) は、肺動脈特異的な閉塞病変により肺動脈圧が上昇し、右心不全に至る難治性疾患である。その肺高血圧症の主要な原因疾患である慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH: chronic thromboembolic pulmonary hypertension) は、肺動脈内腔の器質化血栓による狭小化および閉塞を血管病変の特徴とする。CTEPH は、本邦の指定難病であり、症例数も増加の一途をたどっている。

既存の CTEPH 治療薬は 2 剤のみであり、治療抵抗性や副作用等により効果が限定的である。そのため、早期診断による積極的な治療の介入が、生命予後を改善する。しかし、特異的な自覚症状やバイオマーカーは存在せず、右心カテーテル検査等の侵襲的な検査を頻繁に行う事は困難である。そのため、早期診断が難しく治療介入まで時間を要する事も少なくない。こうした背景から、盛んに動物モデルを用いた研究が行われてきたが、CTEPH の病態を正確には再現できておらず、CTEPH 症例由来の検体を用いた研究や臨床試験の結果と異なる場合も多い。これらの現状を打破する為に、今までとは異なる視点から、CTEPH 症例の検体を用いた CTEPH 特異的なバイオマーカー及び治療標的因子の開発が社会的に急務である。

近年、CTEPH の病態形成に炎症が関与している事が示唆されているものの、未だ十分な研究がなされていない。そこで、本研究では PH 症例の血漿を用いて様々な凝固線溶系や免疫、炎症時の生体反応調節を行っている高ヒスチジン糖タンパク質 (HRG: histidine-rich glycoprotein) および健常な肺に高発現して炎症応答に関与している終末糖化産物の受容体 (RAGE: receptor for advanced glycation end-products) の可溶性分子種である (sRAGE: soluble form of RAGE) について、CTEPH の平均肺動脈圧 (mPAP: mean pulmonary arterial pressure) を指標とする重症度が高く、治療後に顕著な改善を示した症例における治療前後の量的変動について検討した。

## 2. 研究の目的

上記背景により、本研究では CTEPH 症例の血漿サンプル中の炎症応答に関与する分子である HRG と sRAGE に注目し、これらの分子が mPAP を指標とする CTEPH の重症度の変化によって量的変動を示すかを評価することで、CTEPH の病態に関連した分子であることを明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象者の選定

岡山医療センター循環器内科で 2011 年 2 月以降に本研究に同意頂いた PH 患者 486 名の中から、初診時の mPAP が 40mmHg 以上の重症例で当院で治療後の mPAP が 25mmHg 未満と顕著に改善した 408 名を抽出し、CTEPH 以外の病型や合併症等の除外基準に該当する 375 名を除外し、最終的に残った CTEPH 33 症例について、治療前後の血漿中の HRG と sRAGE を ELISA 法により測定した。さらに、対照として健常者 33 例についても同様に血漿中の HRG と sRAGE を測定した。

## (2) 血漿サンプルの回収

採血後 30 分間室温で静置し, 3,300rpm, 5 分, 室温で遠心し, 上清をサンプリングチューブに分取し, 実験に使用するまで-80°Cで保存した.

## (3) 臨床データの評価

CTEPH の背景因子と臨床病態の指標として, 年齢, 性別, 併存疾患の他, 血漿サンプル回収時の mPAP, 心係数, 心血管抵抗, BNP, 心機能の NYHA 分類, 体重, 心拍数, 肺拡散能, 肺拡散能/肺泡気量, 6 分間歩行距離等の検査値について評価した.

## (4) 血漿中の HRG の定量

血漿中の HRG は ELISA 法により定量した. 先ず, HRG に特異的な抗体がコートされた 96 ウエルプレートに, ブランク, 検量線, および 1,000 倍希釈した健常者と CTEPH 症例の血漿サンプルを添加し反応させた. 洗浄後に, ビオチン化抗ヒト HRG 抗体を添加して再度洗浄した. 次に HRP 標識ストレプトアビジンを添加し, 洗浄後に MB 基質溶液を加えて反応させ, 反応停止液を添加後に 450 nm の吸収度を測定した.

## (5) 血漿中の sRAGE の定量

血漿中の sRAGE も ELISA 法によって定量した. 先ず, sRAGE に特異的な抗体がコートされた 96 ウエルプレートに, ブランク, 検量線, ポジティブコントロール, ネガティブコントロール, および 3 倍希釈した健常者と CTEPH 症例の血漿サンプルをウェルに添加して反応させた. 洗浄後にビオチン化抗ヒト sRAGE 抗体を添加し, 再度洗浄して HRP 標識ストレプトアビジンを添加して反応させた. 最後に, 洗浄後に TMB 基質溶液を加えて反応させ, 反応停止液を添加後に 450 nm の吸光度を測定した.

## 4. 研究成果

血漿中の HRG および sRAGE と CTEPH との関係性を解析する上で, 健常者における HRG および sRAGE の年齢および性差による影響の有無を確認した. その結果, HRG は年齢と有意な正の相関を示したことから, HRG の解析は全例解析に加えて傾向スコアマッチング法を用いて年齢によるバイアスを調整した解析を行った. 一方, sRAGE は年齢および性別と統計学的に有意な関係性が認められなかったため全例で解析を行った.

先ず, CTEPH 症例の重症度と HRG の関係性について評価を行った. その結果, 治療前の重症度の高い CTEPH 症例では HRG は健常者と比較して有意差は認めなかったものの, 傾向スコアマッチング法による年齢のバイアスを調整した解析では, CTEPH 症例で有意な低値を示した. さらに, CTEPH 症例の治療前に対する治療後の血漿中の HRG は有意な上昇を示した. CTEPH 症例の治療後は健常者に対し有意に高値を示したが, 傾向スコアマッチング法による年齢のバイアスを調整した解析では有意な変化は認められなかった.

次に, sRAGE における CTEPH 症例と健常者の量的変動について評価を行った. その結果, 治療前の CTEPH 症例の血漿中の sRAGE は健常者よりも有意に高値を示した. さらに, CTEPH 症例の sRAGE は治療前に対し治療後で有意に低下し, 治療後の CTEPH 症例と健常者との間には有意差は認められなかった.

一方, mPAP 等 CTEPH の重症度や病状に関係する各種臨床検査データと HRG および sRAGE の臨床上有用と考えられる相関性については認められなかった. 今後, CTEPH 症例の重症度に

対する臨床的指標の可能性をより具体的に検討するために、症例数を増やして様々な重症度の CTEPH 症例や個々の CTEPH 症例の mPAP 等の臨床検査データの経時的変化とこれらの因子の相関性について評価する必要がある。

以上の事から、本研究では mPAP を指標とする重症度の高い CTEPH 患者は、健常者と比較して血漿中の HRG は低値を示し sRAGE は高値を示すこと、さらに CTEPH 治療後の顕著な mPAP の改善により血漿中の両因子とも健常者と同じレベルになる可能性を見出した。特に HRG の CTEPH 症例の重症度の変化に対する量的変動は、本研究で初めて得られた研究成果であり、現在論文投稿準備中である。

今後、HRG と sRAGE を中心とした炎症が CTEPH の病態形成にどのように関与しているかを解明することが期待される。さらに、HRG と sRAGE は重症度の高い CTEPH の治療により変動する血漿中の分子である可能性が示唆されたものの、CTEPH 症例の重症度の変化に伴う呼吸機能の変化など CTEPH の病態形成や重症度以外の要因との関係性についても今後さらに検討していく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morii Chiharu, Tanaka Hiroyoshi Y, Izushi Yasuhisa, Nakao Natsumi, Yamamoto Masaya, Matsubara Hiromi, Kano Mitsunobu R., Ogawa Aiko	4. 巻 8
2. 論文標題 3D in vitro Model of Vascular Medial Thickening in Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2020.00482	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 出石恭久, 木山和子, 小川愛子, 北村佳久, 松原広己
2. 発表標題 慢性血栓栓性肺高血圧症におけるhistidine-rich glycoprotein およびsoluble receptor for advanced glycation end-productsの量的変動
3. 学会等名 第144回日本薬理学会 近畿部会
4. 発表年 2024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
研究協力者	小川 愛子  (Ogawa Aiko)		
研究協力者	松原 広己  (Matsubara Hiromi)		
研究協力者	木山 和子  (Kiyama Kazuko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	北村 佳久  (Kitamura Yoshihisa)		
研究協力者	西堀 正洋  (Nishibori Masahiro)		

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