

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

2021年

今野秀樹

## 目次

序論	4
第1章 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	6
第1節 PAR-1 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響	7
緒言	7
方法	7
結果	11
考察	13
結語	14
第2節 PAR-2 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響	15
緒言	15
方法	16
結果	18
考察	20
結語	21
第2章 持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による心血管リモデリングにおける PAR の関与	23
第1節 PAR-2 阻害作用が持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による心血管リモデリングに与える影響	24
緒言	24
結果	27
考察	29
結語	31
第2節 VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib が inflammasome に与える影響	32
緒言	32
方法	33
結果	34
考察	35
結語	36
総括	38

謝 辭 .....	41
引用文献 .....	42
<b>Figures &amp; Tables .....</b>	<b>47</b>

## 序 論

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の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。

血液凝固系の亢進は、OSAS の病態において極めて重要な役割を果たしており、プロテアーゼ活性型受容体 (protease-activated receptor : PAR) の関与が注目されている。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って活性化され、PAR-2 は活性化第 Xa 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。

一方、肺高血圧症は遺伝子異常を含め、低酸素血症や血栓塞栓症を含む様々な原因によって惹起され、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<sup>1)</sup>。本モデルにおいては、

心筋内微小血管並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 の関与が示唆されるが、不明な点が多いのが現状である。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 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、PAR-1 阻害薬 FR171113 を用いて、「PAR-1 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響」を、第 2 節では、PAR-2 阻害薬 FSLLRVY 及び選択的 direct 作用型 FXa 阻害薬 rivaroxaban を用いて、「PAR-2 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響」を検討した。

第 2 章では、「持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による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、rivaroxaban を用いて、「PAR-2 阻害作用が持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による心血管リモデリングに与える影響」について検討した。第 2 節では、「VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib が inflammasome に与える影響」について検討した。

## 第1章 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

OSAS の病態生理学的特徴の一つとして、酸化ストレスにより心血管リモデリングが進展することが知られている。OSAS の病態を考慮する上で、間歇的低酸素によるストレス応答について検討することは極めて重要である。OSAS 患者では、心房細動 (atrial fibrillation : AF) の発現率が高いことが知られている。一方、他の多くの心血管疾患患者に比べ、AF 患者に OSAS が多くみられることが報告されている<sup>2,3)</sup>。このため、OSAS 患者に抗凝固薬が使用される機会はまれではない。

一方、OSAS の病態把握に重要な血液凝固系の亢進に PAR が関与する。PAR は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。そこで本章では、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、「PAR-1 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響」、第2節では「PAR-2 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響」について検討した。

## 第 1 節 PAR-1 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う

### 心血管リモデリングに与える影響

#### 緒 言

PAR-1 は、特定のプロテアーゼによって特異的に活性化される三量体 G タンパクと共役した 7 回膜貫通型受容体の一つである。PAR-1 はトロンビン等により活性化され、血小板凝集や炎症等に関わ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、本節では、PAR-1 阻害薬 FR171113<sup>4)</sup>を用いて、PAR-1 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響について検討した。

#### 方 法

##### 1. 動物実験

8 週齢雄性 C57BL/6J マウス (n=24) (日本 SLC) を日中 8 時間、間歇的低酸素 (1.5 分間の 5% O<sub>2</sub> と 5 分間の 21% O<sub>2</sub> のインターバル) 下で 28 日間飼育し、PAR-1 阻害薬 (FR171113、1 mg/kg/day i.p.) を投与した群 (Hx+FR171113 群) 及び FR171113 非投与群 (Hx 群)、並びに、大気圧下で 28 日間飼育した群 (Normoxia 群) を作成した。28 日間の飼育後、麻酔下において屠殺し心臓を摘出した。全ての実験は、大阪薬科大学動物施設使用ガイドラインに従って実施した。

## 2. 細胞培養

ヒト心臓微小血管内皮細胞（human cardiac microvascular endothelial cells : HCMECs、Lonza Group Ltd、Basel、Switzerland）を、EGM™-2MVBulletKit™（Lonza Group Ltd）を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養し、0.25% トリプシン/1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を用いて、7 日ごとに継代培養を行った。HCMECs（6.0×10<sup>5</sup> 個）を 24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で一晩インキュベーションした。その後、PAR-1 阻害薬である FR171113（0.1、1、10 μM）（Hx+FR171113 群）、またはジメチルスルホキシド（Hx 群）を培養液に添加し、37°C、1% O<sub>2</sub> の条件下で 24 時間インキュベーションした。対照として、37°C、20% O<sub>2</sub> の条件下で 24 時間インキュベーションした群を Normoxia 群とした。

## 3. 心機能評価

経胸壁心エコーは、Vivid E9（GE Healthcare、UT、USA）を用いて実施した。左室拡張末期径（left ventricular (LV) end-diastolic diameter : Dd）、左室収縮末期径（LV end-systolic diameter : Ds）、心室中隔壁厚（interventricular septum thickness : IVST）、及び左室後壁厚（posterior LV wall thickness : PWT）を M モード法により測定し、左心室質量（LV mass : LVM）を次の式により算出した<sup>5)</sup>。

$$LVM = 0.8 \times \{1.04 \times [(Dd + IVST + PWT)^3 - (Dd)^3]\} + 0.6$$

左室駆出率（LV ejection fraction : EF）は修正シンプソン法により算出した。さらに、僧帽弁流入の早期流入波速度（early rapid filling wave of mitral inflow velocity : E）を、速度が最大で流れが層流である僧帽弁尖の先端付近で、四腔断面像により測定した。僧帽弁輪部運動速度の拡張早期速度（early velocity of the mitral annulus : e'）は、組織ドプラー法によって評価を行い、左室充満圧を



示す E/e'を算出した。

#### 4. 組織学的検討

心臓組織を 10%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋を行った後、4  $\mu\text{m}$  の切片に切断した。その後、薄切切片を伸展し、スライドガラスに貼り付け、40°C で 24 時間以上乾燥させた。ヘマトキシリン・エオジン染色及びシリウス染色を行った後、光学顕微鏡 (ECLIPSE 80i、Nikon、Tokyo、Japan) により撮影した。心臓断面積は、400 倍の倍率にて観察し、ImageJ (Ver. 1.4、National Institutes of Health、MD、USA) を使用して評価した<sup>6)</sup>。また、シリウスレッドで染色した後、200 倍の倍率にて観察し、コラーゲンの体積分率 (%) を算出した<sup>7)</sup>。

#### 5. 免疫組織化学 (4-hydroxy-2-nonenal : 4-HNE)

左心室のパラフィン切片を 4-HNE のモノクローナル抗体 (Japan Institute for the Control of Aging、Shizuoka、Japan) 及び二次抗体 (ビオチン標識抗マウス IgG、Vector、CA、USA) とインキュベーションした後、Vectastain Elite ABC 試薬 (Vector) を用いて染色した。

#### 6. スーパーオキシドの検出

未固定の新鮮凍結左室心筋標本を、10  $\mu\text{mol/L}$  のジヒドロエチジウム (DHE、Molecular Probes、OR、USA) とともに、遮光下加湿チャンバー内で、37°C で 30 分間インキュベーションした。その後、BZ-8000 蛍光顕微鏡 (Keyence Corporation、Osaka、Japan) を用いて観察した。スーパーオキシド産生の検出は、NIH Image 1.61 (National Institutes of Health、MD、USA) を用いて蛍光強

度を定量化した。

## 7. mRNA の定量

左室心筋組織から TRIzol 試薬 (Molecular Research Center, OH, USA) を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with cDNA Remover (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて cDNA を作成した。プローブファインダー v2.45 ソフトウェアを用いて PAR-1、nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)、extracellular signal-regulated kinase (ERK) -1、ERK-2、及び glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマーを作成した。ユニバーサルプローブ (Roche Diagnostics) は、マウス PAR-1 (No.69)、ヒト PAR-1 (No.76)、マウス NF- $\kappa$ B (No.77)、ヒト NF- $\kappa$ B (No.38)、マウス ERK-1 (No.46)、ヒト ERK-1 (No.79)、マウス ERK-2 (No.50)、ヒト ERK-2 (No.50)、マウス GAPDH (No.80)、ヒト GAPDH (No.80) を用いた。mRNA の発現レベルは、LightCycler® (Roche Diagnostics) を用いて測定し、GAPDH を内部標準として使用した。

## 8. Western blotting

細胞からタンパクの抽出を行い、全サンプルの総タンパク濃度を 2  $\mu$ g/L に調整した。12.5% ポリアクリルアミドゲルを作成し、サンプルを各レーンに 10  $\mu$ L 添加後、電気泳動 (120 V、120 分) を行った。その後、poly vinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore, MA, USA) に転写した (25 W、105 分)。続いてメンブレンを 1% BSA で 60 分間ブロッキングし、一次抗体を 1% BSA で希釈 (抗体 : BSA = 1 : 1000) したものを加え、4°C の冷暗所で一晩反応させた。一次抗体として、rabbit anti-PAR-1 antibody (Bioss Antibodies Inc., MA、

USA)、rabbit anti-p-NF- $\kappa$ B primary antibody (Cell Signaling Technology、MA、USA)、rabbit anti-NF- $\kappa$ B primary antibody (Santa Cruz Biotechnology、TX、USA)、rabbit anti-p-ERK-1/2 primary antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-ERK-1/2 primary antibody (Cell Signaling Technology)、及び  $\alpha$ -tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。一次抗体を wash buffer で洗い流し、二次抗体 (Goat anti rabbit IgG HRP、SouthernBiotech、AL、USA) を 1% BSA で希釈 (抗体 : BSA=1 : 2000) したものを加え、60 分間反応させた。発色液 (Luminata Crescendo Western HRP Substrate、Millipore) を加え、AI600 (GE Healthcare) で撮影し、得られたバンドから目的のタンパク発現量を定量した。

## 9. 統計解析

多群比較には Tukey-Kramer 法を用いた。両側有意水準は 0.05 とした。

# 結 果

## 1. 心機能評価

心エコーにおける各パラメータを **Table 1** に示す。Hx 群の E/e' は、Normoxia 群と比較して有意に高かったが、Hx+FR171113 群での E/e' は Hx 群と比較して有意に低かった。各パラメータにおいて、Normoxia 群と Hx+FR171113 群の間に有意な差は見られなかった。

## 2. 組織学的所見

スーパーオキシド、4-HNE、心筋細胞断面積、及び血管周辺の線維化の光学

顕微鏡写真を **Figure 1** に、定量結果を **Figure 2** に示す。間歇的低酸素負荷によるスーパーオキシド、4-HNE、心筋細胞断面積、及び血管周辺の線維化の増加は、FR171113により有意に抑制された。

### 3. mRNA 発現量 (*in vivo*)

マウス左室心筋組織における PAR-1、NF- $\kappa$ B、ERK-1、及び ERK-2 の mRNA の発現量を **Figure 3** に示す。Hx 群の PAR-1、NF- $\kappa$ B、ERK-1、及び ERK-2 の mRNA 発現量は、Normoxia 群と比較して有意に高かったが、Hx+FR171113 群の PAR-1、NF- $\kappa$ B、ERK-1、及び ERK-2 の mRNA 発現量は、Hx 群と比較して有意に低かった。

### 4. mRNA 発現量 (*in vitro*)

HCMECs における PAR-1、NF- $\kappa$ B、ERK-1、及び ERK-2 の mRNA の発現量を **Figure 4** に示す。Hx 群の PAR-1、NF- $\kappa$ B、ERK-1、及び ERK-2 の mRNA 発現量は、Normoxia 群と比較して有意に高かったが、Hx+FR171113 群の PAR-1、NF- $\kappa$ B、ERK-1、及び ERK-2 の mRNA 発現量は、Hx 群と比較して有意に低かった。

### 5. タンパク発現量

HCMECs における PAR-1、NF- $\kappa$ B、及び ERK-1/2 のタンパク発現量を **Figure 5** に示す。HCMECs において、Hx 群の  $\alpha$ -tubulin に対する PAR-1 の比 (PAR-1/ $\alpha$ -tubulin)、NF- $\kappa$ B に対する p-NF- $\kappa$ B の比 (p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B)、ERK-1/2 に対する p-ERK-1/2 の比 ((p-ERK-1/2)/(ERK-1/2)) は、それぞれ Normoxia 群よりも有意に高かった。しかし、FR171113 を投与した場合、これらの比は用量依存的に減少した。

## 考 察

OSAS 患者では、左室拡張機能障害が認められることが報告されている<sup>8,9)</sup>。本研究においても、4 週間の間歇的酸素負荷に曝されたマウスに左室機能障害が起こり、心筋細胞の肥大及び血管周囲の線維化が見られた。しかしながら、FR171113 を投与されたマウスでは、これらの所見が軽減されていた。これは、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を示唆している。

我々は、還元型ニコチンアミドジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 依存性 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量が、間歇的低酸素負荷によって有意に増加すること、並びに水素ガスによるラジカルスカベンジ作用が心臓リモデリングを軽減させることを報告している<sup>10-12)</sup>。これらの結果は、間歇的低酸素負荷による障害を防ぐ上で、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の産生を抑制することが重要であることを示唆している。また、PAR-1 は、NADPH オキシダーゼを介して ROS を産生することが報告されている<sup>13)</sup>。本研究では、間歇的低酸素負荷により、スーパーオキシド及び 4-HNE の増加並びに PAR-1 発現量の増加が見られたが、FR171113 投与によりこれらの変化が抑制された。したがって、PAR-1 阻害による ROS 産生の減少が、心血管リモデリング進展の抑制に寄与していると考えられた。

また、ROS は、NF-κB シグナル経路を活性化することにより、心線維化及び心肥大を誘発することが報告されている<sup>14)</sup>。さらに、ROS は ERK シグナル系経路を活性化し、心筋肥大を誘発することが報告されている<sup>15, 16)</sup>。本研究では、HCMECs において、低酸素負荷により PAR-1/α-tubulin、p-NF-κB/NF-κB、及び (p-ERK-1/2)/(ERK-1/2) の比が増加したが、FR171113 の投与によりこれらの比の

増加が抑制された。これらの所見により、FR171113 は、PAR-1 を介して ERK-1/2 及び NF- $\kappa$ B シグナル経路を抑制することにより、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軽減に寄与することが示唆された。

以上より、PAR-1 阻害作用により、酸化ストレスが低下し、ERK-1/2 及び NF- $\kappa$ B シグナル経路が抑制され、間歇的低酸素負荷による心血管リモデリングが軽減されることが考えられた。

## 結 語

PAR-1 阻害作用により、間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングが抑制されることが示唆された。

## 第2節 PAR-2 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う

### 心血管リモデリングに与える影響

#### 緒言

第1節では、PAR-1 阻害作用により、間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングが抑制されることが示されたが、PAR-2 は、PAR-1 とは異なりトロンビンによって活性化されず、血液凝固第 Xa 因子等によって活性化される。そのため、PAR-1 阻害作用と同様に、PAR-2 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングへ影響を与えるかについては不明である。

一方、rivaroxaban は、経口抗凝固薬の一つであり、最初に開発された直接第 Xa 因子阻害薬である。Rivaroxaban は、臨床試験において、発症後間もない急性冠症候群患者の心血管死、心筋梗塞、脳卒中の複合エンドポイントの発生をプラセボと比較して有意に抑制した<sup>17)</sup>。また、Xa による PAR-2 の活性化が、炎症や線維化に関与している可能性が示唆されている<sup>18)</sup>。したがって、rivaroxaban は心血管系に対して保護的な作用を示すことが考えられる。しかしながら、rivaroxaban による Xa を介した PAR-2 阻害作用が、心血管リモデリングへ与える影響についての詳細は不明である。

そこで、本節では、選択的 PAR-2 阻害薬である FSLLRY 及び直接第 Xa 因子阻害薬である rivaroxaban を用いて、PAR-2 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響について検討した。

## 方 法

### 1. 実験動物

8 週齢雄性 C57BL/6J マウス (n=48) を、日中 8 時間、間歇的低酸素 (1.5 分間の 5% O<sub>2</sub> と 5 分間の 21% O<sub>2</sub> のインターバル) 下で 28 日間飼育し、rivaroxaban (12 mg/kg p.o.) 含有の飼料を摂取させた群 (Hypoxia, rivaroxaban 群)、PAR-2 阻害薬 (FSLLRV、10 µg/kg/day i.p.) を投与した群 (Hypoxia, FSLLRV 群)、及び Vehicle 群 (Hypoxia, vehicle 群)、並びに大気圧下で 28 日間飼育した群 (Normoxia 群) を作成した。28 日間の飼育後、麻酔下において屠殺し心臓を摘出した。全ての実験は、大阪薬科大学動物施設使用ガイドラインに従って実施した。

### 2. 細胞培養

第 1 章第 1 節方法 2 と同様の方法で細胞を継代培養した。HCMECs (6.0×10<sup>5</sup> 個) を 24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で一晩インキュベーションした。その後、rivaroxaban (1 µM) (Hypoxia, rivaroxaban 群)、PAR-2 阻害薬である FSLLRV (10 µM) (Hypoxia, FSLLRV 群)、またはジメチルスルホキシド (Hypoxia, vehicle 群) を培養液に添加し、37°C、1% O<sub>2</sub> の条件下で 24 時間インキュベーションした。対照として、37°C、20% O<sub>2</sub> の条件下で 24 時間インキュベーションした群を Normoxia 群とした。

### 3. 心機能評価

第 1 章第 1 節方法 3 と同様の方法で心エコーを実施した。



#### **4. 組織学的検討**

第1章第1節方法4と同様の方法で組織切片を作成し、光学顕微鏡により観察した。

#### **5. 免疫組織化学**

第1章第1節方法5と同様の方法で4-HNEの免疫組織化学検査を実施した。

#### **6. スーパーオキシドの検出**

第1章第1節方法6と同様の方法でスーパーオキシドを検出した。

#### **7. mRNAの定量**

第1章第1節方法7と同様の方法でmRNAを定量した。本節ではプローブファインダーv2.45ソフトウェアを用いてPAR-2、NF- $\kappa$ B、ERK-1、ERK-2、GAPDH、及び18S ribosomal RNA (18S rRNA)のプライマーを作成した。ユニバーサルプローブ (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) は、マウス PAR-2 (No.3)、ヒト PAR-2 (No.59)、マウス NF- $\kappa$ B (No.77)、ヒト NF- $\kappa$ B (No.38)、マウス ERK-1 (No.46)、ヒト ERK-1 (No.79)、マウス ERK-2 (No.50)、ヒト ERK-2 (No.50)、マウス GAPDH (No.80)、ヒト 18S rRNA (No.77) を用いた。mRNAの発現レベルは、LightCycler® (Roche Diagnostics) を用いて測定し、GAPDHあるいは18S rRNAを内部標準として使用した。

#### **8. Western blotting**

第1章第1節方法8と同様の方法でHCMECsのタンパクを定量した。一次抗体として、rabbit anti-p-NF- $\kappa$ B primary antibody (Cell Signaling Technology)、

rabbit anti-NF- $\kappa$ B primary antibody (Santa Cruz Biotechnology)、rabbit anti-p-ERK-1/2 primary antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-ERK-1/2 primary antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-PAR-2 primary antibody (Bioss Antibodies Inc.)、rabbit anti-p-Smad3 primary antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Smad3 primary antibody (Cell Signaling Technology)、及び  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology) を用い、二次抗体として、goat anti-rabbit IgG-peroxidase (Santa Cruz Biotechnology) を用いて検出した。

## 9. 統計解析

多群比較には Tukey-Kramer 法を用いた。両側有意水準は 0.05 とした。

# 結 果

## 1. 心機能評価

心エコーにおける各パラメータを **Table 2** に示す。Hypoxia, vehicle 群の E/e' は、Normoxia 群と比較して有意に高かったが、Hypoxia, rivaroxaban 群及び Hypoxia, FSLLRY 群では E/e' の上昇が抑制された。Hypoxia, rivaroxaban 群と Hypoxia, FSLLRY 群の E/e' は、Normoxia 群と有意な差は見られなかった。

## 2. 組織学的所見

心筋細胞断面積、血管周辺の線維化、4-HNE、及びスーパーオキシドの光学顕微鏡写真を **Figure 6** に、定量結果を **Figure 7** に示す。間歇的低酸素負荷による心筋細胞断面積、血管周辺の線維化、4-HNE、及びスーパーオキシドの増加

は、rivaroxaban 及び FSLLRVY により有意に抑制された。

### 3. mRNA 発現量 (*in vivo*)

マウス左室心筋組織における PAR-2、ERK-1、ERK-2、及び NF- $\kappa$ B の mRNA の発現量を **Figure 8** に示す。Hypoxia, vehicle 群の PAR-2、ERK-1、ERK-2、及び NF- $\kappa$ B の mRNA 発現量は、Normoxia 群と比較して有意に高かったが、Hypoxia, rivaroxaban 群及び Hypoxia, FSLLRVY 群の PAR-2、ERK-1、ERK-2、及び NF- $\kappa$ B の mRNA 発現量は、Hypoxia, vehicle 群と比較して有意に低かった。

### 4. mRNA 発現量 (*in vitro*)

HCMECs における PAR-2、ERK-1、ERK-2、及び NF- $\kappa$ B の mRNA の発現量を **Figure 9** に示す。Hypoxia, vehicle 群の PAR-2、ERK-1、ERK-2、及び NF- $\kappa$ B の mRNA 発現量は、Normoxia 群と比較して有意に高かったが、Hypoxia, rivaroxaban 群及び Hypoxia, FSLLRVY 群の PAR-2、ERK-1、ERK-2、及び NF- $\kappa$ B の mRNA 発現量は、Hypoxia, vehicle 群と比較して有意に低かった。

### 5. タンパク発現量

HCMECs における PAR-2、ERK-1/2、及び NF- $\kappa$ B のタンパク発現量を **Figure 10** に示す。HCMECs において、Hypoxia, vehicle 群の  $\beta$ -actin に対する PAR-2 の比 (PAR-2/ $\beta$ -actin)、ERK-1/2 に対する p-ERK-1/2 の比 ((p-ERK-1/2)/(ERK-1/2))、及び NF- $\kappa$ B に対する p-NF- $\kappa$ B の比 (p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B) は、それぞれ Normoxia 群よりも有意に高かった。しかし、Hypoxia, rivaroxaban 群及び Hypoxia, FSLLRVY 群でのこれらの比は、Hypoxia, vehicle 群と比較して有意に低かった。

## 考 察

本節では、間歇的低酸素負荷により、左室心筋における心筋細胞の肥大及び血管周囲の線維化が誘発されたが、rivaroxaban もしくは FSLLRY の投与により、これらの変化が抑制されたことを示した。

FXa は、様々な細胞において PAR-2 を活性化することが知られている。本研究では、間歇的低酸素負荷により、マウスの左室心筋における PAR-2 mRNA の発現の増加が見られ、HCMECs においては、低酸素負荷による PAR-2 mRNA 及びタンパクの発現の増加がみられた。一方、rivaroxaban もしくは FSLLRY の投与により、これらの発現の増加が抑制された。また、PAR-2 の活性化により ROS の産生が増加することが報告されている<sup>19)</sup>。本研究において、間歇的低酸素負荷により、左室心筋において 4-HNE 及びスーパーオキシドの増加が観察されたが、rivaroxaban もしくは FSLLRY の投与により、これらの発現の増加が抑制された。これらの所見により、rivaroxaban 及び FSLLRY は、PAR-2 を阻害することにより、間歇的低酸素負荷による ROS の産生を抑制することが示唆された。心筋細胞の PAR-2 を過剰発現させたマウスにおいては、心線維化及び心肥大が誘発されることが報告されている<sup>20)</sup>。第 1 節にて、ROS の産生が、心血管リモデリングの進展に寄与することを示した。したがって、PAR-2 阻害作用による ROS 産生量の減少が、心血管リモデリング抑制に寄与することが示唆された。

ROS は、NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化することにより、心線維化及び心肥大を誘発し、ERK シグナル系経路を活性化することにより、心筋肥大を誘発することが報告されている<sup>14-16)</sup>。本研究では、HCMECs において低酸素負荷により PAR-2/ $\beta$ -actin、(p-ERK-1/2)/(ERK-1/2)、p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B が増加したが、

rivaroxaban もしくは FSLLRY の投与によりこれらの比の増加が抑制された。これらの所見は、rivaroxaban もしくは FSLLRY は、PAR-2 阻害作用により、ERK-1/2 及び NF- $\kappa$ B シグナル経路を抑制し、間歇的低酸素負荷による線維化及び心肥大を抑制することが示唆された。

以上より、PAR-2 阻害作用により、酸化ストレスが低下し、ERK-1/2 及び NF- $\kappa$ B シグナル経路が抑制され、間歇的低酸素負荷による心血管リモデリングが軽減されることが考えられた。

## 結 語

PAR-2 阻害作用により、間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングが抑制されることが示唆された。

## 小 括

PAR-1 もしくは PAR-2 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し、心血管リモデリングを抑制することが示された。OSAS における心血管リモデリングの進展に PAR-1 及び PAR-2 が関与していると考えられた。特に AF を伴う OSAS 患者にとって、PAR-1 阻害作用もしくは PAR-2 阻害作用を有する薬物は有用であると考えられた。

## 第2章 持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による

### 心血管リモデリングにおける PAR の関与

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、低酸素血症や血栓塞栓症によって惹起され、右心不全をきたす重篤な疾患である。しかし、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、ヒトの病態により近い、血管内皮成長因子 (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 PAH ラットモデルが報告された<sup>1)</sup>。本モデルにおいては、心筋内微小血管及び毛細血管の変性、並びに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。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 による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 PAR-2 阻害作用が持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬

### semaxanib による心血管リモデリングに与える影響

#### 緒 言

PAH の病態に血栓形成が関与していることが知られている。血液凝固系カスケード反応の実質的な開始機能を担っている組織因子 (tissue factor : TF) が PAH 患者では増加していることが報告されている<sup>21, 22)</sup>。TF と活性型第 VII 因子 (Factor VIIa : FVIIa) の複合体は、凝固因子 FX を FXa へ活性化させる。Rivaroxaban は、直接第 Xa 因子阻害薬であり、第 1 章にて、間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングを抑制することが示されている。

PAR-2 は、血液凝固第 Xa 因子によって活性化される。PAR-2 は、特発性肺動脈性肺高血圧症患者や肺高血圧動物モデルの肺において発現が増加しており、肺の血管リモデリングに関与することが報告されている<sup>23)</sup>。しかしながら、PAH モデルでの心血管リモデリングにおける PAR-2 の関与については不明である。

そこで、第 1 節では、rivaroxaban を用いて、PAR-2 阻害作用が、持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による心血管リモデリングに与える影響について検討した。



## 方 法

### 1. 実験動物

8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、semaxanib を Carboxy Methyl Cellulose (CMC) にて溶解後、20 mg/kg で単回皮下投与した。その後、低酸素条件下 (10% O<sub>2</sub>) で 2 週間、通常酸素下 (21% O<sub>2</sub>) で 2 週間飼育した。さらに、rivaroxaban (12 mg/kg、p.o) 含有の飼料を摂取させた群 (SuHx+RIV 群) 及び rivaroxaban 非投与群 (SuHx 群) の 2 群に分類し、4 週間飼育した。対照群は、通常酸素下 (21% O<sub>2</sub>) で 4 週間飼育したラットとした (Normoxia 群)。なお、全ての実験は、大阪薬科大学動物施設使用ガイドラインに従って実施した。

### 2. 細胞実験

第 1 章第 1 節方法 2 と同様の方法を用いて細胞を継代培養した。HCMECs (6.0×10<sup>5</sup> 個) を 24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で一晩インキュベーションした。その後、semaxanib (3 μM) を添加し、37°C、1% O<sub>2</sub> の条件下で 24 時間インキュベーションした後、rivaroxaban (1 μM) を添加した群 (SuHx+RIV 群) とジメチルスルホキシドを添加した群 (SuHx 群) に分け、さらに、37°C、20% O<sub>2</sub> の条件下で 24 時間インキュベーションした。対照として、37°C、20% O<sub>2</sub> の条件下で 48 時間インキュベーションした群を Normoxia 群とした。

### 3. 心機能評価

第 1 章第 1 節 3 と同様の方法を用いて心エコーを実施した。IVST、PWT、左室内径短縮率 (fractional shortening : FS)、及び右室面積変化率 (fractional area

change : FAC) は M モード法により測定した。右室収縮能として三尖弁輪収縮期移動距離 (tricuspid annular plane systolic excursion : TAPSE) を測定し、右室収縮及び拡張能の指標として Tei index を算出した。

また心カテーテル検査により、右室収縮圧 (right ventricular systolic pressure : RVSP) 及び右室肥大係数 (Fulton index) を測定した。

#### 4. 組織学的検討

第 1 章第 1 節方法 4 と同様の方法を用いて組織切片を作成し、光学顕微鏡により観察した。

#### 5. 免疫組織化学

第 1 章第 1 節方法 5 と同様の方法を用いて、右心室における 4-HNE の免疫組織化学検査を実施した。

#### 6. mRNA の定量

第 1 章第 1 節 7 と同様の方法を用いて、右室心筋組織の mRNA を定量した。本節ではプローブファインダー v2.45 ソフトウェアを用いて PAR-2、NF- $\kappa$ B、ERK-1、ERK-2、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、TGF- $\beta$  及び 18S rRNA のプライマーを作成した。ユニバーサルプローブ (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland) は、ラット PAR-2 (No.63)、ラット NF- $\kappa$ B (No.78)、ラット ERK-1 (No.68)、ラット ERK-2 (No.1)、ラット JNK (No.77)、ラット TGF- $\beta$  (No.1)、及びラット 18S rRNA (No.22) を用いた。mRNA の発現レベルは、LightCycler® (Roche Diagnostics) を用いて測定し、18S rRNA を内部標準として使用した。

## 7. Western blotting

第1章第1節8と同様の方法を用いて HCMECs のタンパクを定量した。一次抗体として、rabbit anti-PAR-2 antibody (Bioss Antibodies Inc.)、rabbit anti-p-ERK-1/2 antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-ERK-1/2 antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-p-NF- $\kappa$ B antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-NF- $\kappa$ B antibody (Santa Cruz Biotechnology)、rabbit anti-p-JNK antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-JNK antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-p-Smad3 antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Smad3 antibody (Cell Signaling Technology)、及び  $\beta$ -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) を用い、二次抗体として、goat anti-rabbit IgG-peroxidase (Southern Biotech) を用いて検出した。

## 8. 統計解析

多群比較には Tukey-Kramer 法を用いた。両側有意水準は 0.05 とした。

# 結 果

## 1. 右室機能所見

心カテーテル検査による RVSP 及び Fulton index の結果を **Figure 11** に示した。SuHx 群の RVSP は、Normoxia 群と比較して有意に高く、SuHx+RIV 群の RVSP は、SuHx 群と比較して有意に低かった。また、SuHx 群の Fulton index は、Normoxia 群と比較して有意に高く、SuHx+RIV 群の Fulton index は、SuHx 群と比較して有意に低かった。

## 2. 心機能評価

心エコーにおける各パラメータを **Table 3** に示す。SuHx 群では、心室中隔及び左室後壁の肥厚が見られた。SuHx 群の RV Tei index は、Normoxia 群と比較して有意に高く、SuHx+RIV 群の RV Tei index は、SuHx 群と比較して有意に低かった。

## 3. 組織学的所見

心筋細胞断面積、線維化、及び 4-HNE の光学顕微鏡写真を **Figure 12** に、定量結果を **Figure 13** に示す。SuHx 群の心筋細胞断面積、線維化、及び 4-HNE は、Normoxia 群と比較して有意に増加したが、SuHx+RIV 群の心筋細胞断面積、線維化、及び 4-HNE は、SuHx 群と比較して有意に減少した。また、SuHx 群では、単核細胞の浸潤が見られたが、SuHx+RIV 群では見られなかった。

## 4. mRNA 発現量 (*in vivo*)

ラット右室心筋組織における PAR-2、ERK-1、ERK-2、JNK、NF- $\kappa$ B、及び TGF- $\beta$  の mRNA の発現量を **Figure 14** に示す。SuHx 群の PAR-2、ERK-1、ERK-2、JNK、NF- $\kappa$ B、及び TGF- $\beta$  の mRNA 発現量は、Normoxia 群と比較して有意に高かったが、SuHx+RIV 群の PAR-2、ERK-1、ERK-2、JNK、NF- $\kappa$ B、及び TGF- $\beta$  の mRNA 発現量は、SuHx 群と比較して有意に低かった。

## 5. タンパク発現量

HCMECs における PAR-2、ERK-1/2、NF- $\kappa$ B、JNK、及び Smad3 のタンパク発現量を **Figure 15** に示す。HCMECs において、SuHx 群の  $\beta$ -actin に対する PAR-2 の比 (PAR-2/ $\beta$ -actin)、ERK-1/2 に対する p-ERK-1/2 の比 ((p-ERK-

1/2)/(ERK-1/2)、NF- $\kappa$ B に対する p-NF- $\kappa$ B の比 (p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B)、JNK に対する p-JNK の比 (p-JNK/JNK)、及び Smad3 に対する p-Smad3 の比 (p-Smad3/Smad3) は、Normoxia 群よりも有意に高かった。SuHx+RIV 群のこれらの比は、SuHx 群と比較して有意に低かった。

## 考 察

PAH の患者や動物では、頻繁に右室リモデリングや心不全が認められることが知られている<sup>24, 25</sup>。本研究では、semaxanib 投与後 14 日間の持続的低酸素にラットを曝露させることにより、右室心筋の間質の線維化や心筋細胞肥大が認められ、右室リモデリングを起こすことを示した。一方、rivaroxaban を投与したラットでは、これらの右室の変化が軽減された。

本モデルラットにおいて、semaxanib 投与後 14 日間の持続的低酸素による右室収縮圧及び Fulton index の上昇が、rivaroxaban 投与により抑制された。さらに、PAH の重症度を予測する上で臨床上有用な指標である Tei index が rivaroxaban の投与により改善した。

本研究では、semaxanib 投与後の持続的低酸素負荷により、ラットの右室心筋における PAR-2 mRNA の発現の増加が見られ、HCMECs においては、PAR-2 mRNA 及びタンパクの発現の増加がみられた。一方、rivaroxaban の投与により、これらの発現の増加が抑制された。また、PAR-2 の活性化により ROS の産生が増加することが報告されている<sup>19)</sup>。本研究において、semaxanib 投与後の持続的低酸素負荷により、右室心筋において 4-HNE の増加が観察されたが、rivaroxaban の投与により、これらの発現の増加が抑制された。これらの所見に

より、rivaroxaban は、PAR-2 を阻害することにより、semaxanib 投与後の持続的  
低酸素負荷による ROS の産生を抑制することが示唆された。第 1 章にて、ROS  
の産生が、心血管リモデリングの進展に寄与することを示した。したがって、  
本節の実験においても、PAR-2 阻害作用による ROS 産生量の減少が、心血管リ  
モデリング抑制に寄与することが示唆された。

ROS は、NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化することにより、心線維化及び心肥大  
を誘発し、ERK シグナル系経路を活性化することにより、心筋肥大を誘発する  
ことが報告されている<sup>14-16</sup>。また、ROS スカベンジャーにより、JNK シグナル  
経路が抑制され<sup>26</sup>、JNK シグナル経路の活性化により心肥大が促進されると報  
告されている<sup>16,27</sup>。

Semaxanib 投与後の持続的低酸素負荷により上昇した PAR-2、ERK-1、JNK、  
及び NF- $\kappa$ B の mRNA 発現量は、rivaroxaban 投与により有意に減少した。さら  
に、HCMECs において、上昇した PAR-2/ $\beta$ -actin、(p-ERK-1/2)/(ERK-1/2)、p-  
JNK/JNK、及び p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B が、rivaroxaban 投与により有意に減少した。  
Semaxanib 投与後の持続的低酸素負荷による TGF- $\beta$  mRNA や p-Smad3/Smad3 の  
増加が、rivaroxaban 投与によって抑制されたことにより、rivaroxaban が線維化  
を抑制することを裏付けている。これらの所見により、rivaroxaban は、PAR-2  
阻害作用により、ERK-1/2、NF- $\kappa$ 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る線維化及び心肥大を抑制することが示唆された。

以上より、PAR-2 阻害作用により、酸化ストレスが低下し、ERK-1/2、NF- $\kappa$ B、  
JNK シグナル経路が抑制され、semaxanib 投与後の持続的低酸素負荷による心  
血管リモデリングが軽減されると考えられた。

## 結 語

Rivaroxaban が有する PAR-2 阻害作用により、持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib の投与によって作成された PAH モデルラットにおける心筋細胞の肥大及び線維化が軽減され、右室リモデリングが抑制された。

## 第2節 VEGF受容体拮抗薬 semaxanib が inflammasome

### に与える影響

#### 緒言

第2章第1節において、持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib の投与により、心筋への免疫細胞の浸潤が認められた。

Inflammasome は、主に自然免疫細胞を中心に発現し、傷害等に伴う危険シグナルに応答して炎症の惹起を制御する細胞内の分子複合体である。近年、inflammasome 活性化と心血管障害との関連性が報告されており、inflammasome の阻害により心臓リモデリングが軽減されることも報告されている<sup>28)</sup>。したがって、PAH モデル作成時に投与された 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可能性が考えられた。

THP-1 細胞は、ヒト単球系細胞株であり、刺激により単球性からマクロファージ様へと分化・成熟する特徴がある。THP-1 細胞には PAR-2 が発現しており、PAR-2 の活性によりサイトカインの分泌が増加することが報告されている<sup>29)</sup>。そこで、第1節で示した、PAR-2 阻害作用による持続的低酸素負荷と semaxanib の投与によって作成された PAH モデルラットにおける右室リモデリングに対する抑制効果の詳細な要因を探索するため、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。



## 方 法

### 1. 細胞培養

THP-1 細胞を、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。THP-1 細胞 (4×10<sup>5</sup>/250 μL) に phorbol myristate acetate (100 ng/mL、Merck KGaA、Darmstadt、Germany) 含有培地 250 μL を混合し、24 well プレートに播種し、macrophage へ分化誘導した。3 日間培養後、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、DMEM 1 mL を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> で 24 時間培養した後、薬剤含有培地を macrophage 化 THP-1 細胞に添加し、24 時間後に THP-1 細胞から産生される IL-1β 及び THP-1 細胞の caspase-1 活性を測定した。

### 2. Western Blotting

第 1 章第 1 節 8 と同様の方法で、培養液中及び THP-1 細胞中のタンパク定量を行った。培養液は THP-1 細胞培養上清 20 μL を用いた。一次抗体として、caspase-1 rabbit antibody (Cell Signaling Technology)、gasdermin D rabbit antibody (Cell Signaling Technology)、及び high mobility group box (HMGB) 1 rabbit polyclonal antibody (Proteintech Group, Inc.、IL、USA) を用い、二次抗体として、goat anti-rabbit IgG-peroxidase (SouthernBiotech) を用いて検出した。

### 3. 培養液中 IL-1β 濃度測定

培養液中 IL-1β 濃度を ELISA キット (BioLegend Inc.、CA、USA) を用いて測定した。

#### 4. THP-1 細胞における caspase-1 活性測定

Phorbol Myristate Acetate (PMA) により分化させた THP-1 細胞 ( $4 \times 10^5$  cells/mL) を用いて、Caspase-Glo<sup>®</sup> 1 Inflammasome Assay (Promega Corporation) により caspase-1 活性を測定した。Caspase-Glo reagent を well に添加し、遮光条件下室温にて 1 時間インキュベーションした後、プレートリーダーを用いて発光を測定した。

#### 5. 統計解析

多群比較には Tukey-Kramer 法を用い、2 群比較には対応のない t 検定を用いた。両側有意水準は 0.05 とした。

## 結 果

### 1. 培養液中 IL-1 $\beta$ 産生量

Semaxanib 投与 24 時間後の THP-1 細胞培養液中 IL-1 $\beta$  濃度を **Figure 16** に示す。30  $\mu$ M semaxanib 群では、Control 群と比較して IL-1 $\beta$  濃度が有意に高かった。30  $\mu$ M semaxanib+YVAD (caspase-1 阻害薬) 群では、30  $\mu$ M semaxanib 群と比較して IL-1 $\beta$  濃度は有意に低かった。

### 2. THP-1 細胞中 caspase-1 活性

Semaxanib 投与 24 時間後の THP-1 細胞中 caspase-1 活性を **Figure 17** に示す。

30  $\mu$ M semaxanib 群では、Control 群と比較して caspase-1 活性が有意に高かった。  
30  $\mu$ M semaxanib+YVAD 群では、30  $\mu$ M semaxanib 群と比較して caspase-1 活性は有意に低かった。

### 3. Cleaved caspase-1 及び Gasdermin D (GSDMD) N 末端フラグメントの発現量

Cleaved caspase-1 及び GSDMD N 末端フラグメントの発現量を **Figure 18** に示す。30  $\mu$ M semaxanib 群では、Control 群と比較して cleaved caspase-1 及び GSDMD N 末端フラグメント発現量が有意に高かった。

### 4. 培養液中 HMGB1 発現量

培養液中に分泌された HMGB1 の発現量を **Figure 19** に示す。30  $\mu$ M semaxanib 群では、Control 群と比較して有意に HMGB1 発現量が高かった。

## 考 察

本節では、semaxanib が caspase-1 を活性化し、培地中の IL-1 $\beta$  濃度を上昇させ、GSDMD N 末端フラグメントの発現量を増加させることを示した。これらの所見により、semaxanib は、分化した THP-1 細胞の inflammasome を活性化することが示唆された。Inflammasome の活性化により、caspase-1 前駆体が活性型 caspase-1 に変換され、さらに活性型 caspase-1 が IL-1 $\beta$  前駆体及び IL-18 前駆体を活性型に変換し、免疫応答が開始される<sup>30)</sup>。活性化された抗原提示細胞は、HMGB1 を分泌することが報告されている<sup>31)</sup>。HMGB1 の分泌により、他の抗

原提示細胞を活性化し、炎症が促進される。本研究において、semaxanib は、HMGB1 を分泌することが認められた。第 1 節の semaxanib と持続的低酸素負荷によるモデルにおいて、心筋における単核細胞の浸潤が認められた一因として semaxanib による inflammasome の活性化が関与していると考えられた。心筋細胞において、ROS により inflammasome の活性化が促進されることが報告されている<sup>32)</sup>。第 1 節において、PAR-2 阻害作用により、酸化ストレスが低下することを示した。したがって、rivaroxaban の PAR-2 阻害作用が、酸化ストレスを低下させ、semaxanib による inflammasome の活性化を抑制し、右室リモデリングの軽減に寄与した可能性が考えられた。

## 結 語

VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib は、THP-1 細胞の inflammasome を活性化することが示唆された。

## 小 括

PAR-2 阻害作用を有する rivaroxaban は、持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib の投与による 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。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。Semaxanib が THP-1 細胞の 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 は抗原提示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。また、ROS により inflammasome の活性化が促進されることから、rivaroxaban の PAR-2 阻害作用が、酸化ストレスを低下させ、semaxanib による inflammasome の活性化を抑制した可能性が示唆された。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。

## 総 括

本研究では、低酸素ストレス下の PAR の活性化に着目し、「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」を行った。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、第 2 章では、「持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による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 章第 1 節では、PAR-1 阻害作用を有する薬物として FR171113 を用い「PAR-1 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響」について検討した。その結果、FR171113 は間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングを抑制することを明らかにした。第 2 節では、PAR-2 阻害作用を有する薬物として FSLLRY 及び rivaroxaban を用い「PAR-2 阻害作用が間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングに与える影響」について検討した。その結果、FSLLRY と rivaroxaban はともに、間歇的低酸素負荷に伴う心血管リモデリングを抑制することを明らかにした。PAR-1 もしくは PAR-2 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。

第 2 章第 1 節では、第 1 章で間歇的低酸素負荷による心血管リモデリングを抑制することが示され、かつ実臨床で使用されている rivaroxaban を用い「PAR-2 阻害作用が持続的低酸素負荷と VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib による心血管リモデリングに与える影響」について検討した。その結果、rivaroxaban は、持続的低酸素負荷と 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。したがって、PAH における右室リモデリングの進展に PAR-2 の活性化が寄与していると考えられた。第 2 節では、「VEGF 受容体拮抗薬 semaxanib が inflammasome に与える影響」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 は抗原提示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。したがって、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、本研究から、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している 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。

## 論文目録

本論文の内容の一部は、次の雑誌に公表した。

- 1) Imano H, Kato R, Tanikawa S, Yoshimura F, Nomura A, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M & Hayashi T. Factor Xa inhibition by rivaroxaban attenuates cardiac remodeling due to intermittent hypoxia. *J Pharmacol Sci.*, **137**, 274-282 (2018).
- 2) Imano H, Kato R, Ijiri Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Nomura A, Yoshiyama M & Hayashi T. Protease-Activated Receptor-1 Inhibition by FR171113 Attenuates Cardiac Remodeling Due to Intermittent Hypoxia. *Ann Cardiol Vasc Med.*, **3**, 1036 (2020).
- 3) Imano H, Kato R, Ijiri Y & Hayashi T. Activation of inflammasomes by tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor: Implications for VEGFR TKIs-induced immune related adverse events. *Toxicol In Vitro.*, **71**, 105063 (2021).
- 4) Imano H, Kato R, Nomura A, Tamura M, Yamaguchi Y, Ijiri Y, Wu H, Nakano T, Okada Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Asahi M & Hayashi T. Rivaroxaban Attenuates Right Ventricular Remodeling in Rats with Pulmonary Arterial Hypertension. *Biol Pharm Bull.*, **44**, 669-677 (2021).



## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切なる御指導御鞭撻を賜りました大阪薬科大学循環病態治療学研究室 林哲也教授、井尻好雄准教授、加藤隆児准教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究を実施するにあたり、多大な御協力を賜りました医療法人医進会高石加茂病院 泉康雄医院長、大阪市立大学大学院医学研究科薬理学研究室 葭山稔教授、京都橘大学健康科学部臨床検査学科 岡田仁克教授、大阪医科大学薬理学研究室 朝日通雄教授、大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学 山口雄大助教、大阪医科大学薬理学研究室 野村篤生先生、大阪薬科大学循環病態治療学研究室の諸氏に心より感謝致します。

## 引用文献

- 1) Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, **121**, 2747-54 (2010).
- 2) Szymanski FM, Płatek AE, Karpinski G, Kozluk E, Puchalski B, Filipiak KJ. Obstructive sleep apnoea in patients with atrial fibrillation: prevalence, determinants and clinical characteristics of patients in Polish population. *Kardiologia Pol.*, **72**, 716-724 (2014).
- 3) Gami AS, Pressman G, Caples SM, Kanagala R, Gard JJ, Davison DE, Malouf JF, Ammash NM, Friedman PA, Somers VK. Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea. *Circulation*, **110**, 364-367 (2004).
- 4) Kato Y, Kita Y, Hirasawa-Taniyama Y, Nishio M, Mihara K, et al. Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, FR171113, in the guinea pig. *Eur J Pharmacol.*, **25**, 163-9 (2003).
- 5) Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol.*, **57**, 450-458 (1986).
- 6) Duran JM, Makarewich CA, Trapanese D, Gross P, Husain S, et al. Sorafenib cardiotoxicity increases mortality after myocardial infarction. *Circ Res.*, **114**, 1700-1712 (2014).
- 7) Yamashita C, Hayashi T, Mori T, Tazawa N, Kwak CJ, et al. Angiotensin-II receptor blocker reduces oxidative stress and attenuates hypoxia-induced left ventricular remodeling in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens Res.*, **30**,

1219-1230 (2007).

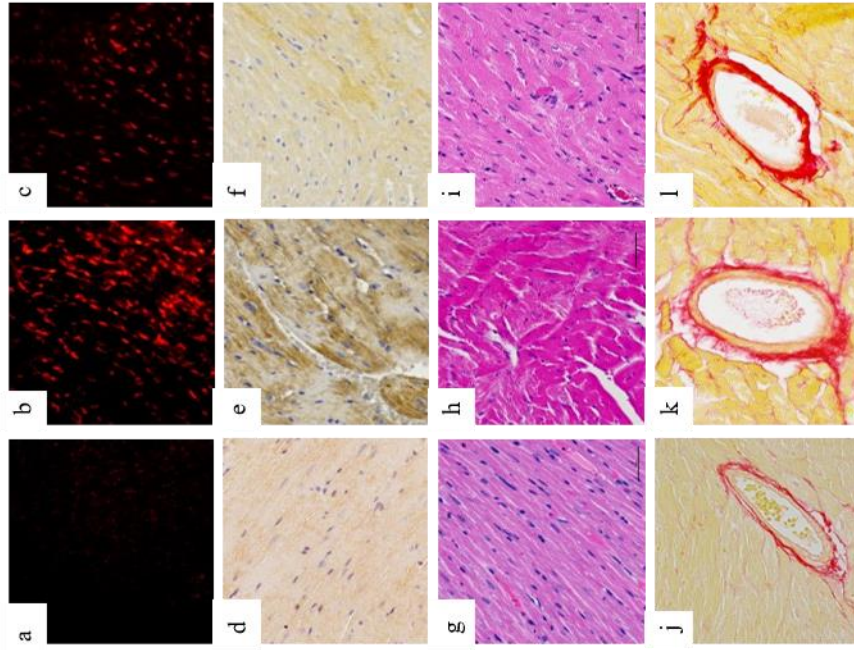
- 8) Lattimore JDL, David S, Wilcox I. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* **41**, 1429–37 (2003).
- 9) Kasai T. Sleep apnea and heart failure. *J Cardiol.*, **60**, 78–85 (2012).
- 10) Hayashi T, Yamashita C, Matsumoto C, Kwak CJ, Fujii K, Hirata T, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Okada Y, Matsumura Y, Kitaura Y. Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxic stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **294**, 2197–2203 (2008).
- 11) Inamoto S, Yoshioka T, Yamashita C, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Matsumoto C, Matsumura Y, Kitaura Y, Hayashi T. Pitavastatin reduces oxidative stress and attenuates intermittent hypoxia-induced left ventricular remodeling in lean mice. *Hypertens Res.*, **33**, 579-86 (2010).
- 12) Hayashi T, Yoshioka T, Hasegawa K, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Matsumura Y, Ishizaka N. Inhalation of hydrogen gas attenuates left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **301**, H1062-9 (2011).
- 13) Huang QT, Chen JH, Hang LL, Liu SS, Zhong M. Activation of PAR-1/NADPH oxidase/ROS signaling pathways is crucial for the thrombin-induced sFlt-1 production in extravillous trophoblasts: possible involvement in the pathogenesis of preeclampsia. *Cell Physiol Biochem.*, **35**, 1654-62 (2015).
- 14) Zhao QD, Viswanadhapalli S, Williams P, Shi Q, Tan C, Yi X, Bhandari B, Abboud HE. NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NFκB signaling pathways. *Circulation.*, **131**, 643-55 (2015).

- 15) Sugden PH, Clerk A. Regulation of mitogen-activated protein kinase cascades in the heart. *Adv Enzyme Regul.*, **38**, 87–98 (1998).
- 16) Hu B, Song JT, Ji XF, Liu ZQ, Cong ML, Liu DX. Sodium Ferulate Protects against Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice by Regulating the MAPK/ERK and JNK Pathways. *Biomed Res Int.*, **2017**, 3754942 (2017).
- 17) Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, et al. ATLAS ACS 2eTIMI 51 investigators. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.*, **366**, 9e19 (2012).
- 18) Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA, 2008. FXa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol.*, **172**: 309–20 (2008).
- 19) Lim SY, Tennant GM, Kennedy S, Wainwright CL, Kane KA. Activation of mouse protease-activated receptor-2 induces lymphocyte adhesion and generation of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol.*, **149**, 591–9 (2006).
- 20) Antoniak S, Sparkenbaugh EM, Tencati M, Rojas M, Mackman N, Pawlinski R. Protease activated receptor-2 contributes to heart failure. *PLoS One.*, **8**, e81733 (2013).
- 21) Berger G, Azzam ZS, Hoffman R, Yigla M. Coagulation and anticoagulation in pulmonary arterial hypertension. *Isr Med Assoc J.*, **11**, 376-379 (2009).
- 22) Altman R, Scazziota A, Rouvier J, Gurfinkel E, Favalaro R, Perrone S, Fared J. Coagulation and fibrinolytic parameters in patients with pulmonary hypertension. *Clin Cardiol.*, **19**, 549-554 (1996).
- 23) Kwapiszewska G, Markart P, Dahal BK, Kojonazarov B, Marsh LM, Schermuly

- RT, Taube C, Meinhardt A, Ghofrani HA, Steinhoff M, Seeger W, Preissner KT, Olschewski A, Weissmann N, Wygrecka M. PAR-2 inhibition reverses experimental pulmonary hypertension. *Circ Res.*, **110**, 1179-1191 (2012).
- 24) van der Bruggen CEE, Tedford RJ, Handoko ML, van der Velden J, de Man FS. RV pressure overload: from hypertrophy to failure. *Cardiovasc Res.*, **113**, 1423-1432 (2017).
- 25) Daicho T, Yagi T, Takano S, Marunouchi T, Abe Y, Ohara M, Takeo S, Tanonaka K. Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.*, **32**, 1378-84 (2009).
- 26) Wang SY, Ni X, Hu KQ, Meng FL, Li M, Ma XL, Meng TT, Wu HH, Ge D, Zhao J, Li Y, Su GH. Cilostazol alleviate nicotine induced cardiomyocytes hypertrophy through modulation of autophagy by CTSB/ROS/p38MAPK/JNK feedback loop. *Int J Biol Sci.*, **16**, 2001-2013 (2020).
- 27) Xiao J, Jiang H, Zhang R, Fan G, Zhang Y, Jiang D, Li H. Augmented cardiac hypertrophy in response to pressure overload in mice lacking ELTD1. *PLoS One.*, **7**, e35779 (2012).
- 28) Narendran S, Pereira F, Ambati J. NLRP3 Inflammasome Inhibition: A Potential Therapeutic Strategy to Attenuate Postinfarction Adverse Cardiac Remodeling. *JACC Basic Transl Sci.*, **5**, 1225-1227 (2020).
- 29) Kang CS, Tae J, Lee YM, Kim BS, Moon WS, Kim DK. Protease-activated Receptor 2 is Associated with Activation of Human Macrophage Cell Line THP-1. *Immune Netw.*, **5**, 193-198 (2005).
- 30) Guo, H., Callaway, J.B., Ting, J.P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.*, **21**, 677–687 (2015).

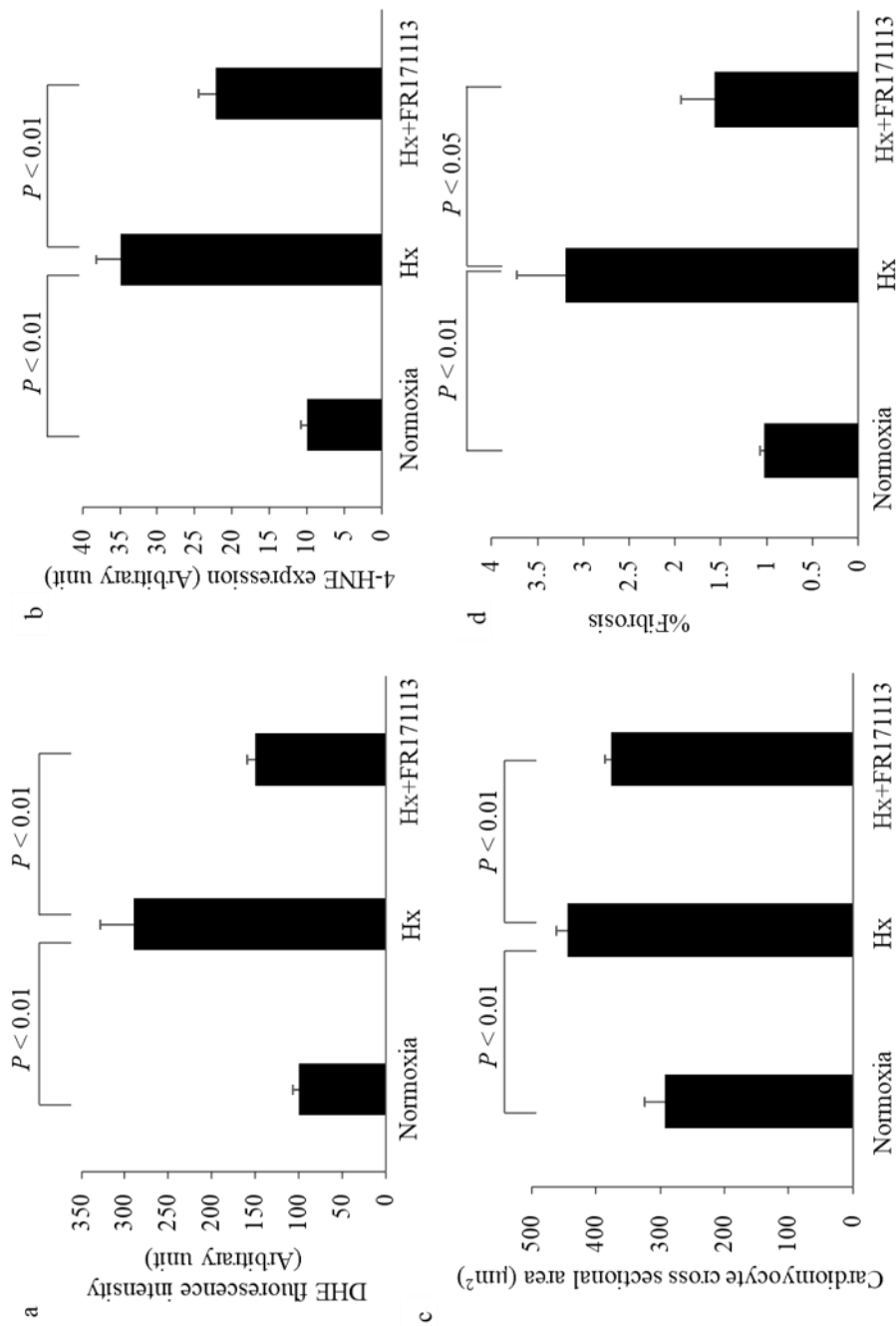
- 31) Yang, D., Chen, Q., Yang, H., Tracey, K.J., Bustin, M., Oppenheim, J.J. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 59–66 (2007).
- 32) Shen S, He F, Cheng C, Xu B, Sheng J. Uric acid aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury via ROS/NLRP3 pyroptosis pathway. *Biomed Pharmacother.*, **133**, 110990 (2021).

## **Figures & Tables**

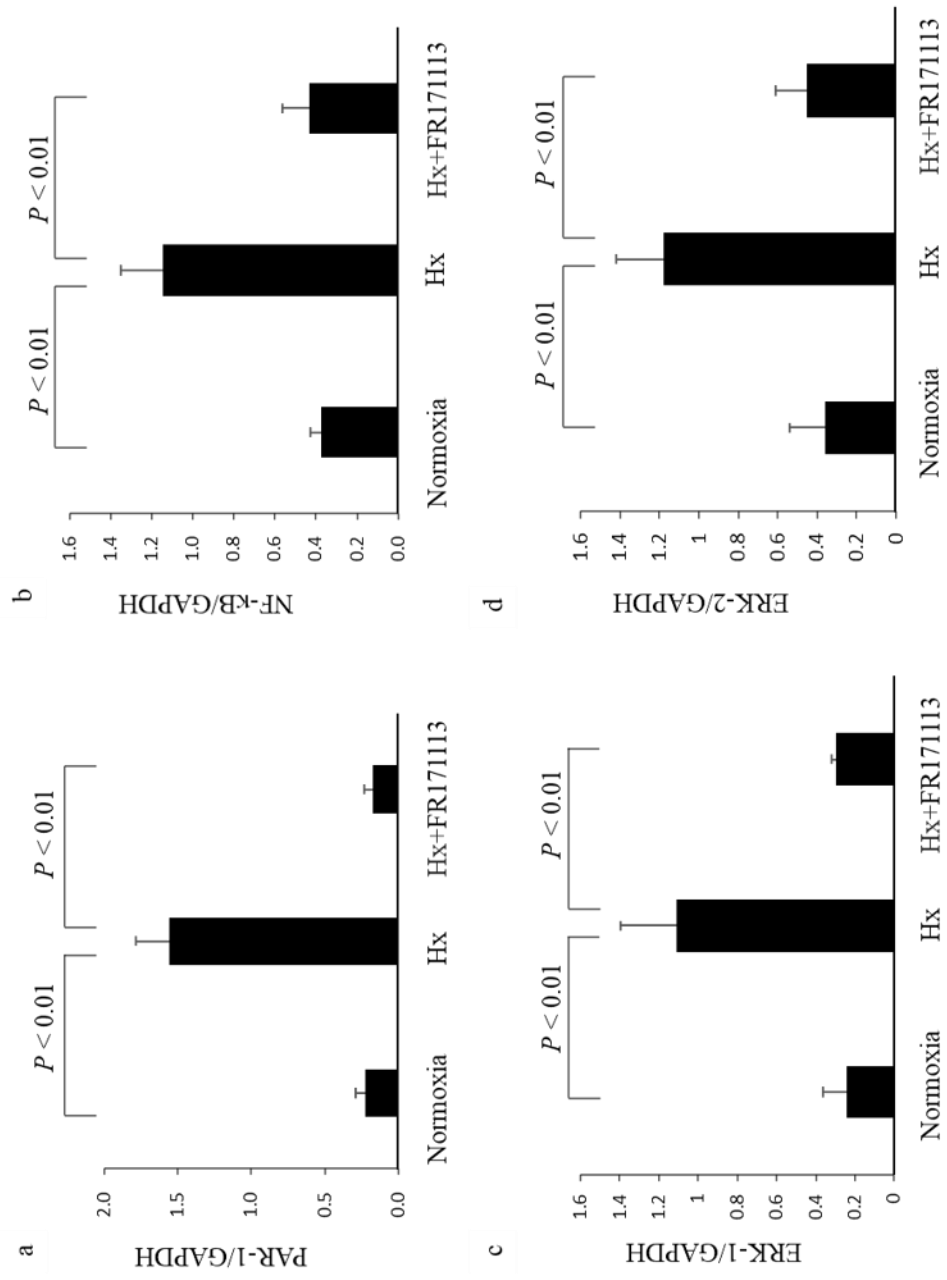


**Figure 1** Light micrographs of superoxide production, 4-HNE-modified protein adducts, cardiomyocyte cross-sectional area, and perivascular fibrosis. Intermittent hypoxia (IH) increased superoxide production (b) and 4-HNE-modified protein adducts (e) in the LV myocardium compared with the normoxia group (a, d). These changes were suppressed by FR171113 (c, f). IH also increased myofiber disarray (h) and perivascular fibrosis (k) in the LV myocardium compared with the normoxia group (g, j). These changes were significantly suppressed by FR171113 (i, l).

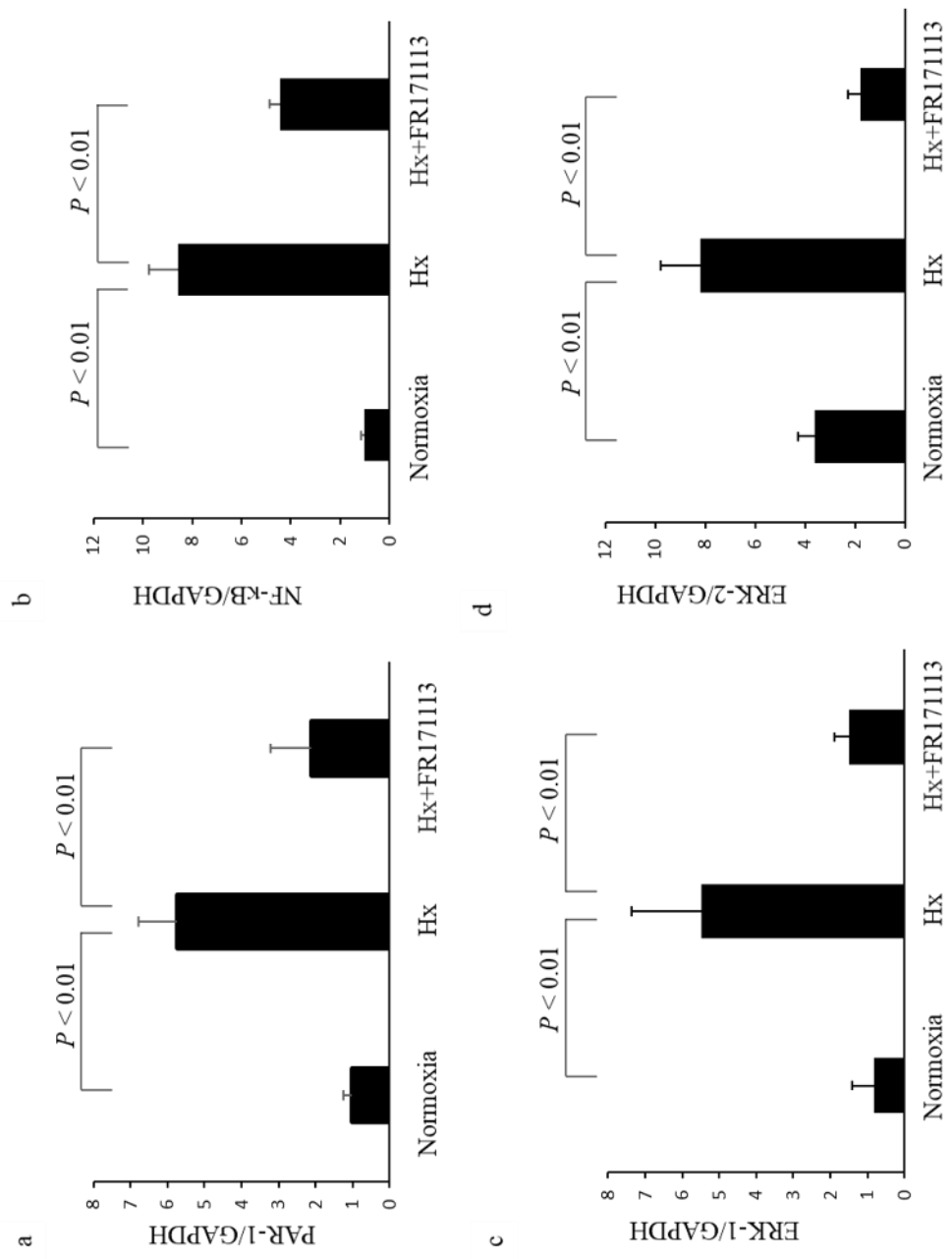




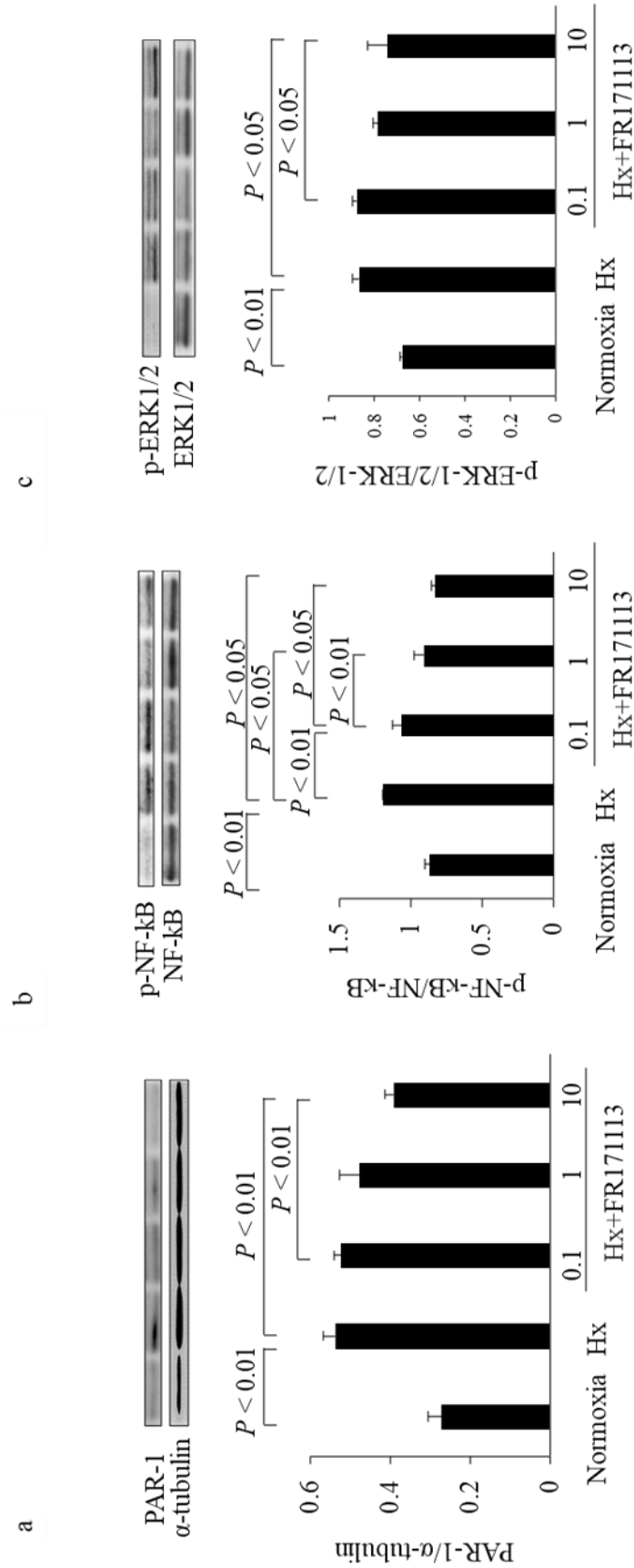
**Figure 2** The quantitative measurement of superoxide production, 4-HNE-modified protein adducts, cardiomyocyte cross-sectional area, and perivascular fibrosis. Intermittent Hypoxia (IH) increased superoxide production (a, n = 4) and 4-HNE-modified protein adducts (b, n = 4) in the LV myocardium compared with the normoxia group. These changes were suppressed by FR171113. IH also significantly increased the cardiomyocyte cross-sectional area (c, n = 4) and perivascular fibrosis (d, n = 4), whereas FR171113 significantly suppressed these changes. Data are shown as the mean and standard deviation (SD).



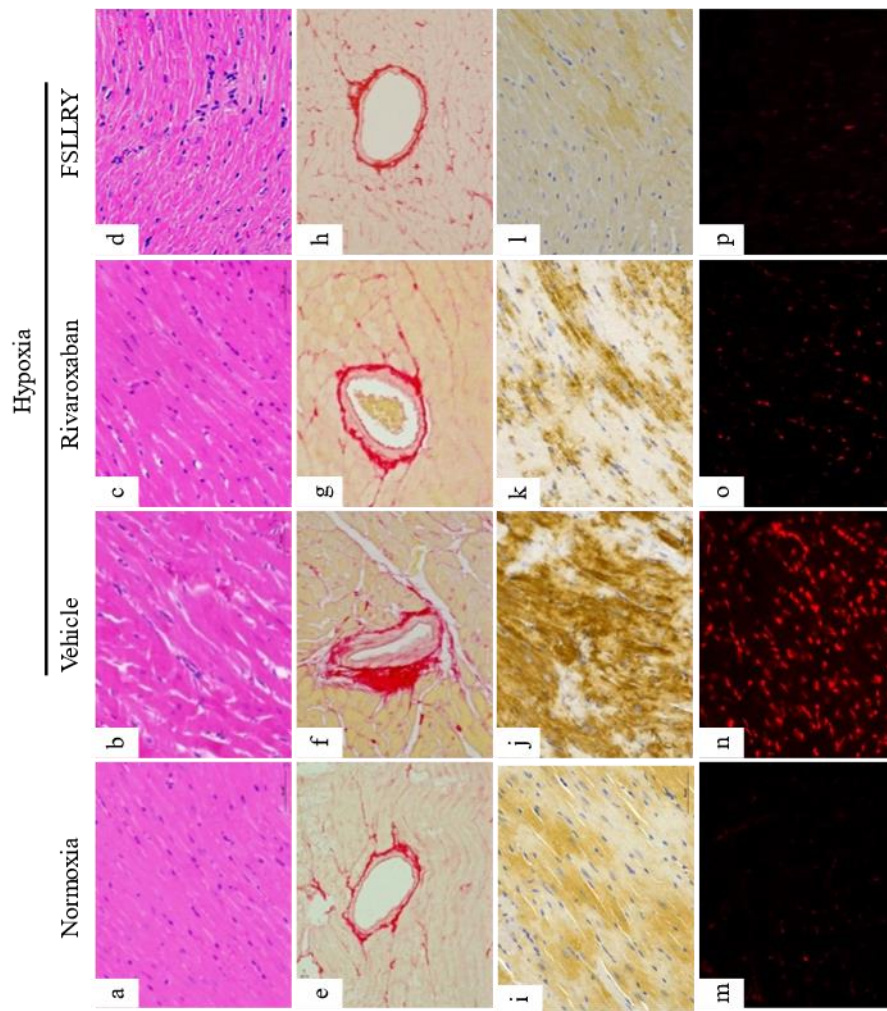
**Figure 3** Expression of PAR-1, NF-kB, ERK-1, and ERK-2 mRNAs in the left ventricular myocardial tissues. Expression of PAR-1 (a, n = 4), NF-kB (b, n=4), ERK-1 (c, n=4), and ERK-2 (d, n = 4) mRNAs in the left ventricular myocardial tissues was increased by intermittent hypoxia. These changes were significantly suppressed by FR171113. Data are shown as the mean and standard deviation (SD).



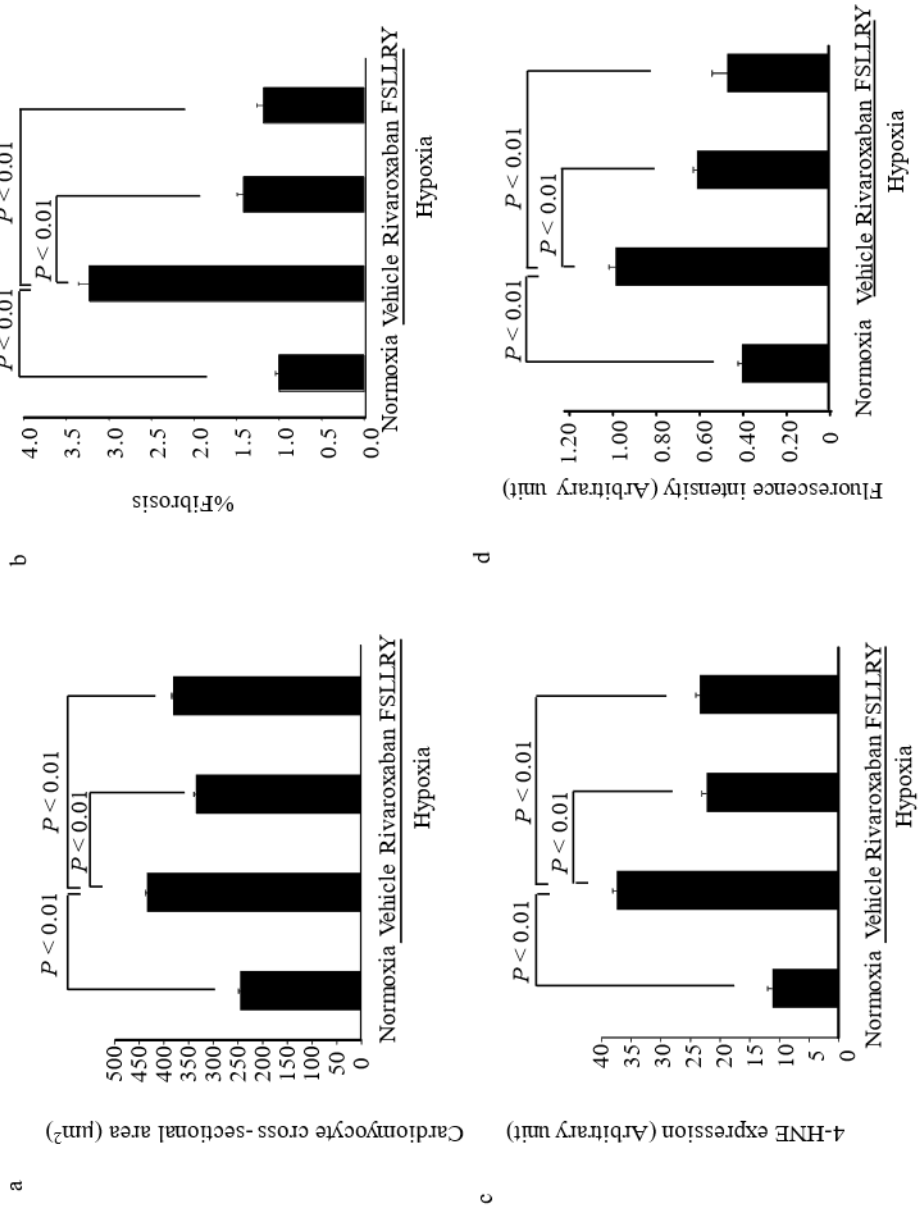
**Figure 4** Expression of PAR-1, NF-kB, ERK-1, and ERK-2 in human cardiac microvascular endothelial cells. Expression of PAR-1 (a, n = 3), NF-kB (b, n = 3), ERK-1 (c, n = 3), and ERK-2 (d, n = 3) mRNAs in human cardiac microvascular endothelial cells was increased by intermittent hypoxia (IH). These changes were significantly suppressed by FR171113. Data are shown as the mean and standard deviation (SD).



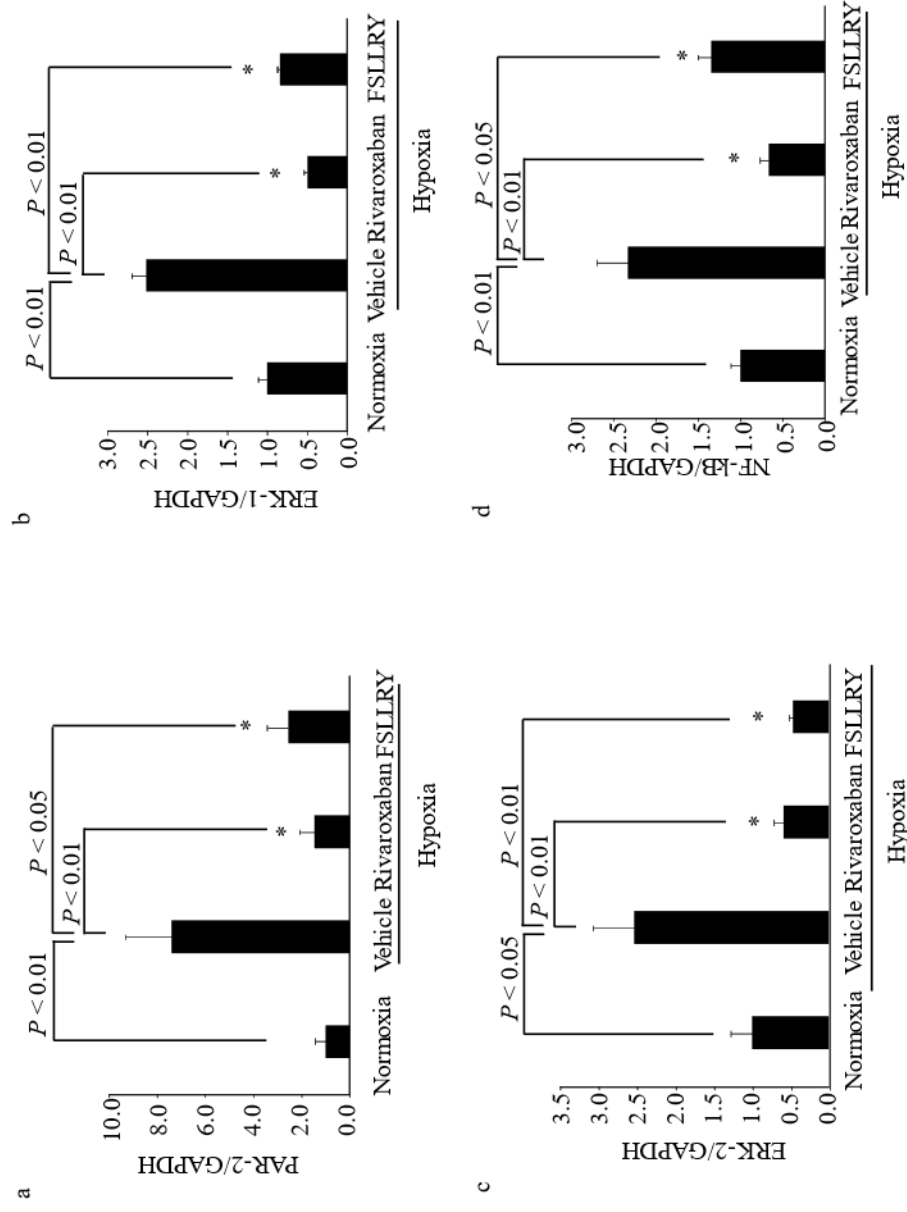
**Figure 5** Expression of PAR-1, NF-kB, and ERK-1/2 proteins in human cardiac microvascular endothelial cells. The ratios of PAR-1 to  $\alpha$ -tubulin (a, n = 3), phosphorylated NF-kB (p-NF-kB) to NF-kB (b, n = 3), and phosphorylated ERK-1/2 (p-ERK-1/2) to ERK-1/2 (c, n = 3) in human cardiac microvascular endothelial cells were increased by intermittent hypoxia. These changes were concentration-dependently suppressed by FR171113, when three different concentrations (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, and 10  $\mu$ M) of FR171113 were used in the Hx-FR171113 group. The ratios of PAR-1 to  $\alpha$ -tubulin, phosphorylated NF-kB (p-NF-kB) to NF-kB, and phosphorylated ERK-1/2 (p-ERK-1/2) to ERK-1/2 in the Hx-FR171113 group (10  $\mu$ M) were all significantly lower than those in the Hx group. Data are shown as the mean and standard deviation (SD).



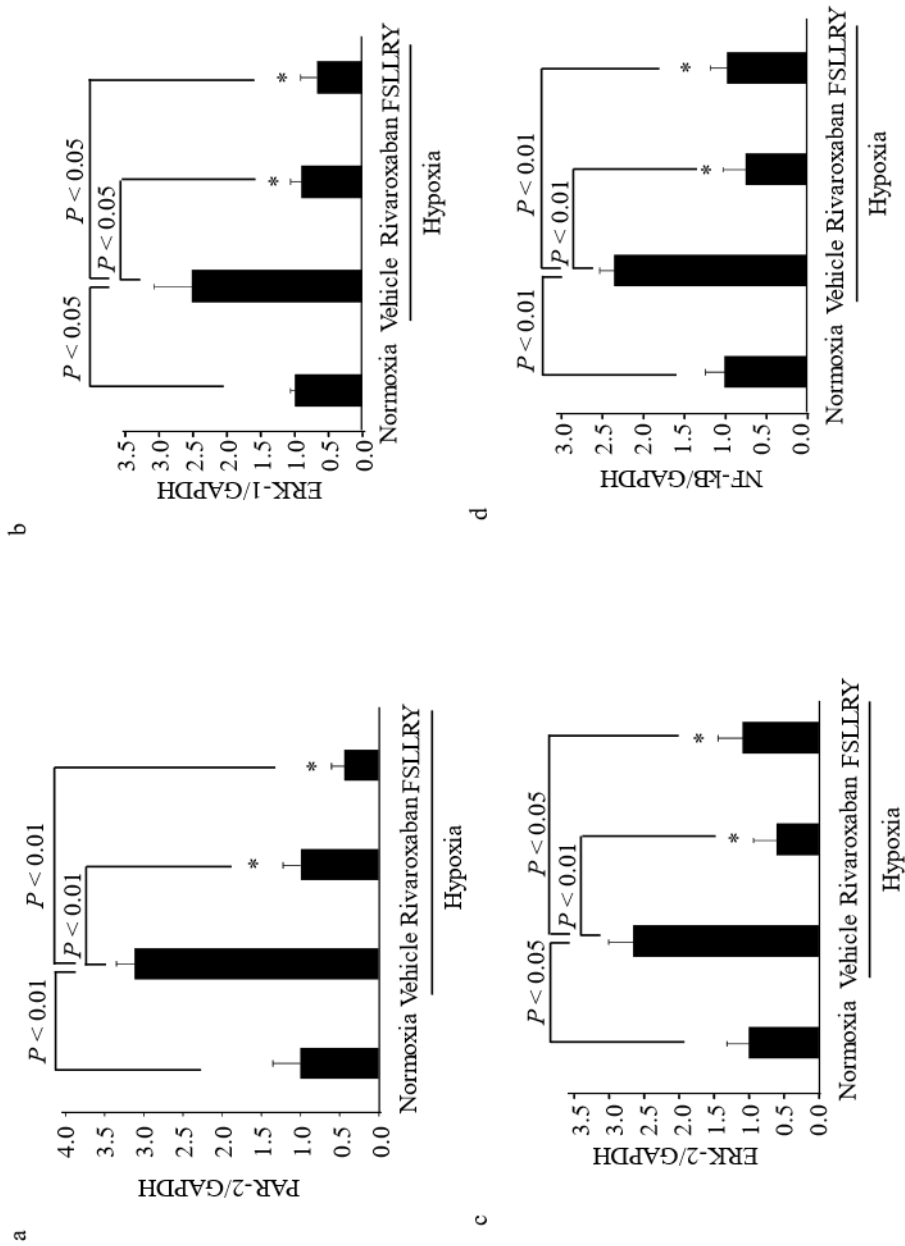
**Figure 6** Light micrographs of cardiomyocyte cross-sectional area, perivascular fibrosis, 4-HNE-modified protein adducts, and superoxide production. Intermittent hypoxia (IH) increased myofiber disarray (b) and perivascular fibrosis (f) in the ventricular myocardium compared with the normoxia group (a, e). These changes were significantly suppressed by rivaroxaban (c, g) and FSLLY (d, h). IH also increased 4-HNE-modified protein adducts (j) and superoxide production (n) in the LV myocardium compared with the normoxia group (i, m). These changes were significantly suppressed by rivaroxaban (k, o) and FSLLY (l, p).



**Figure 7** The quantitative measurement of cardiomyocyte cross-sectional area, perivascular fibrosis, 4-HNE-modified protein adducts, and superoxide production. Intermittent hypoxia (IH) significantly increased the cardiomyocyte cross-sectional area (a) and interstitial fibrosis (b), whereas rivaroxaban and FSLLY significantly suppressed these changes (a, n = 3-6; b, n = 6-8). IH also increased the levels of 4-HNE-modified protein adducts (c) and superoxide production (d) in the LV myocardium significantly, whereas rivaroxaban and FSLLY significantly reversed these changes (c, n = 7-10; d, n = 9-12). Data are shown as the mean and standard error of the mean (SEM).

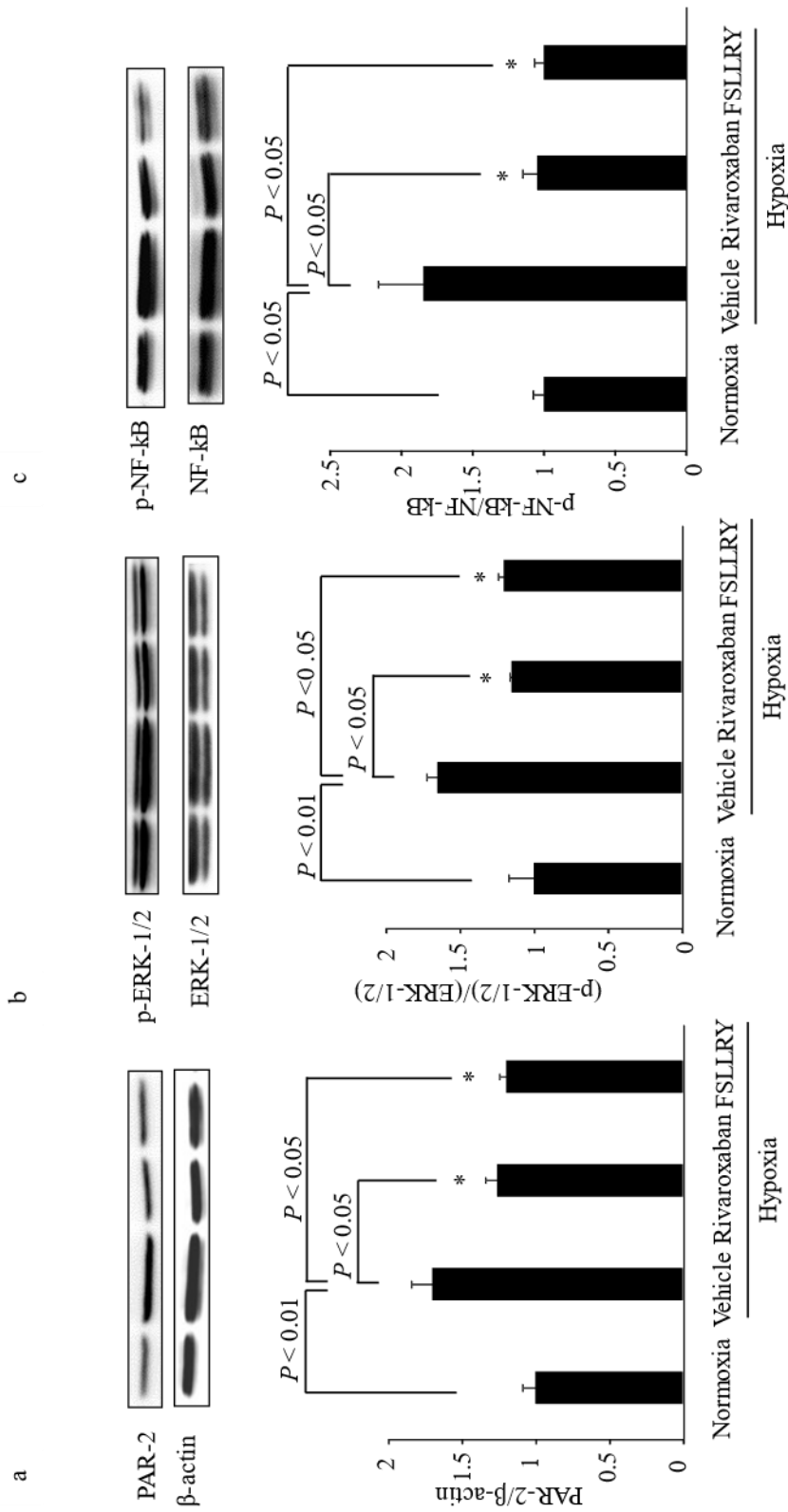


**Figure 8** Expression of mRNAs in right atrial and left ventricular myocardial tissues. Expression of PAR-2 (a, n = 6), ERK-1 (b, n = 6), ERK-2 (n = 6), and NF-kB (d, n = 6) mRNAs in the ventricular myocardial tissue was increased by intermittent hypoxia. These changes were significantly suppressed by rivaroxaban or FSLLY. In each mRNA level, no significant differences were found between the normoxia group and the hypoxia-rivaroxaban group or between the normoxia group and the hypoxia-FSLLY group. Data are shown as the mean and standard error of the mean (SEM). \*Not significant vs. normoxia group.

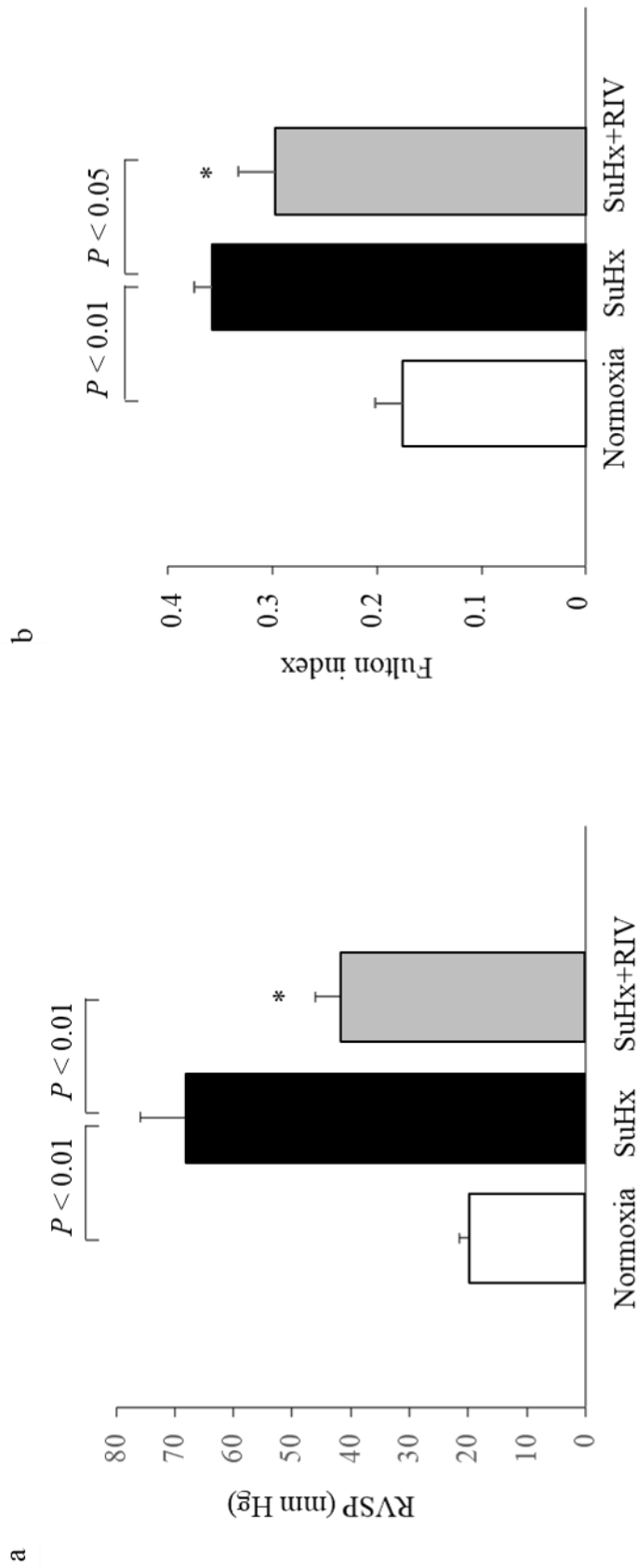


**Figure 9** Expression of mRNAs in human cardiac microvascular endothelial cells. Expression of PAR-2 (a, n = 3-4), ERK-1 (b, n = 3-4), ERK-2 (c, n = 3-4), and NF-kB (d, n = 4-7) mRNAs in human cardiac microvascular endothelial cells was increased by intermittent hypoxia. These changes were significantly suppressed by rivaroxaban or FSLRY. In each mRNA level, no significant differences were found between the normoxia group and the hypoxia-rivaroxaban group or between the normoxia group and the hypoxia-FSLRY group. Data are shown as the mean and standard error of the mean (SEM). \*Not significant vs. normoxia group.

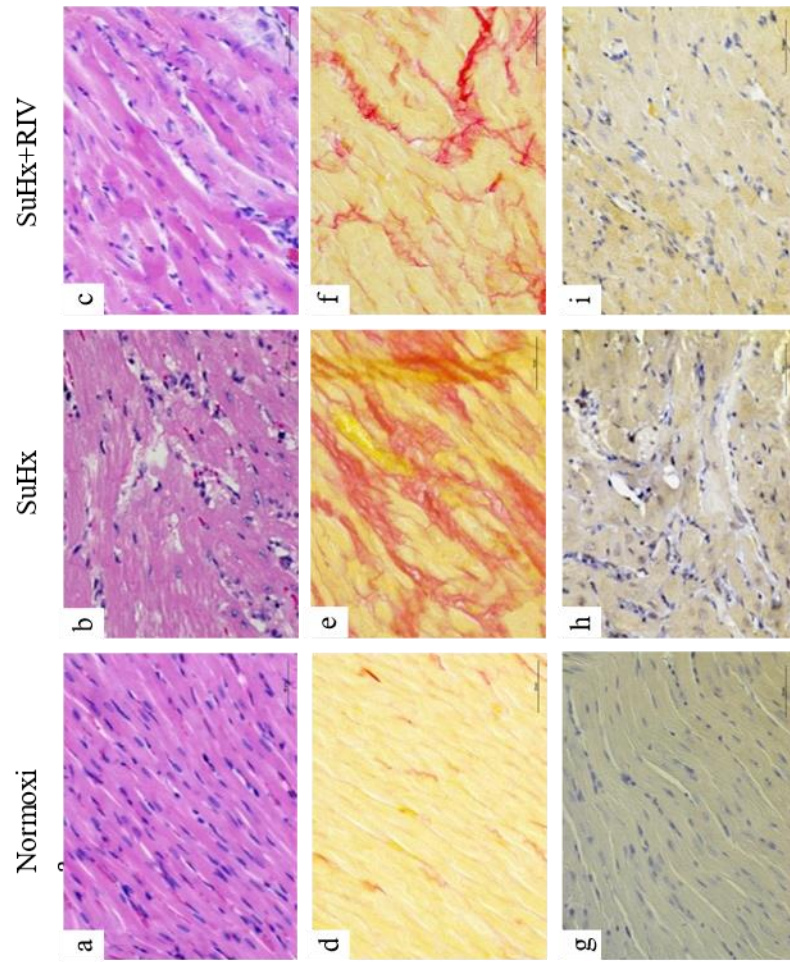




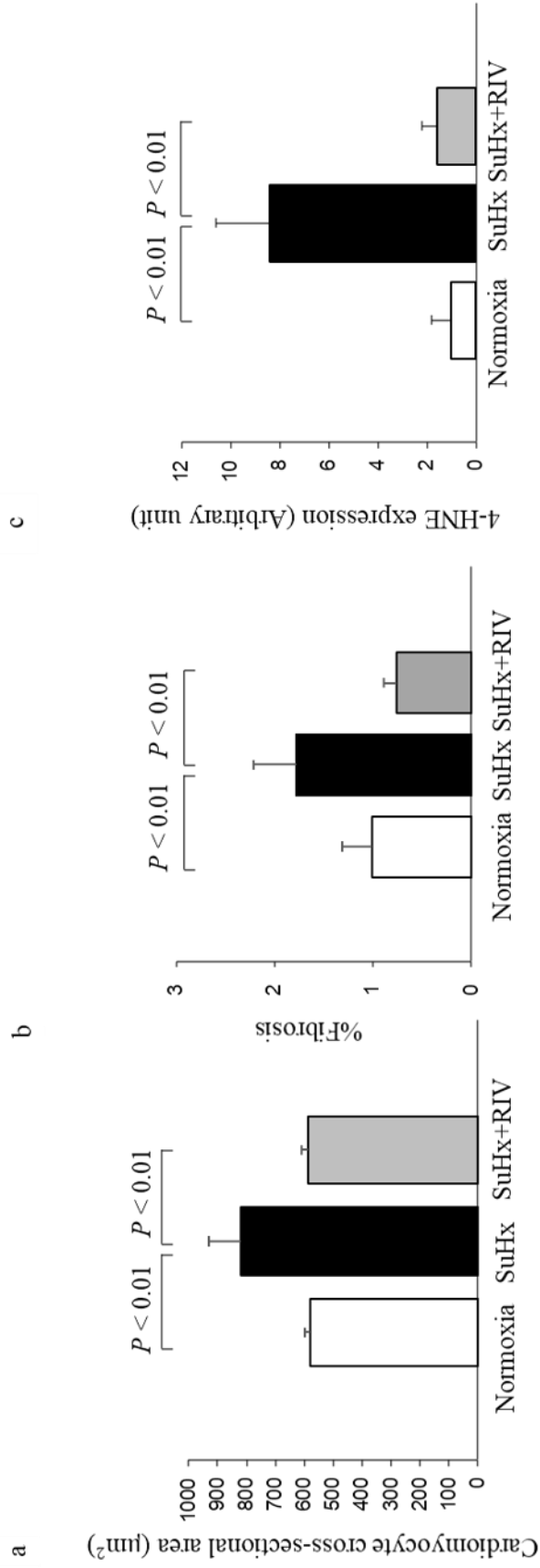
**Figure 10** Expression of PAR-2, ERK-1/2, and NF- $\kappa$ B in human cardiac microvascular endothelial cells. The ratios of PAR-2 to  $\beta$ -actin (a, n = 3), phosphorylated ERK-1/2 (p-ERK-1/2) to ERK-1/2 (b, n = 3), and phosphorylated NF- $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B) to NF- $\kappa$ B (c, n = 3) in human cardiac microvascular endothelial cells were increased by intermittent hypoxia. These changes were significantly suppressed by rivaroxaban or FSLRLY. In each of the ratios, no significant differences were found between the normoxia group and the hypoxia-rivaroxaban group or between the normoxia group and the hypoxia-FSLRLY group. Data are shown as the mean and standard error of the mean (SEM). \*Not significant vs. normoxia group.



**Figure 11** Right ventricular (RV) systolic pressure (a) and Fulton index (b). Echocardiography assessment showed that Sugen5416 and hypoxia (SuHx) significantly elevated RV systolic pressures. RV systolic pressure was significantly decreased by rivaroxaban (RIV) (n = 4). Increased Fulton index was significantly suppressed by RIV (n = 4). Treatment of Rivaroxaban showed modest effect on the RV dilatation, although RV dysfunction was improved in Table 3. Data are shown as the mean and standard deviation (SD). \* $P < 0.01$ , vs Normoxia.

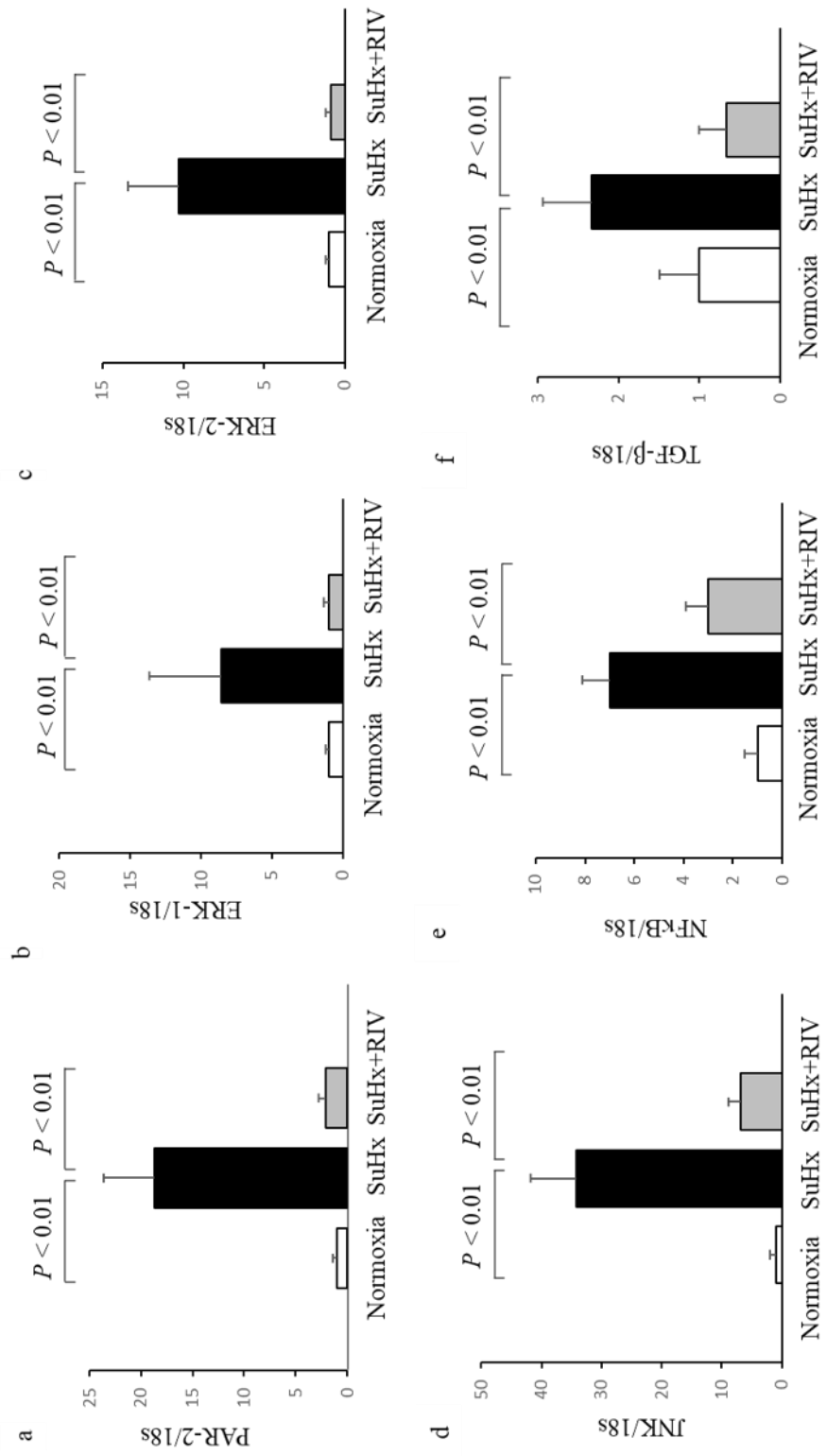


**Figure 12** Hematoxylin and eosin (HE) staining (a, b, c), Sirius red staining (d, e, f), and immunohistochemical staining for 4-HNE-modified protein adducts (g, h, i) of rat right ventricle. In comparison with the Normoxia group (a, d, g), subcutaneous injection of Sugen 5416 and exposure to hypoxia (SuHx) caused severe degeneration of RV myocardium, including hypertrophy of cardiomyocytes, myofiber disarray and scarcity of myofibers with mononuclear cellular infiltration (b), increased interstitial fibrosis (e), and 4-HNE-modified protein adducts (h) in the right ventricular myocardium. Treatment with rivaroxaban led to suppression of these changes (SuHx+RIV) (c, f, i).

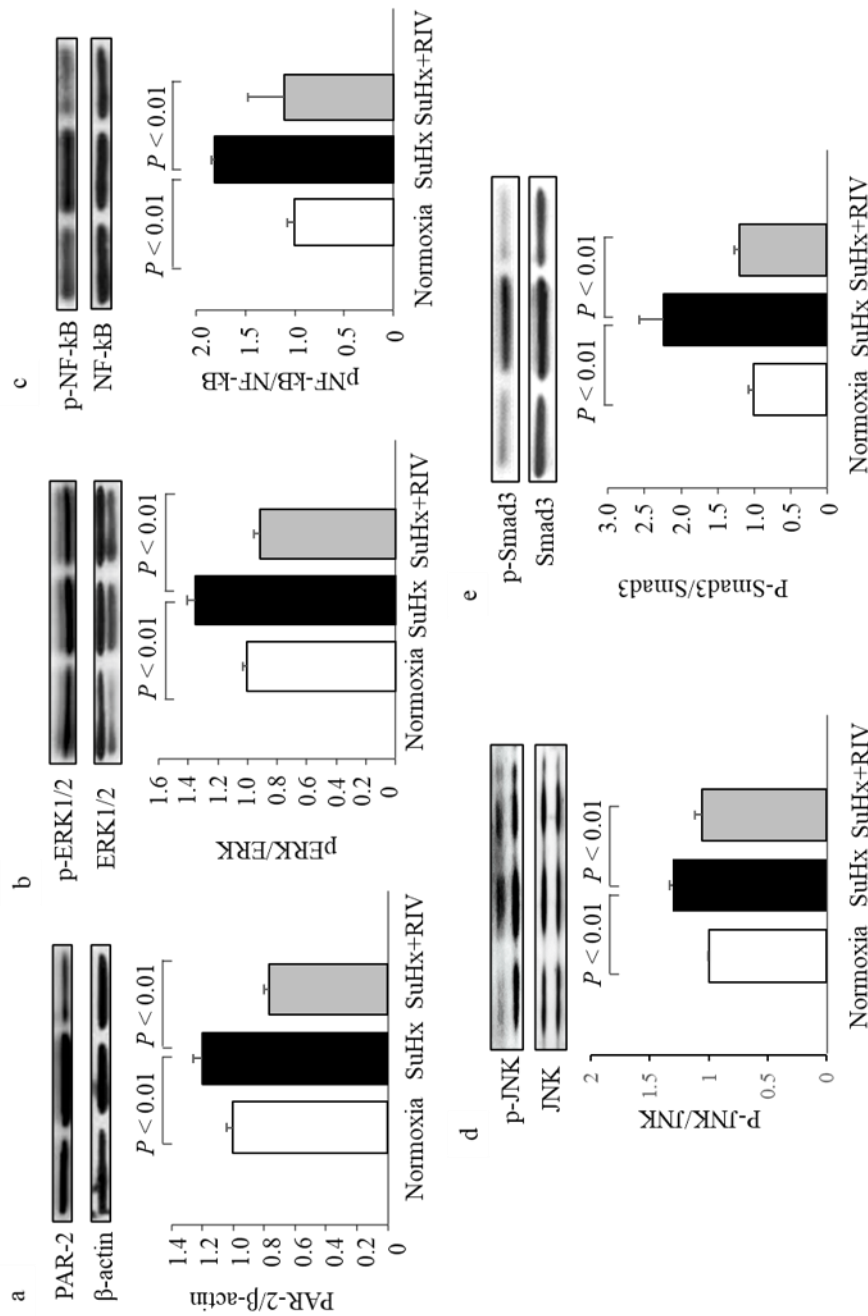


**Figure 13** Quantitative measurement of cardiomyocyte cross-sectional area, interstitial fibrosis, and 4-HNE-modified protein adducts.

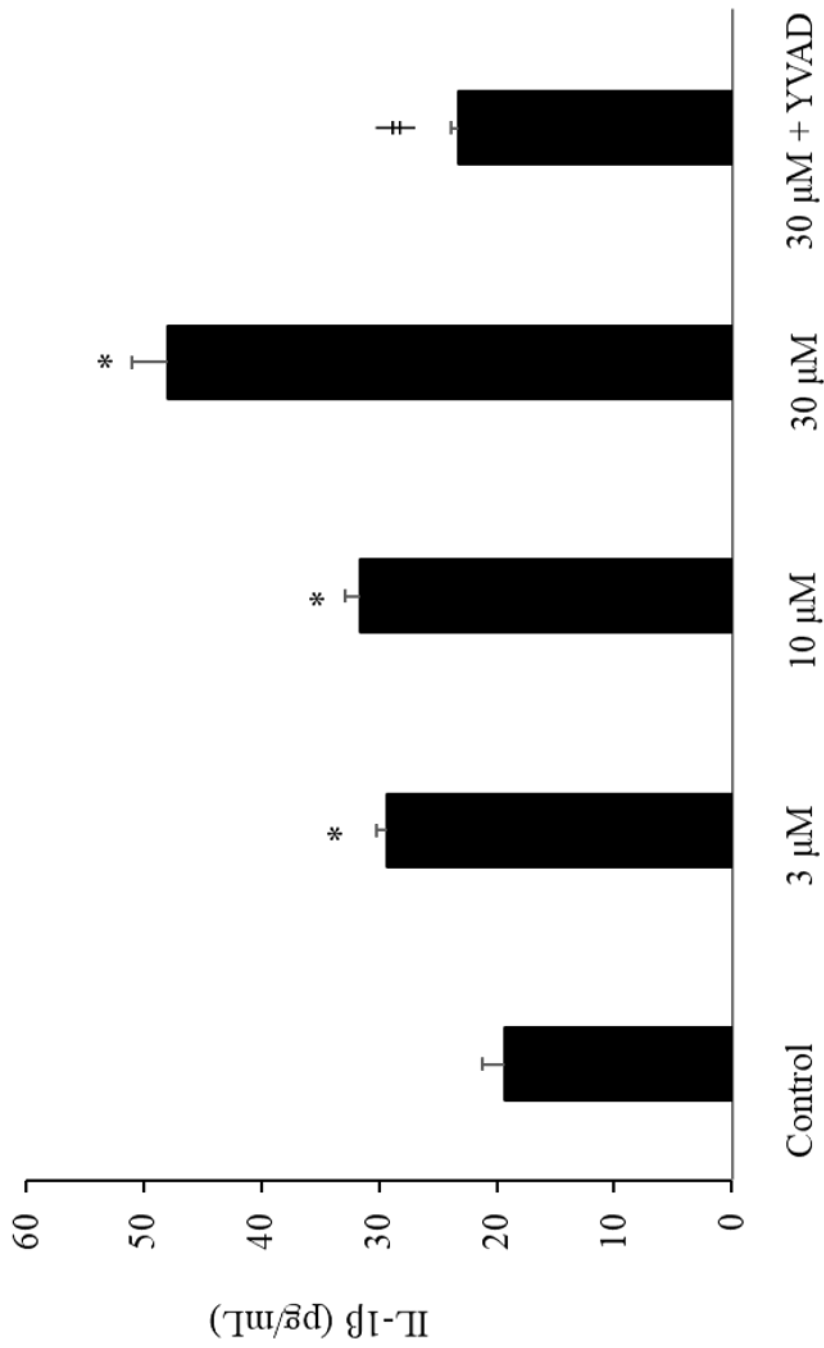
Subcutaneous injection of Sugen5416 and exposure to hypoxia (SuHx) significantly increased the cross-sectional area of the cardiomyocyte (a), degree of interstitial fibrosis (%fibrosis) (b), and 4-HNE-modified protein adducts (c) in the right ventricular myocardium. Rivaroxaban showed significant suppression of these changes (a,  $n = 3-4$ ; b,  $n = 3$ ; c,  $n = 3-5$ ). Data are shown as the mean and standard deviation (SD).



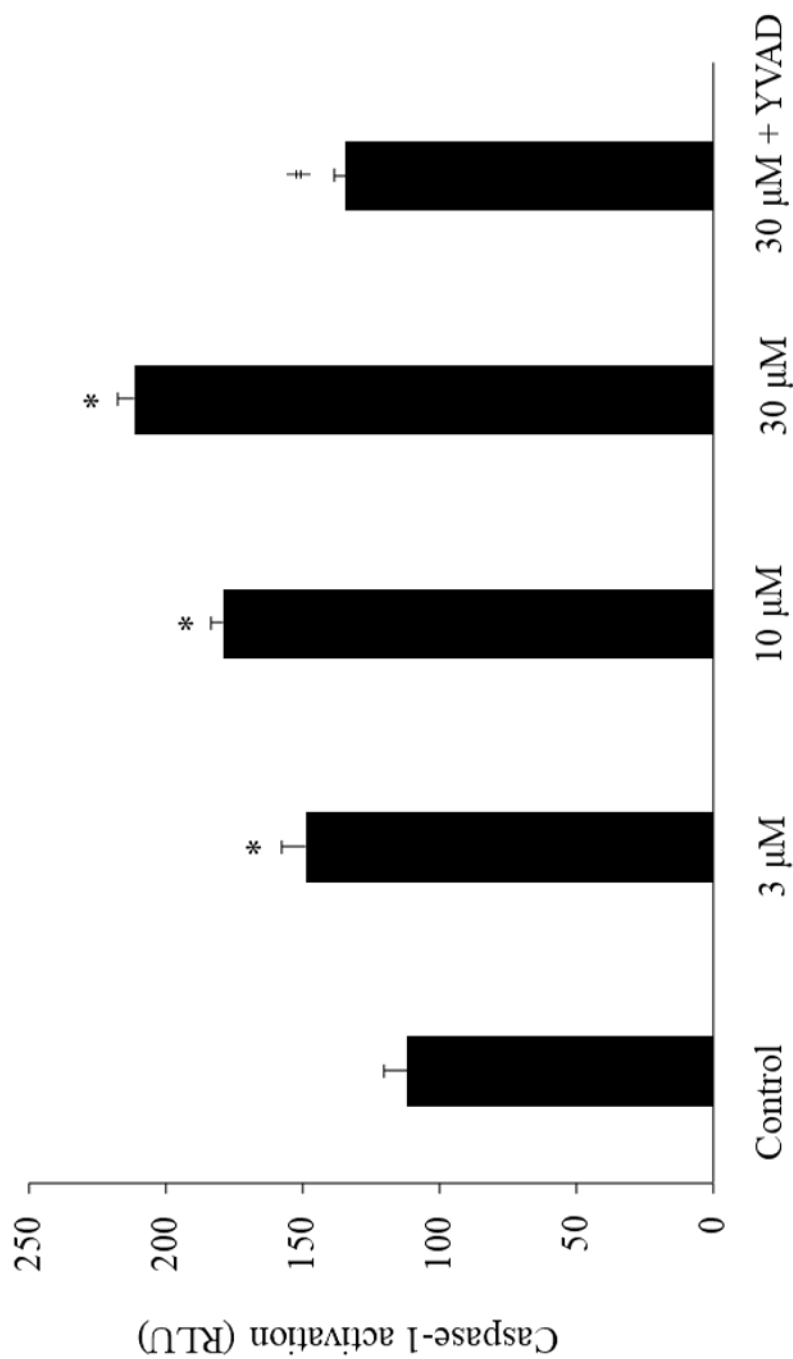
**Figure 14** Quantitative mRNA analysis using real-time RT-PCR in right ventricular (RV) myocardial tissue. In the RV myocardial tissue, expression of PAR-2 (a, n = 3-6), ERK-1 (b, n = 4-5), ERK-2 (c, n = 4-5), JNK (d, n = 3), NF-κB (e, n = 3-6), and TGF-β (f, n = 3) mRNAs was increased when administered Sugen<sup>5416</sup> under hypoxic condition (SuHx). These mRNAs were significantly downregulated through treatment with rivaroxaban (RIV). The expression of each mRNA in the Normoxia group was not significantly different from that of the SuHx+RIV group. Data are shown as the mean and standard deviation (SD).



**Figure 15** Protein expression analysis by Western blot in human cardiac microvascular endothelial cells (HCMECs). In HCMECs, the ratio of protein expression of PAR-2 to  $\beta$ -actin (a,  $n = 3$ ) was increased by treatment with Sugen5416 and exposure to hypoxia (SuHx). The ratios of phosphorylated proteins to unphosphorylated proteins in ERK-1/2 (b,  $n = 3$ ), NF- $\kappa$ B (c,  $n = 3$ ), JNK (d,  $n = 3$ ), and Smad3 (e,  $n = 3$ ) were increased by treatment with Sugen5416 and exposure to hypoxia (SuHx). PAR-2 expression was significantly downregulated by treatment with rivaroxaban (RIV). Phosphorylation of ERK-1/2, NF- $\kappa$ B, JNK, and Smad3 was significantly downregulated by treatment with RIV. Data are shown as the mean and standard deviation (SD).

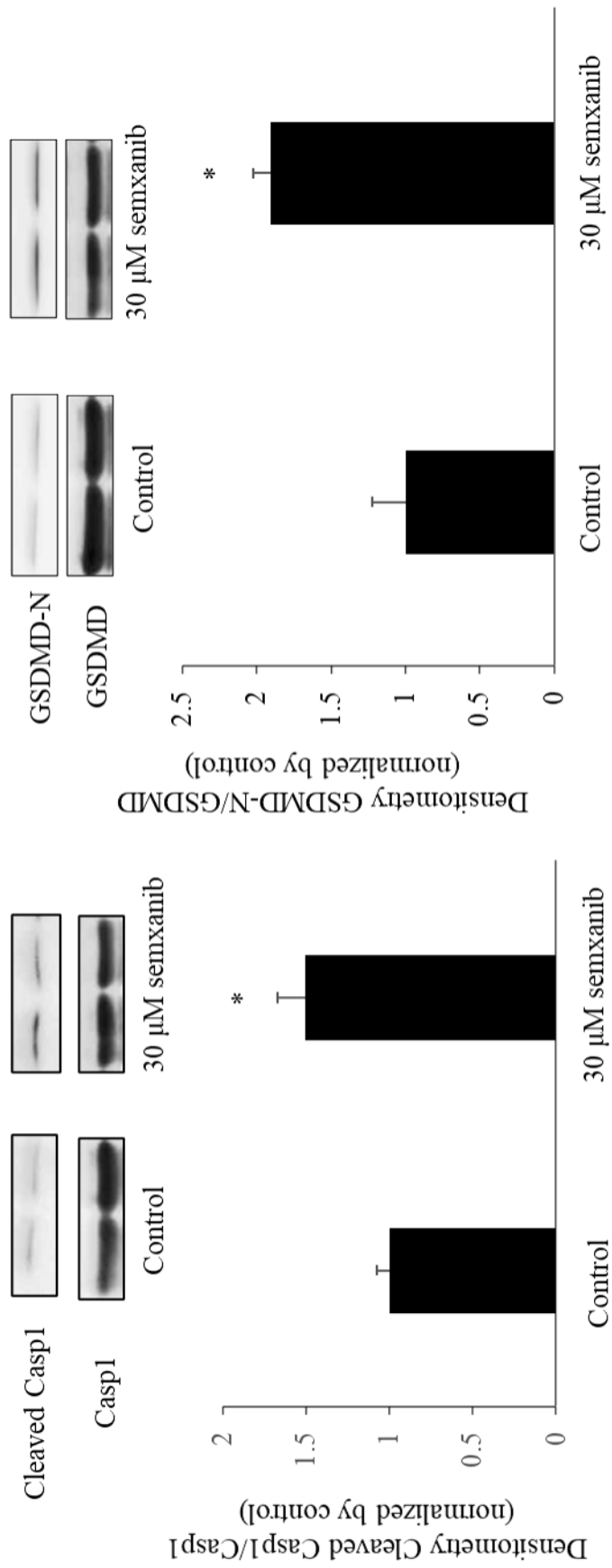


**Figure 16** Levels of IL-1 $\beta$  secreted by THP-1-derived macrophages in response to 24 h of treatment with semaxanib with or without a caspase-1 inhibitor, Ac-YVAD-CHO (YVAD). Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, \* $P < 0.05$ , compared with Control; † $P < 0.05$ , compared with 30  $\mu$ M. n = 3-4.

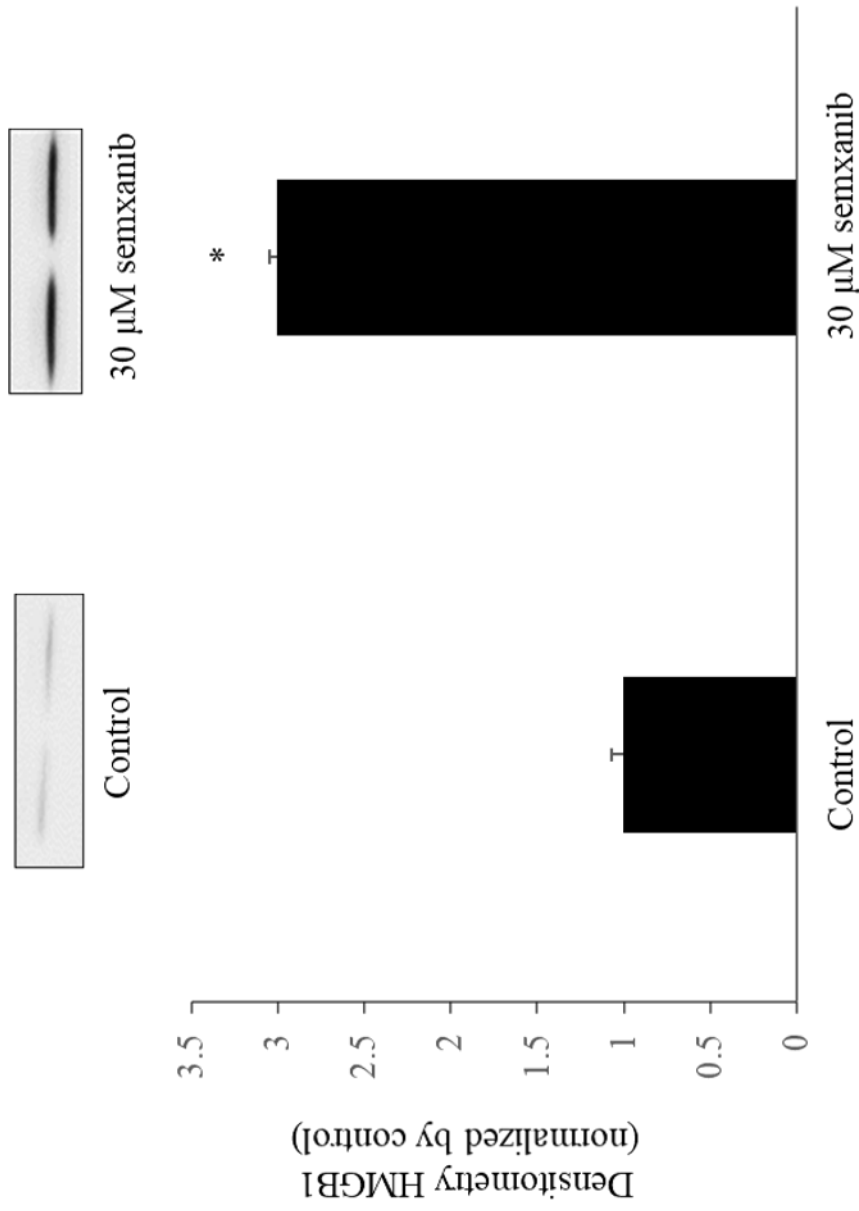


**Figure 17** Caspase-1 activity of THP-1-derived macrophages in response to incubation for 24 h with semaxanib with or without a caspase-1 inhibitor, Ac-YVAD-CHO (YVAD). Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, \* $P < 0.05$ , compared with Control; † $P < 0.05$ , compared with 30  $\mu\text{M}$ . n = 3-6.





**Figure 18** Caspase-1 and Gasdermin D (GSDMD) in macrophage derived THP-1 cells incubated with semxanib. Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, \* $P < 0.05$ , compared with Control,  $n = 3$ .



**Figure 19** High mobility group box 1 (HMGB1) secretion to culture medium from macrophage-derived THP-1 cells incubated with semaxanib. Statistical significance was determined using the Tukey multiple comparison tests, \* $P < 0.05$ , compared with Control,  $n = 3$ .

Table 1 Echocardiography parameters

	Dd (mm)	Ds (mm)	IVST (mm)	PWT (mm)	LVM (mg)	e' (cm/s)	E/e'	EF (%)
Normoxia	3.75 ± 0.16	2.78 ± 0.11	0.44 ± 0.01	0.44 ± 0.02	39.1 ± 2.1	2.65 ± 0.27	24.9 ± 0.38	56.9 ± 0.7
Hx	3.84 ± 0.26	2.86 ± 0.19	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.00	42.2 ± 4.7	2.03 ± 0.32	30.7 ± 3.02*	53.7 ± 2.8
Hx + FR171113	3.75 ± 0.11	2.88 ± 0.08	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.02	38.5 ± 1.3	2.26 ± 0.02	26.1 ± 1.17 <sup>‡</sup>	52.0 ± 1.2

Dd, left ventricular (LV) end-diastolic diameter; Ds, LV end-systolic diameter; IVST, interventricular septum thickness; PWT, posterior

LV wall thickness; LVM, LV mass; E, early rapid filling wave of mitral inflow velocity; e', early velocity of the mitral annulus; EF, LV ejection fraction; Hx, hypoxia. LVM was calculated using the following formula:  $LVM = 0.8 \times \{1.04 \times [(Dd + IVST + PWT)^3 - (Dd)^3]\} + 0.6$ .

Data are shown as the mean ± SD (n = 3-4). \*P < 0.05, compared with Normoxia. <sup>‡</sup>P < 0.05, compared with Hx.

Table 2 Echocardiography parameters

	Dd (mm)	Ds (mm)	e' (cm/s)	E/e'	EF (%)
Normoxia	3.48 ± 0.18	2.60 ± 0.17	3.01 ± 0.49	22.3 ± 1.85	59.4 ± 1.43
Hypoxia, vehicle	3.54 ± 0.09	2.47 ± 0.07	2.09 ± 0.10	29.8 ± 1.88*	56.4 ± 0.52
Hypoxia, rivaroxaban	3.72 ± 0.06	2.84 ± 0.06	2.55 ± 0.21	24.6 ± 1.37	55.8 ± 1.32
Hypoxia, FSLRLRY	4.05 ± 0.13*	2.96 ± 0.23	2.41 ± 0.12	25.1 ± 1.45	54.6 ± 0.23

Dd, LV end-diastolic diameter; Ds, LV end-systolic diameter; E, early rapid filling wave of mitral inflow velocity; e', early velocity of

the mitral annulus; EF, LV ejection fraction. Data are shown as the mean ± SEM (n = 4-5). \*P < 0.05, compared with normoxia.

Table 3 Echocardiographic parameters

Group	IVS (mm)	PW (mm)	FS (%)	FAC (%)	TAPSE (mm)	RV Tei index
Normoxia	1.04 ± 0.01	1.08 ± 0.02	39.6 ± 2.9	42.7 ± 0.8	2.65 ± 0.31	0.21 ± 0.03
SuHx	1.61 ± 0.18*	1.62 ± 0.18*	46.4 ± 2.9	31.6 ± 2.3*	1.45 ± 0.32	0.66 ± 0.16*
SuHx + RIV	1.42 ± 0.03*	1.44 ± 0.08*	43.4 ± 8.9	35.5 ± 5.8	2.19 ± 0.86	0.37 ± 0.10†

IVS, interventricular septum; PW: left ventricular posterior wall thickness; FS, fractional shortening; FAC, fractional area change; RV

Tei index, right ventricular total ejection isovolume index; LVEF, left ventricular ejection fraction; TAPSE, tricuspid annular plane

systolic excursion. Data are shown as the mean ± SD (n = 3). \*P < 0.05, vs Normoxia; †P < 0.05, vs SuHx.