

氏名	いまの ひでき 今野 秀樹
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	乙博薬第1号
学位授与の日付	令和3年8月27日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題目	低酸素負荷に伴う心血管リモデリングにおける プロテアーゼ活性型受容体の関与についての研究
論文審査委員	(主査) 教授 大喜多守 (副査) 教授 永井純也 (副査) 准教授 加藤隆児

論文内容の要旨

睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome : SAS) は、低酸素が原因となる疾患の一つであり、睡眠中に無呼吸を繰り返すことで、様々な合併症を引き起こす。特に、閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea syndrome : OSAS) は、メタボリックシンドロームの患者数増加に伴い日常診療で遭遇する頻度が高い重要な疾患である。OSAS の病態生理学的特徴の一つとして、酸化ストレスの増加とそれに伴って引き起こされる心血管リモデリングが知られているため、間歇的低酸素負荷によるストレス応答や心血管系における病態生理学的変化について検討することは極めて重要である。

OSAS の病態把握に重要な血液凝固系の亢進にプロテアーゼ活性型受容体 (protease-activated receptor : PAR) が関与する。PAR は、G タンパク質と共役した内在性膜タンパク質であり、PAR-1、PAR-2 を含む 4 つの受容体がクローニングされている。PAR-1 はトロンビン等により、また PAR-2 は活性化第 X 因子 (Factor Xa : FXa) 等により活性化される。PAR-1 及び PAR-2 は共に炎症に関与することが知られているが、心血管リモデリング進展への影響については不明な点が多い。

そこで、第 1 章では、間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングにおける PAR の関与について検討した。第 1 節では、間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに対する PAR-1 阻害薬 (FR171113) の効果を、第 2 節では、PAR-2 阻害薬 (FSLRLRY) 及び選択的 direct 作用型 FXa 阻害剤 rivaroxaban の効果を検討した。その結果、いずれの薬物においても、間歇的低酸素負荷による心筋細胞の肥大や血管周囲の線維化を軽減し、心血管リモデリングを抑制することが示され、OSAS における心血管リモデリングの進展に PAR が関与していると考えられた。

一方、低酸素血症や血栓塞栓症によって惹起される肺高血圧症は右心不全をきたす重篤な疾患である。その中でも肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension : PAH) における肺血管病変や右室リモデリングの発症・進展メカニズムには不明な点が多く、詳細な検討が必要とされる。近年、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 受容体拮抗薬 semaxanib の投与と持続的低酸素負荷の組み合わせによるヒトの病態により近い PAH ラットモデルが報告された。本モデルにおいては、心筋内微小血管ならびに毛細血管の変性、内腔閉塞の所見が特徴的であり、一方で凝固線溶系の亢進が認められている。このように PAH における心血管リモデリングに対しても PAR の関与が示唆されているが、不明な点が多いのが現状である。そこで第 2 章では、持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib の投与に伴う心血管リモデリングにおける PAR の関与について検討した。第 1 節にて rivaroxaban による効果を検討した結果、PAH モデルラットにおける右室収縮圧の上昇、心筋細胞の肥大及び間質の線維化を軽減し、右室リモデリングを抑制したため、PAH における右室リモデリングの進展に PAR の活性化が寄与していると考えられた。また、本モデルでは心筋への免疫細胞の浸潤が認められており、PAH モデル作成時の semaxanib による免疫の活性化が心筋リモデリングに関連していることが考えられた。そこで第 2 節では、semaxanib による THP-1 細胞の inflammasome への影響について検討した。その結果、semaxanib が inflammasome を活性化することが認められ、免疫細胞の活性化に寄与することが示唆された。PAR-2 は THP-1 細胞に発現が認められており、その活性化に関与していることが報告されている。Rivaroxaban が右室リモデリングを抑制した作用として、免疫を介した作用も一因である可能性が考えられた。

以上、本研究では、低酸素負荷に伴う心血管リモデリングの進展に PAR が関与しており、心血管リモデリングを抑制するためには PAR 阻害薬が有効であることを示した。特に実臨床ですでに抗凝固薬として使用されている rivaroxaban による治療は、

心房細動を伴う OSAS 患者や慢性血栓塞栓性肺高血圧症（chronic thromboembolic pulmonary hypertension : CTEPH）患者において、新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

睡眠時無呼吸症候群は、睡眠中に無呼吸を繰り返すことで、高血圧、狭心症、心筋梗塞、脳卒中など様々な合併症を引き起こす。また、上気道の閉塞により無呼吸・低呼吸状態となる閉塞型睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea syndrome: OSAS) は、睡眠時無呼吸症候群を呈する患者の大多数を占めており、メタボリックシンドロームの患者数の増加に伴って日常診療で遭遇する頻度も極めて高い。また、低酸素血症や血栓塞栓症によって惹起される肺高血圧症は右心不全をきたす重篤な疾患であり、その中でも肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) における肺血管病変や右室リモデリングの発症・進展メカニズムには依然として不明な点が数多く残されている。したがって、間歇的低酸素負荷による生体のストレス応答や心血管イベントについての研究は、OSAS とそれに伴う合併症や PAH に対する新たな治療戦略を展開するうえで極めて重要と考えられる。

本研究の目的は、低酸素ストレス下で生じる心血管リモデリングに対するプロテアーゼ活性型受容体 (protease-activated receptor: PAR) 阻害薬の影響とその作用メカニズムを解明し、本病態における PAR の関与をより明確にすることである。本論文では、各種低酸素負荷モデル動物に対する選択的 PAR-1 及び PAR-2 阻害薬の影響や、第 Xa 因子阻害を介して PAR-2 活性化を抑制する rivaroxaban の効果について検討し、いずれの薬物も顕著な病態改善効果を示すこと、またそのメカニズムには PAR 活性化阻害に基づく酸化ストレスの減少や炎症シグナルの軽減が密接に関与していることを明らかにしており、本研究の目的は達成している。

第 1 章では、間歇的低酸素負荷に曝されたマウスにおいて左室機能障害が生じ、心筋細胞の肥大や血管周囲の線維化がみられたが、PAR-1 阻害薬によりこれらの所見は軽減され、PAR-1 が間歇的低酸素負荷による心血管リモデリングの進展に関与していることが示された。また間歇的低酸素負荷により、活性酸素種 (ROS) 産生や PAR-1 発現量は増大し、これらの増大も PAR-1 阻害薬の投与により抑制されることから、PAR-1 阻害による酸化ストレスの低下が心血管リモデリングの進展抑制に寄与していると考えられた。さらに、*in vitro* の実験系において、PAR-1 阻害薬は PAR-1 活性化に伴う ERK-1/2 及び NF- κ B シグナル経路を抑制することで、間歇的低酸素負荷による心肥大及び心線維化を抑制し、心血管リモデリングを軽減する可能性が示された。一方、PAR-2 阻害作用を有する薬物を本モデル動物に投与した場合においても、PAR-1

阻害薬と同等の病態改善効果を示した。したがって、PAR-1 もしくは PAR-2 に対して阻害作用を有する薬物は、いずれも間歇的低酸素負荷による心筋細胞の肥大や血管周囲の線維化を軽減することが示され、OSAS における心血管リモデリングの進展に PAR-1 及び PAR-2 は密接に関与すると考えられた。

第2章では、持続的低酸素負荷と血管内皮増殖因子(VEGF)受容体拮抗薬 semaxanib の投与によって作成された PAH モデルラットに対して、PAR-2 阻害作用を有する rivaroxaban は、右室収縮圧の上昇、Fulton index (右心肥大の指標) 及び Tei index (右室機能の指標) を改善し、心筋細胞の肥大及び間質の線維化などの右室リモデリングを軽減することが示された。また、本モデル動物の右室心筋あるいは培養微小血管内皮細胞を用いた *in vitro* の実験系において、持続的低酸素負荷及び semaxanib 処置は、PAR-2 遺伝子及びタンパク発現の増加による ROS 産生の増大とそれに伴った ERK-1/2、NF- κ B、JNK シグナル経路の活性化、さらには TGF- β mRNA や p-Smad3 の発現を増大し、これら PAR-2 を介した多様なシグナルが心筋肥大や線維化に関与していることが示された。また rivaroxaban による PAR-2 阻害は、酸化ストレスの低下や ERK-1/2、NF- κ B、JNK シグナル経路を抑制し、semaxanib 投与後の持続的低酸素負荷により生じる心血管リモデリングを軽減することから、PAH における右室リモデリングの進展には PAR-2 の活性化が寄与すると考えられた。一方、本モデル動物では、心筋への免疫細胞の浸潤が認められており、PAH モデル作成時に投与された semaxanib が inflammasome とそれに次ぐ免疫細胞を活性化し、この活性化が心筋リモデリングに関与すること、また rivaroxaban の PAR-2 阻害により生じる酸化ストレスの減少が inflammasome の活性化を抑制し、右室リモデリングの軽減に関与する可能性も示された。

現在、OSAS 患者に対して経鼻的持続陽圧呼吸療法 (CPAP 療法) や口腔内装置 (マウスピース)、難治例では外科的手術による治療が行われている。また、OSAS 患者では心房細動 (atrial fibrillation : AF) の発現率が高く、逆に AF 患者では OSAS を呈する患者が多いことから、AF による心原性脳梗塞を回避するために抗凝固薬が治療に用いられている。一方、PAH 患者においても、一般的な支持療法 (抗凝固療法や在宅酸素療法など) とエンドセリン受容体拮抗薬やプロスタサイクリン製剤、可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬などの肺血管拡張薬を用いた治療が行われている。本研究では、OSAS や PAH に伴う心血管リモデリングの進展には PAR-1 及び PAR-2 の活性化とそれに引き続く酸化ストレス・炎症性シグナルの亢進が密接に関与している可能性が示されるとともに、これら病態で認められる心血管リモデリングに対して PAR 阻害薬を

用いた治療の有効性が示された。本研究成果は、心房細動を伴う OSAS 患者や PAH 患者に対して現在用いられている薬物とは異なる作用機序、すなわち PAR をターゲットとした新たな治療戦略を提案し、これら疾患に対する新たな治療薬の開発に貢献するものと考えられるため、申請者の論文は、本学博士論文として評価に値する。

以上により、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。