

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591104

研究課題名(和文)肺高血圧症におけるプロテイナーゼ活性化型受容体の役割解明と治療応用

研究課題名(英文)Elucidation of roles of proteinase-activated receptor in pulmonary hypertension and development of new therapeutic strategies

研究代表者

平野 勝也(Hirano, Katsuya)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80291516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧発症初期に重要な役割を果たす内皮バリアー機能障害のメカニズムについて新知見を得た。また、肺高血圧モデル動物実験より、トロンビン受容体拮抗薬の病態改善および生存率改善効果が明らかとなった。トロンビンに対する肺動脈の収縮反応性が、肺高血圧において亢進することを明らかにした。本研究成果に基づいて、新たな肺高血圧治療法の発明として国内および国際特許を出願した。

研究成果の概要(英文)：The present study yielded a new mechanism for endothelial barrier dysfunction. By using an animal model of pulmonary hypertension, a thrombin receptor antagonist was found to effectively prevent the development of pulmonary hypertension and prolonged the survival. The contractile responsiveness of pulmonary artery was found to be enhanced in pulmonary hypertension. As a result, thrombin receptor antagonist is suggested to be potentially useful as a new strategy for treatment of pulmonary hypertension. Proposals of Japanese and international patent for the invention of new treatment for pulmonary hypertension has been submitted.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：肺高血圧 血管内皮細胞 血管平滑筋細胞 トロンビン 受容体 モデル動物 受容体拮抗薬

## 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は安静時平均肺動脈圧>25 mmHg で定義される疾患群である。肺高血圧の発症や病態には、内皮異常、血小板由来セロトニン、炎症、低酸素、酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常の関与が示唆されている。近年、プロスタサイクリン、エンドセリン受容体拮抗薬、NO 吸入、PDE 阻害剤を主体に、様々な薬物療法が試みられているにも関わらず、平均生存期間は未だ 2.8 年に留まる。従来の薬物にはない作用機序を有する治療法の開発が急務であり、突破口を開くためには新たな視点からの病態解明が必要である。

肺高血圧症の 3 大病理所見は、①血管収縮、②血管リモデリング、③血栓形成である。血栓は約 70% の症例に認められ、抗凝固療法による予後改善が報告されている (N Engl J Med. 1992)。従って、血栓は病態形成に積極的に関与することが示唆されるが、未だ不明な点が多い。

トロンビン受容体 PAR1 を含め、計 4 種類のプロテイナーゼ活性化型受容体 (PAR1~4) が、血栓の血管作用を担う重要な分子として同定されている (Cell 1991; Nature 2000)。トロンビン受容体には、平滑筋収縮作用のみならず、増殖、細胞外基質産生、活性酸素産生など血管リモデリングに関連する作用、血管透過性亢進作用も報告されている。また、トロンビン受容体は血小板活性化も引き起こす。従って、肺高血圧の病態 (血管収縮、血管リモデリング、血栓形成) にトロンビン受容体が重要な役割を果たすことが示唆される。

これまでの独自の研究より、トロンビンに対する肺動脈の反応特性を明らかにしていた。すなわち、体循環系正常動脈の多くがトロンビンに対して収縮反応を示さないのに対し、肺動脈は正常でもトロンビンに対する反応性を有し、収縮を引き起こすことを見出した (Br J Pharmacol 2010)。さらに、この収縮には、Ca<sup>2+</sup>非依存性、活性酸素及び Rho キナーゼ依存性の特殊な収縮機構が関与することを明らかにした (Am J Respir Crit Care Med 2010)。肺高血圧症では Rho キナーゼ活性や酸化ストレスの亢進が報告されており、血栓を合併した高血圧症においては、トロンビン受容体は血管収縮やリモデリングを促進し、肺高血圧の病態形成に積極的に関与することが推察される。

さらに、体循環系の血管病態学研究より、平滑筋 PARs の発現亢進がバルーン血管傷害やくも膜下出血などの病態形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。しかし、発現亢進のメカニズムは病態によって異なり、酸化ストレス、炎症、トロンビンが発現誘導に関わることも明らかにしていた。肺高血圧においてもトロンビン受容体の発現が亢進し、病態形成をさらに促進する可能性が考え

られた。また、くも膜下出血後血管攣縮に対して、新規トロンビン受容体拮抗薬を用いた治療法開発に実績がある。

肺高血圧の病態解明に当たっては、適切なモデル動物の使用が重要な因子となる。現在汎用されているモデルでは肺高血圧患者に認められる進行した病理像 (求心性内膜過形成、plexiform 病変) を再現出来な問題点がある。既に、進行した病理像も含め、肺高血圧患者で観察される病理像すべてを再現する初めてのモデル動物 SHN モデルの開発に成功した。このモデルを用いたヒト肺高血圧におけるトロンビン受容体の役割を明らかにする。

## 2. 研究の目的

1. 肺高血圧モデル動物を用いて肺高血圧における PARs の役割を明らかにする。特に、トロンビン受容体 PAR1 を中心に研究を進め、さらに、PAR1 拮抗薬を用いた新たな治療法の有効性を検証する。
  - ① 病態におけるトロンビンの収縮特性を明らかにする。
  - ② PARs の発現変化 (発現亢進) を明らかにし、重症度やリモデリング像 (内膜新生、中膜肥厚、外膜線維化、plexiform 病変) との関連を明らかにする。
  - ③ 肺高血圧の病態における肺動脈のトロンビンに対する反応性の変化を、摘出肺動脈あるいは摘出心肺標本を用いて、明らかにする。
  - ④ トロンビン受容体拮抗薬の治療効果を検証する。
2. 肺動脈血管透過性に及ぼすトロンビンの作用とその機序を明らかにする。
3. PARs ノックアウトマウスを用いてモデルを作製し、病態形成における PARs の役割を明らかにする。
4. 肺高血圧患者剖検例の病理解析を行い、PARs の発現変化、受容体の発現と重症度や病理像との相関を明らかにする。これにより、ヒト肺高血圧における PARs の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1. 肺高血圧モデル動物の作成  
雄 SD ラット (体重 200g) にモノクロタリン (60 mg/kg) を単回皮下投与し、肺高血圧モデルを作製した。
2. 摘出心肺標本を用いた灌流実験
3. 培養内皮細胞を用いた血管透過性の評価

## 4. 研究成果

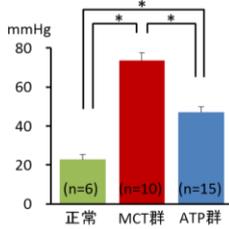
- (1) モノクロタリン誘発肺高血圧モデル動物を用いて、肺高血圧の病態形成における

PAR1 の関与を明らかにした。

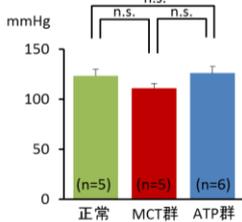
モノクロタリン投与日から PAR1 拮抗薬 atopaxar (30 mg/kg/day; ATP 群)、あるいは溶媒 (MCT 群) の経口投与を開始し、21 日間の投与後肺高血圧症の病態を評価した。

右室収縮期圧は、正常群 (23±3 mmHg; n=6) に比べ MCT 群 (74±4 mmHg; n=10) で著明に上昇したが、ATP 群 (47±3 mmHg; n=15) ではその上昇が有意に抑制された。平均体血圧および心拍出量には 3 群間に有意差はなかった。

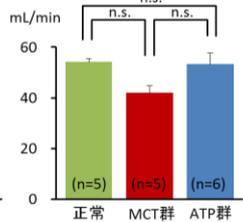
右室収縮期圧



平均体血圧



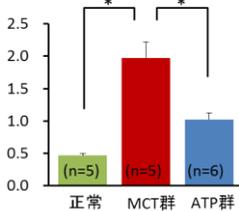
心拍出量



総肺血管抵抗 (右室収縮期圧/心拍出量比) は正常群(0.462 mmHg · min/mL; n=5)と比較して MCT 群(1.973 mmHg · min/mL; n=5)で上昇がみられたが、ATP 群(1.023 mmHg · min/mL; n=6)では有意に抑制された。右室肥大 (右室重量/中隔と左室の重量比) も正常群(0.259; n=6)と比較して MCT 群(0.43±0.03; n=11)で上昇したが、ATP 群(0.31±0.02, n=15, p<0.05)で有意に抑制された。

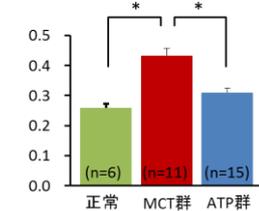
総肺血管抵抗

(calculated as RVSP/CO)



右室肥大

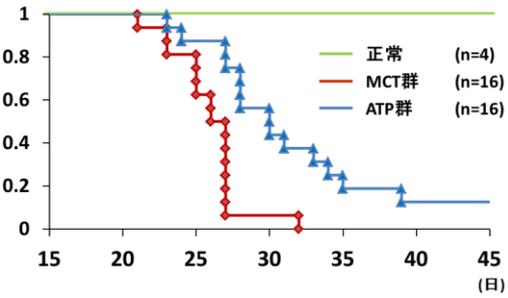
= RV/(LV + Septum)



肺動脈中膜肥厚の程度 (中膜面積/外弾性板内面積比) も正常群(0.228; n=3)と比較して MCT 群(0.555; n=3)で上昇し、ATP 群(0.445; n=3)で有意に抑制された。

(2) モノクロタリン誘発肺高血圧モデル動物において、PAR1 拮抗薬には、上述の通り病態改善作用に加えて、生存率改善効果が観察された(各群 n=16)。新たな肺高血圧治療薬としての有用性が明らかとなった。

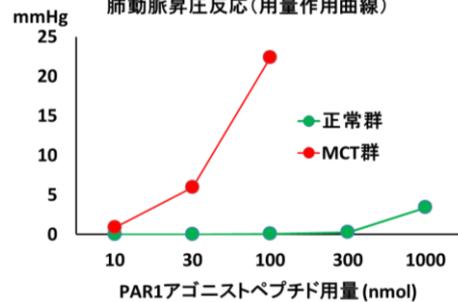
生存率



(3) 摘出心肺標本の還流実験を行い、肺高血圧モデルにおいてトロンビンに対する収縮反応性が亢進することを見出した。

正常ラットの心肺摘出標本に、PAR1 のペプチドアゴニスト TFLLR を投与すると、300 nmol 以上の用量で肺動脈圧上昇が観察された。一方、モノクロタリン皮下投与 21 日目の肺高血圧ラットの心肺標本では、10 nmol のより低用量から圧上昇反応が観察され、100 nmol でほぼ最大反応が得られた。

PAR1アゴニストペプチド投与による肺動脈昇圧反応(用量作用曲線)



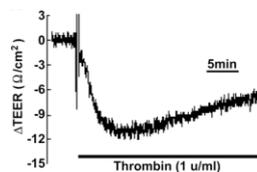
(4) 血管透過性亢進の新たな仕組みを明らかにした。

内皮透過性亢進は肺高血圧の病態形成の初期に重要な役割を果たす。トロンビンは内皮透過性を亢進することが報告されている。

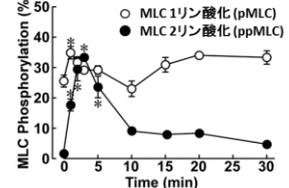
ブタ大動脈 (PAEC) および肺動脈 (PPAEC) 内皮細胞を用いてトロンビンが引き起こす透過性亢進機序の詳細を明らかにした。

経内皮細胞電気抵抗測定を行い、PAEC において、トロンビンは、PAR1 を介して、刺激 3~5 分に最大に達する透過性亢進 (電気抵抗低下) 反応を引き起こした。この透過性亢進と一致して、ミオシン軽鎖 (MLC) の 2 リン酸化反応が生じることを明らかにした。

経内皮電気抵抗測定



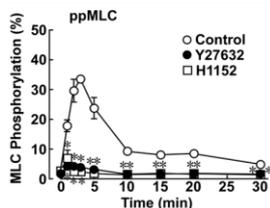
ミオシン軽鎖 (MLC) リン酸化



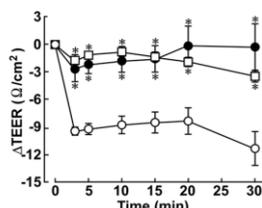
この MLC の 2 リン酸化反応と電気抵抗の低下は Rho キナーゼ阻害剤により阻害され

た。このことから、MLC2 リン酸化と透過性亢進の相関が示唆される。

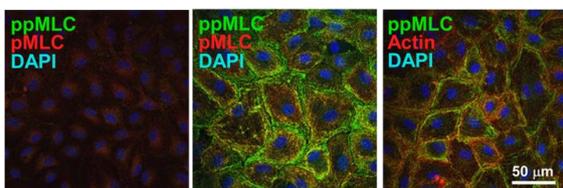
ミオシン軽鎖 (MLC) リン酸化



経内皮電気抵抗測定



トロンビン刺激前、MLC の 1 リン酸化は細胞質に均一に分布し (左図)、刺激 3 分後も同様の局在を示した (中図)。MLC2 リン酸化は、刺激前にはほとんど観察されず、刺激後に細胞辺縁部の局在が観察された。同部位にはアクチン線維束形成が観察された (右図)。これまでトロンビン刺激により形成されると報告されていたストレスファイバーは刺激 3 分では観察されなかった。

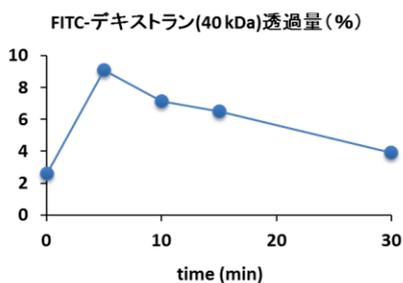


トロンビン刺激後のアクチン線維束形成を時間経過で観察すると、刺激 15 分以降にはストレスファイバー形成が観察された。

以上の結果から、内皮透過性亢進の機序に関して以下の新しい考え方が提唱された。

- ① 内皮細胞において、pMLC と ppMLC は異なる制御を受ける。
- ② トロンビン刺激早期には、Rho kinase 依存性に MLC の 2 リン酸化とそれに依存するアクチン線維束形成が細胞膜直下に生じ、その結果求心性に内皮細胞が収縮することで、細胞間隙が開裂し、透過性が亢進する。
- ③ 一旦、細胞間接着が障害されると、アクチン線維はストレスファイバー状に再編成され、後期の透過性亢進の維持に関わる。

PPAEC においてもトロンビンにより透過性亢進が起こることを、FITC 標識デキストランの透過性評価で観察した。



## 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 4 件)

1. Kunita-Takanezawa M, Abe K, Hirooka Y, Kuwabara Y, Hirano K, Oka M, Sunagawa K. Novel dual endothelin receptor antagonist macitentan reverses severe pulmonary arterial hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* (in press)
2. 平野勝也. トロンビン受容体拮抗薬. *日本薬理学雑誌* 138 (6): 258-259, 2011
3. 平野勝也、渡邊裕司. 肺高血圧症の薬物治療の最前線: 序文. *日本薬理学雑誌* 143 (4): 163-164, 2014
4. 平野勝也. プロテイナーゼ活性化型受容体を標的とした肺高血圧治療の可能性. *日本薬理学雑誌* 163 (4): 182-186, 2014

[学会発表] (計 27 件)

【特別講演/招待講演/シンポジウム】

1. 平野勝也. 肺高血圧症におけるトロンビン受容体の役割と新たな治療標的としての可能性. PH サミット 2012 シンポジウム「CTEPH の病因・診断・治療」July 28, 2012、岡山
2. Hirano K, Abe K. Potential of Thrombin Receptor as a New Therapeutic Target for Treatment of Pulmonary Hypertension. 第 29 回国際心臓研究学会日本部会総会 Oct 26, 2012、福岡
3. 平野勝也. くも膜下出血後脳血管攣縮におけるプロテイナーゼ活性化型受容体 1 の役割. 第 29 回スパズムシンポジウム、特別講演, March 21, 2013、東京
4. Hirano K. A new strategy for treatment of pulmonary hypertension with thrombin receptor as a therapeutic target. 第 86 回日本薬理学会年会シンポジウムオーガナイザー: 平野勝也、渡邊裕司, March 23, 2013、福岡

【国際会議: 一般演題】

5. Hirano M, Hanada A, Hirano K. Ca<sup>2+</sup>-independent di-phosphorylation of myosin light chain by Rho-associated coiled-coil protein kinase (ROCK) in the subjunctional regions of cell-cell contact mediates thrombin-induced barrier dysfunction in vascular endothelial cells. American Heart Association, Scientific Sessions 2011. November 13, 2011,

- Orlando, FL, USA  
Circulation 124 (21): A9614, 2011
6. Hirano M, Hanada A, Hirano K.  
Rho kinase-mediated di-phosphorylation of myosin light chain in the sub-membranous regions and circumferential actomyosin contraction mediate thrombin-induced barrier disruption in vascular endothelial cells.  
American Heart Association, International Stroke Conference 2013 February 6, 2013, Honolulu, HI, USA  
Stroke 44 (2): AWP438, 2013
  7. Kunita M, Abe K, Hirooka Y, Hirano K, Sunagawa K.  
A new endothelin receptor antagonist macitentan prevents endothelin-1-induced contraction in intrapulmonary arteries in rats with severe pulmonary arterial hypertension.  
35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society  
July 5, 2013, Osaka, Japan
  8. Hirano M, Hirano K.  
Myosin light chain di-phosphorylation at sub-membranous region plays a critical role during thrombin-induced barrier disruption in vascular endothelial cells.  
International Symposium on Regulatory Circuits in Cell Motility, honoring Dave Hartshorne. October 10-11, 2013, Philadelphia, PA, USA
  9. Kunita M, Abe K, Hirooka Y, Kuwabara Y, Hirano K, Oka M, Sunagawa K.  
A novel endothelin receptor antagonist, macitentan markedly improved severe pulmonary arterial hypertension in rats by a nearly complete blockade of endothelin receptors.  
American Heart Association Scientific Session, 2013  
November 17, 2013, Dallas, TX, USA  
Circulation 128: A11237, 2013
  10. Kuwabara Y, Abe K, Hirano M, Hirooka Y, Sunagawa K, Hirano K.  
Crucial role of proteinase-activated receptor 1 in the development of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats.  
American Heart Association Scientific Session, 2013  
November 18, 2013, Dallas, TX, USA  
Circulation 128: A16487, 2013
  11. Hirano M, Hirano K.  
Di-phosphorylation of myosin light chain and actin fiber formation in the submembranous region at inter-endothelial junction play a crucial role in thrombin-induced endothelial barrier disruption.  
American Heart Association Scientific Session, 2013  
November 18, 2013, Dallas, TX, USA  
Circulation 128: A12861, 2013
  12. 平野勝也, 平野真弓, 花田亜希子:  
トロンピンが引き起こす内皮透過性亢進には細胞膜直下におけるミオシン軽鎖の2リン酸化が重要な役割を果たす  
第64回日本薬理学会西南部会、2011年11月20日、福岡  
日本薬理学雑誌 139 (3): 38P, 2011
  13. Hirano M, Hanada A, Hirano K.  
Rho kinase-mediated di-phosphorylation of myosin light chain in the subjunctional regions plays a critical role in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction.  
第85回日本薬理学会、2012年3月14日-16日、京都  
J Pharmacol Sci 118 (Suppl 1): 245P, 2012
  14. Hirano K, Hirano M.  
Contribution of Rho-kinase and oxidative stress to the thrombin-induced pulmonary vasoconstriction.  
第29回国際心臓研究学会日本部会総会、2012年10月26日-27日、福岡
  15. Hirano M, Hirano K.  
Di-phosphorylation of myosin light chain (MLC) in the sub-membranous region plays an important role in the thrombin-induced barrier dysfunction in endothelial cells.  
第29回国際心臓研究学会日本部会総会、2012年10月26日-27日、福岡
  16. Kuwabara Y, Abe K, Hirano M, Hirooka Y, Hirano K, Sunagawa K.  
Chronic administration of proteinase-activated receptor 1 (PAR1) antagonist attenuated monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats.  
第77回日本循環器学会学術集会、2013年3月15日-17日、横浜  
Circ J 77 (Suppl D): I-684, 2013
  17. Hirano K, Hirano M.  
Critical role of Rho-kinase-mediated subjunctional di-phosphorylation of myosin light chain (MLC) in thrombin-induced disruption of endothelial barrier.  
Circ J 77 (Suppl D): I-1198, 2013
  18. Kunita M, Abe K, Hirano K, Sunagawa K, Hirooka Y.  
A new endothelin receptor antagonist macitentan is a potent vasodilator in intrapulmonary arteries in rats with severe pulmonary hypertension.  
第77回日本循環器学会学術集会、2013

- 年 3 月 15 日-17 日、横浜  
 Circ J 77 (Suppl I): I-2275, 2013
19. 平野勝也、桑原志実、平野真弓、阿部弘太郎.  
 モノクロタリン誘発肺高血圧に対するトロンビン受容体拮抗薬の予防効果  
 第 2 回 Integrated Pulmonary Circulation Research - III (iPUC-III)、2013 年 6 月 22 日、東京
20. 平野真弓、平野勝也.  
 血管平滑筋細胞トロンビン受容体の脱感作障害のメカニズム  
 第 55 回日本平滑筋学会総会、2013 年 8 月 7 日-8 日、旭川
21. 阿部弘太郎、平野勝也.  
 トロンビン受容体を標的とした新たな肺高血圧治療ストラテジーの確立  
 Vascular Biology Innovation 第 8 回研究発表会、2013 年 8 月 17 日-18 日、東京
22. 國田睦、阿部弘太郎、廣岡良隆、桑原志実、平野勝也、砂川賢二  
 新薬マシテンタンは肺高血圧モデルラットの病態進行を抑制する  
 第 1 回日本肺高血圧学会学術集会、2013 年 10 月 13 日-14 日、横浜
23. 桑原志実、阿部弘太郎、平野真弓、廣岡良隆、平野勝也、砂川賢二  
 トロンビン受容体拮抗薬はモノクロタリン誘発肺高血圧を抑制する  
 第 1 回日本肺高血圧学会学術集会、2013 年 10 月 13 日-14 日、横浜
24. Hirano K, Hirano M  
 Submembranous di-phosphorylation of myosin light chain and actin fiber formation play a critical role in thrombin-induced endothelial barrier disruption  
 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日-18 日、鹿児島
25. Hirano M, Hirano K.  
 Role of mono- and di-phosphorylation of myosin light chain in thrombin-induced endothelial barrier disruption.  
 第 87 回日本薬理学会、2014 年 3 月 19 日-21 日、仙台  
 J Pharmacol Sci 124 (Suppl 1): 160P, 2014
26. Hirano K, Hirano M.  
 Distinct role of mono- and di-phosphorylation of myosin light chain (MLC) in thrombin-induced endothelial barrier disruption.  
 第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 21 日-23 日、東京  
 Circ J. 2014;78 (Suppl D): OJ-065
27. Kuwabara Y, Abe K, Hirano M, Hirooka Y, Hirano K, Sunagawa K.  
 Preventive effects of thrombin receptor antagonist on hemodynamic parameters and histological findings in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats.

第 78 回日本循環器学会学術集会、2014 年 3 月 21 日-23 日、東京  
 Circ J. 2014;78 (Suppl D): PE-306

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)  
 名称: トロンビン受容体アンタゴニストを有効成分とする肺高血圧症の予防治療剤  
 発明者: 平野勝也、阿部弘太郎、平野真弓  
 権利者: エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社、九州大学  
 種類: 特許  
 番号: 特許出願 2012-207371  
 出願年月日: 平成 24 年 9 月 20 日  
 国内外の別: 国内

名称: トロンビン受容体アンタゴニストを有効成分とする肺高血圧症の予防治療剤  
 発明者: 平野勝也、阿部弘太郎、平野真弓  
 権利者: エーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社、九州大学  
 種類: 特許  
 番号: PCT/JP2013/075150  
 出願年月日: 平成 24 年 9 月 20 日  
 国内外の別: 国内外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
 ホームページ等  
 • <http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>  
 • <http://www.molcar.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
 平野 勝也 (HIRANO, KATSUYA)  
 九州大学・大学院医学研究院・准教授  
 研究者番号: 8 0 2 9 1 5 1 6
- (2) 研究分担者  
 平野 真弓 (HIRANO, MAYUMI)  
 九州大学・大学院医学研究院・助教  
 研究者番号: 8 0 3 3 6 0 3 1  
 阿部 弘太郎 (ABE, KOHTARO)  
 九州大学・大学院医学研究院・助教  
 研究者番号: 2 0 5 8 8 1 0 7  
 小田 義直 (ODA, YOSHINAO)  
 九州大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号: 7 0 2 9 1 5 1 5
- (3) 連携研究者  
 なし