

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 循環病態治療学研究室
職・氏名 教授・林 哲也

研究テーマ：肺動脈性肺高血症における右室リモデリングに対する iPS 細胞を用いた病態解明と
新たな治療戦略

研究期間：

2018 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 林 哲也 (大阪薬科大学・薬学部・教授)
研究分担者 井尻好雄 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者 加藤隆児 (大阪薬科大学・薬学部・准教授)
研究分担者 貝阿彌杏由 (大阪薬科大学・薬学部・五回生)

<共同研究機関>

研究代表者 朝日通雄 (大阪医科大学・医学部・教授)
研究代表者 岡田仁克 (大阪医科大学・医学部・教授)
研究分担者 友田起一郎 (大阪医科大学・医学部・准教授)
研究分担者 葭山 稔 (大阪市立大学・医学部・教授)
研究分担者 山口雄大 (大阪市立大学・医学部・助教)
研究分担者 植田初江 (国立循環器病センター・病理部・部長)
研究分担者 泉 康雄 (高石賀茂病院・院長)

研究目的：

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、肺小動脈の中膜肥厚と毛細血管叢状病変を特徴とする肺高血圧症 (PH) の 1 つであり、右室リモデリングから右心不全に至る予後不良の難治性疾患である。我々はこれまでに、2013 年ニース分類における第 1 群: PAH、第 3 群: 肺疾患または低酸素血症に伴う PH、そして第 4 群: 慢性血栓塞栓性 PH に関する研究を続けてきた。いずれの患者においても PH に対する治療薬としてプロスタグランジン系薬剤をはじめとする血管拡張薬や最近では免疫抑制剤、抗凝固薬などが使用されているがその予後改善効果は十分ではない。

一方、PAH 患者においてレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の亢進が確認されており血漿中アルドステロン濃度上昇も報告されている。Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) は副腎皮質ミトコンドリアにおけるステロイド産生において重要な役割を果たすことは知られているが、心筋細胞における StAR ならびにミネラルコルチコイド受容体 (MR) の局在や役割に関しては不明な点が多い。

そこで本研究では、PAH における右室リモデリングの病態解明と MR 拮抗薬を用いた新たな治療

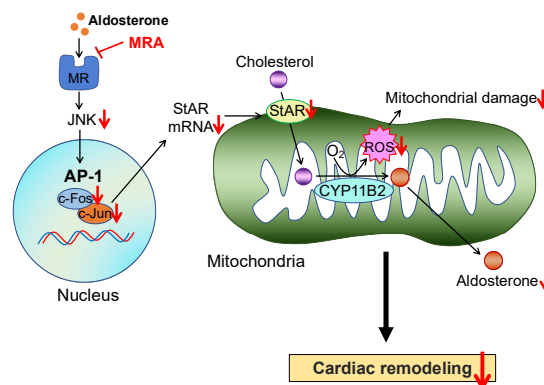
戦略を確立するために、剖検心をはじめ PAH モデル動物やヒト iPS 細胞を用いて StAR とミトコンドリアダイナミクスを中心に検討した。

研究内容および研究成果：

PAH にて死亡した患者 13 名、対照として脳出血・間質性肺炎で死亡し PAH が否定された患者 8 名の右房及び右室心筋標本を用い、光顕・電顕ならびに StAR, MR 発現に関する免疫組織化学的検索を行った。動物実験では、Sugen5416 (20 mg/kg)を皮下投与後、10%低酸素下にて 2 週間飼育、さらに通常大気下で飼育することによって PAH を発症した雄性 SD ラットを用い、Spironolactone (25 mg/kg/day)あるいは Eplerenone (50 mg/kg/day)を 4 週間投与した。血行動態測定後に屠殺し心臓、肺、副腎などを摘出した。それぞれ組織学的検索、c-Fos, c-Jun, StAR, MR, NF-κB, ERK, Mfn, Drp などの mRNA 評価と Western blot によるタンパク量の測定をおこなった。また、in vitro 実験として、HUVEC および HCMEC を用いて同様の検索を行った。さらに、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化させ、1%低酸素 12 時間負荷時の HIF-1α, StAR, JNK, ERK の発現を定量評価し、CRISPR interference にて StAR ノックダウン細胞を作成した。

以上の実験の結果、要約して以下の点が明らかとなった。

Local expression of StAR (Heart)



1. PAH 患者剖検症例における右室心筋細胞に StAR の発現が亢進している
2. Sugen-hypoxia PAH モデルはヒト右室心筋の光顕・電顕病理所見に合致する
3. StAR は血管内皮細胞、浸潤単核球そして心筋細胞に発現する
4. 右室リモデリング発症には c-Fos, c-Jun, NF-κB, ERK シグナルが関与する
5. Spironolactone は PAH における右室リモデリングを予防し、さらにミトコンドリアダイナミクスに対して保護的に作用する
6. ヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞において、低酸素負荷により StAR の発現が増加することを初めて報告した
7. CRISPRi にて StAR ノックダウン心筋細胞を作成することに成功した
8. 本法は、PAH における心筋リモデリングの詳細な病態解明に有効な手段であり、新たな治療法の開発にも利用できる

以上より、肺動脈性肺高血圧症における右室リモデリングには心筋細胞における StAR 発現の増加が関与し、スピロラクトン投与が予防に有効と考えられ、現在進行中の大規模臨床試験の結果が期待される。なお、本研究の一部は大阪薬科大学 2018 年度学術交流推進プロジェクトの援助を受けて

実施したものであり、この場を借りて深謝いたします。

成果発表：

<原著論文>

- Capillary Degeneration and Right Ventricular Remodeling Due to Hypoxic Stress with Sugen5416. Woo E, Kato R, Imano H, Fujiwara Y, Ijiri Y, Okada Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Katsumata T, Hayashi T. *Curr Vasc Pharmacol*. 15:589-598, 2017
- Factor Xa inhibition by rivaroxaban attenuates cardiac remodeling due to intermittent hypoxia. Imano H, Kato R, Tanikawa S, Yoshimura F, Nomura A, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Hayashi T. *J Pharmacol Sci*. 137:274-282, 2018.

<学会発表>

国際学会

- Rivaroxaban attenuates vascular remodeling of heart and lung in PAH through suppression of ERK1/2 and NF- κ B phosphorylation. Tanihata A, Matsumoto S, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Asahi M, Hayashi T. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018 年 7 月 (Kyoto, Japan)
- Rivaroxaban combined with spironolactone attenuates cardiovascular remodeling due to hypoxia in pulmonary arterial hypertension. Matsumoto S, Hosokawa A, Yamamoto K, Nomura A, Woo E, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Okada Y, Asahi M, Hayashi T. European Society of Cardiology Congress, 2018 年 8 月 (Munich, Germany)
- A novel therapeutic combination with rivaroxaban and spironolactone attenuates cardiovascular remodeling in pulmonary arterial hypertension through suppression of protease-activated receptor-2 and steroidogenic acute regulatory protein. Kondo S, Matsumoto S, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Asahi M, Hayashi T. American Heart Association Scientific Sessions 2018, 2018 年 11 月 (Chicago, USA)
- Mineralocorticoid-receptor antagonists regulate mitochondrial dynamics and local aldosterone production attenuating right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertension. Hayashi T, Kato R, Imano H, Ijiri Y, Nomura A, Asahi M, Wu H, Nakano T, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Ohta-Ogo K, Ishibashi-Ueda H. American Heart Association Scientific Sessions 2019, 2019 年 11 月 (Philadelphia, USA)

国内/全国規模学会

- 間歇的低酸素負荷に伴う心筋リモデリングと Xa 因子阻害薬 rivaroxaban による NF- κ B、MAPK、TGF- β /Smad 経路を介した心保護効果. 尾形竜樹、細川彩、奥村希、和田拓樹、近藤俊介、今野秀樹、加藤隆児、井尻好雄、山口雄大、泉康雄、葭山稔、林哲也. 第 39 回日本循環制御医学会総会、2018 年 6 月 (宮崎)
- 肺動脈性肺高血圧症 PAH に伴う右室リモデリングにおける選択的 Xa 因子阻害薬とミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の併用効果：PAH に対する新たな治療選択. 兼崎絢汰、細川彩、近

藤俊介、和田拓樹、野村篤生、今野秀樹、加藤隆児、井尻好雄、山口雄大、泉康雄、葭山稔、朝日道雄、林哲也。第66回日本心臓病学会学術集会、2018年9月（大阪）

- Spironolactone attenuates cardiovascular remodeling in PAH through suppression of local aldosterone production via StAR. Misumi T, Kondo S, Matsumoto S, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Asahi M, Hayashi T. 第22回日本心不全学会学術集会、2018年10月（東京）
- Role of cardiac steroidogenic acute regulatory protein in pulmonary arterial hypertension: a novel treatment with antagonists of mineralocorticoid receptors and anticoagulants. Yamamoto Y, Kanesaki K, Ogata T, Matsumoto S, Hosokawa A, Yamamoto K, Nomura A, Woo E, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Okada Y, Asahi M, Hayashi T. 第83回日本循環器学会学術集会、2019年3月（横浜）
- VEGF受容体阻害薬 semaxanib が持続低酸素負荷時に誘発する cardiac remodeling と spironolactone の心保護効果. 佐々木咲輝、兼崎絢汰、向井正幸、入谷純奈、玉田愛美、丸山明莉、橋本朱里、鎌江春華、甲田和男、末澤勇人、加藤隆児、井尻好雄、葭山稔、林哲也。第40回日本循環制御医学会総会、2019年6月（長野）
- Mineralocorticoid-receptor antagonists attenuates right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertension through regulating mitochondrial dynamics and local aldosterone production. Kanesaki K, Nomura A, Imano H, Kato R, Ijiri Y, Woo E, Yamaguchi T, Izumi Y, Ogo K, Ueda H, Katsumata T, Yoshiyama M, Asahi M, Hayashi T. 第42回日本高血圧学会総会、2019年10月（東京）
- Effects of mineralocorticoid-receptor antagonists on right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertension. Yamaguchi Y, Kanesaki K, Kato R, Imano H, Ijiri Y, Nomura A, Asahi M, Wu H, Nakano T, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Ohta-Ogo K, Ishibashi-Ueda H, Hayashi T. 第23回日本心不全学会学術集会、2019年10月（広島）

<その他>

- Local aldosterone production via StAR in PAH, and in human iPS cell-derived cardiomyocytes: efficacy of spironolactone in cardiac remodeling and mitochondrial dynamics under hypoxic stress. Kaiami A, Iwakoshi Y, Kato R, Imano H, Morihara H, Tomoda K, Asahi M, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Ohta-Ogo K, Ishibashi-Ueda H, and Hayashi T. American Heart Association Scientific Sessions 2020 Nov 13-17, Virtual Presentation.