

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590123

研究課題名(和文) 循環調節ペプチドネットワークへの新たな介入戦略の検証とその肺高血圧治療への応用

研究課題名(英文) Investigation on vasoactive peptide inhibition and its application to pulmonary hypertension

研究代表者

江本 憲昭 (Emoto, Noriaki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30294218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエンドセリン変換酵素(ECE)が循環ペプチド系の機能調節に関与するか否かを、病態モデルを用いて検討した。低酸素誘発性肺高血圧マウスモデルおよびブレオマイシン誘発性肺線維症モデルにおいて、野生型マウスと比較して、ECE遺伝子欠損マウスが病態発症を抑制したこと、またその分子メカニズムとして前者ではブラジキニン系、後者ではCGRP系の賦活化が重要であることを明らかにした。以上の結果、ECE阻害が肺高血圧症および肺線維症の発症を抑制することが期待され、ECE阻害薬が新たな治療手段となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the possibilities that endothelin-converting enzyme (ECE) is involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis through other vasoactive peptides in addition to endothelin by using genetically modified mice. We have demonstrated that ECE heterozygous mice were resistant to develop hypoxia-induced pulmonary hypertension by upregulating bradykinin system. We also showed that ECE heterozygous mice were resistant to induce bleomycin-induced pulmonary fibrosis by potentiating CGRP pathway. These results suggest that ECE plays an important role to the pathogenesis of pulmonary hypertension and pulmonary fibrosis, and that ECE may be a plausible target for the therapeutic intervention to these disorders.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・薬理学

キーワード：エンドセリン エンドセリン変換酵素 ブラジキニン 肺高血圧症 肺線維症

### 1. 研究開始当初の背景

循環調節機能は多くの循環調節ペプチド系が密接に関連し、相互に調節し合っており、その調節機能の異常が様々な疾病の成因に深く関与している。エンドセリン (ET) 系、ブラジキニン (BK) 系、利尿ペプチド (NP) 系、レニン・アンジオテンシン (RAS) 系などがその代表であり、これらの系を制御する薬剤が臨床応用され心血管疾患の症状や予後の改善に貢献している。

私たちは、エンドセリン系に関して臨床応用を目指した基礎研究に従事してきた。私たちは、エンドセリン系の活性化酵素であるエンドセリン変換酵素 (ECE) の精製に世界に先駆けて成功し、2種類の ECE 遺伝子を単離・同定した。以後、ECE の神経堤細胞発生における役割解明、ECE の生化学的特性の解析、各種病態モデルを用いた前臨床研究と成果を積み重ね、世界をリードする知見を発信してきた。

現在、エンドセリン受容体拮抗薬は難治性疾患である肺高血圧症に対して承認され、めざましい臨床効果をあげている。それに対して、ET 系のもう一方の治療標的である ECE 阻害薬に関しては開発が遅れており、未だ臨床応用には至っていない。その理由のひとつとして、ECE が ET 系の活性化以外に生体内でどのような酵素活性を示すのかが不明であることがあげられる。

上記の課題に対して私たちは ECE の遺伝子欠損マウスを作製し、生体で ECE の基質特異性を解析するというアプローチをとった。その結果、ECE 阻害が心不全モデルで心保護作用を示すことおよび糖尿病下肢虚血モデルにおいて血流増加作用を示すこと (論文投稿中) を見いだした。これらの循環病態改善効果は ET 系の抑制に加えて、心房性利尿ペプチド (ANP) -cGMP-PKG 経路を介していることを薬理的に証明した。すなわち ECE 阻害により ET 系および NP 系を同時に制御できる可能性を示すことができた。この知見をさらに発展させ、ECE 阻害によって循環調節ペプチド系を包括的に制御することを新たな心血管疾患の治療戦略とするという本研究案の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では「病態モデルにおいて ECE 阻害が ET 系のみならず、NP 系、BK 系、RAS 系などの複数の循環調節ペプチド系を同時に制御することにより病態改善効果を示す」という私たちの仮説を肺高血圧症および肺線維症をモデルとして検証することを目的とするものである。

### 3. 研究の方法

1) ECE 遺伝子欠損マウスにおける低酸素誘導性肺高血圧症モデルの表現型の解析

マウスを 10% 低酸素環境下に 3 週間暴露することにより肺高血圧モデルを作成する。私たちは予備実験として ECE 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体 (ECE-1+/-) では、野生型マウスと比較して、肺動脈圧の上昇が有意に抑制されていることを観血的圧測定法にて確認した。そこで、表現型をさらに詳細に解析することによって、ECE-1 の低下が肺高血圧症に抵抗性を示す分子メカニズムの解明を目指す。

肺組織における血管のリモデリングを HE 染色にて解析し、肺高血圧症の特徴的病理像である内膜増殖、中膜肥厚、外膜線維化をスコア化し、野生型マウスと ECE-1+/- マウスで比較する。

さらに右室重量測定および右室心筋の病理組織像で心筋の肥大を定量化し、野生型マウスと ECE-1+/- マウスとで比較する。

2) ECE 遺伝子欠損マウスにおけるプレオマイシンによる肺線維症モデルの表現型の解析

マウスにプレオマイシンを気管内投与し、肺線維症モデルを作成する。1 週間後および 2 週間後の炎症所見ならびに線維化所見を、HE 染色、マッソントリクローム染色を用いて評価する。低酸素誘導性肺高血圧症モデルと同様の手法で血行動態ならびに右室重量測定および右室心筋の病理組織像で心筋の肥大を定量化し、野生型マウスと ECE-1+/- マウスとで比較する。

3) 循環調節ペプチドのプロファイルの解析

ECE-1+/- マウスにおいて、疾患発症状態で生体内の循環調節ペプチドを定量することにより ECE-1 による循環調節ペプチドの代謝を調べる。

具体的には肺組織および血清中からペプチドを C18 カラムを用いて抽出する。各系の循環調節ペプチドを ELISA キットを用いて定量し、野生型マウスおよび ECE-1+/- マウスで正常状態および肺高血圧状態で比較する。測定するペプチドは、big ET-1, ET-1, BK, ANP, BNP, CNP, Ang I, Ang II, Ang-(1-7) である。さらに、特異的な抗体を用いて免疫染色することにより、循環調節ペプチドの局在を明らかにすることで ELISA のデータを補完する。

4) 各種阻害薬を用いた検証実験

各循環調節ペプチド系に対する特異的な受容体拮抗薬や阻害薬を用いて ECE 阻害による表現型はどの系によって影響を受けているのかを生体で検証する。具体的には、BK2 受容体拮抗薬 (HOE140)、NP 系下流シグナルの PKG 阻害薬 (DT-3)、Ang-(1-7) 受容体拮抗薬 (A-779) をマウスに投与し、肺高血圧に関する影響を、野生型マウスおよび ECE-1+/- マウスの血行動態および病理組織像で検討する。同時に ET 受容体拮抗薬 (BQ123 および BQ788) との治療効果もあわせて比較する。

#### 4. 研究成果

低酸素誘発性肺高血圧マウスモデルにおいて、ECE-1<sup>+/-</sup>マウスは野生型マウスと比較して、低酸素に伴う肺高血圧症の発症が抑制されたことを血行動態および組織学的変化から確認した。その分子メカニズムは、ET系の抑制ではなく、BK系の賦活化であることをペプチドレベルおよびBK受容体阻害薬を用いた実験系で証明した。

プレオマイシン誘発性肺線維症モデルにおいて、野生型マウスと比較して、ECE-1<sup>+/-</sup>マウスが線維化の進展を抑制したことを確認した。その機序としては、ECEの欠損により炎症が抑制され、その結果として線維化が抑制されることが示唆された。その分子メカニズムとしてはET系の抑制とともにCGRP系の賦活化が関与していることを示した。

すなわちECE阻害はエンドセリン系を抑制すると同時にBK系やCGRP系の賦活化により、エンドセリン受容体拮抗薬を上回る臓器保護を示す可能性が示唆された。

以上の結果、ECE阻害が肺高血圧症および肺線維症の発症を抑制することが期待され、ECE阻害薬が新たな治療手段となることが期待された。

#### 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)

[雑誌論文](計8件)

1. Van Hung T, Emoto N, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Suzuki Y, Hirata KI. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor under hypoxia causes severe, human-like pulmonary arterial hypertension in mice: Potential roles of interleukin-6 and endothelin. *Life Sci.* (2014) in press
2. Heiden S, Vignon-Zellweger N, Masuda S, Yagi K, Nakayama K, Yanagisawa M, Emoto N. Vascular endothelium derived endothelin-1 is required for normal heart function after chronic pressure overload in mice. *PLOS ONE* (2014) in press
3. Taniguchi Y, Emoto N, Miyagawa K, Nakayama K, Kinutani H, Tanaka H, Shinke T, Hirata, K. Non-invasive and Simple Assessment of Cardiac Output and Pulmonary Vascular Resistance with Whole-body Impedance Cardiography is Useful for Monitoring Patients with Pulmonary Hypertension. *Circ J.* (2013) in press
4. Hartopo AB, Emoto N, Vignon-Zellweger N, Suzuki Y, Yagi K, Nakayama K, Hirata KI. Endothelin-converting

enzyme-1 gene ablation attenuates pulmonary fibrosis via CGRP-cAMP/EPAC1 pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2013) 48, 465-476

5. Arfian N, Emoto N, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Hirata KI. ET-1 deletion from endothelial cells protects the kidney during the extension phase of ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* (2012) 425, 443-449
6. Nakayama K, Emoto E, Suzuki Y, Vignon-Zellweger N, Yagi K, Hirata KI. Physiological relevance of hydrolysis of atrial natriuretic peptide by endothelin-converting enzyme-1. *Kobe J. Med. Sci.* (2012) 58, E12-18
7. Vignon-Zellweger N, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N. Molecular Biology of Endothelin-1 in the Renal and Cardiovascular Systems. *Life Sci.* (2012) 91, 490-500
8. Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N. ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci.* (2012) 91, 651-657

[学会発表](計9件)

1. Bradykinin Attenuated Hypoxia Induced Pulmonary Arterial Hypertension through Bradykinin 2 Receptor. Suzuki Y, Raharjo SB, Nakayama K, Yagi K, Miyagawa K, Satwiko MG, Muliawan HS, Emoto N, The 7th Asian Pacific Congress of Heart Failure. 2014 106.
2. Fulton's Index was Considerably Higher in Endothelin-1 Transgenic Mice Compared to Their Littermates in Hypoxic Induced Pulmonary Arterial Hypertension but not Significantly between Gender. Satwiko MG, Nakayama K, Yagi K, Miyagawa K, Suzuki Y, Muliawan HS, Hirata KI, Emoto N, The 7th Asian Pacific Congress of Heart Failure. 2014
3. Endothelin converting enzyme inhibition attenuates early albuminuria and late renal failure in streptozotocin induced diabetic mice. Nakayama K, Vignon-Zellweger N, Heiden S, Suzuki Y, Okano T, Miyagawa K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N, ET-13: The 13th International

- Conference on Endothelin, 2013
4. Role of Bradykinin and Endothelin-Converting Enzyme-1 in Pulmonary Hypertension. Raharjo SB, Emoto N, Yuniadi Y, Nakayama K, Harimurti GM, ET-13: The 13th International Conference on Endothelin, 2013
  5. Endothelial cell-derived Endothelin-1 Knock-out Preserves Cortex Architecture after Ischemic-reperfusion Episode in Mice. Arfian N, Yagi K, Nakayama K, Ali H, Mayasari DS, Purnomo E, Emoto N, 49th Congress of the European-Renal-Association/European-Dialysis-and-Transplant-Association (ERA-EDTA), 2012
  6. Deletion of Endothelin-1 from Endothelial Cell In vivo and ETAR Blocking In vitro Attenuate Fibrosis and Myofibroblast Formation. Arfian N, Emoto N, Yagi K, Nakayama K, Ali H, Hartopo AB, Nugrahaningsih DA, Yanagisawa M, Hirata KI, 49th Congress of the European-Renal-Association/European-Dialysis-and-Transplant-Association (ERA-EDTA), 2012
  7. Potentiating bradykinin pathway by genetic suppression of endothelin-converting enzyme-1 prevented hypoxic induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. Suzuki Y, Raharjo SB, Nakayama K, Vignon-Zellweger N, Heiden S, Arfian N, Hartopo AB, Yagi K, Emoto N, ET-12: The 12th International Conference on Endothelin, 2011
  8. Endothelin converting enzyme-1 genetic inhibition prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Hartopo AB, Arfian N, Nugrahaningsih DAA, Vignon-Zellweger N, Heiden S, Nakayama N, Yagi Y, Hirata KI, Emoto N, ET-12: The 12th International Conference on Endothelin, 2011
  9. Role of endothelin-converting enzyme-1 inhibition in pulmonary vein remodeling during development of secondary pulmonary hypertension. Hartopo AB, Emoto N, Yagi K, Nakayama K, Anggraeni VY, Ali H, Arfian N, Mayasari DS, Nugrahaningsih DAA, Purnomo E, Hirata KI, 18th Congress of Asia Pacific Society of Cardiology, 2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~clinical/publications/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江本憲昭 (Emoto Noriaki)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30294218