

氏名	ながた あさひ 永田 旭		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第1867号		
学位授与の日付	令和3年3月16日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）		
学位論文題目	Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX1 attenuate hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension (NCX1 の遺伝子欠損ならびに薬理的阻害は低酸素誘発肺高血圧症を軽減する)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	岩崎 昭憲
	(副査) 福岡大学	教授	藤田 昌樹
	福岡大学	教授	三浦 伸一郎
	福岡大学	講師	沼田 朋大

内容の要旨

【目的】

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は肺動脈圧の上昇と血管リモデリングを特徴とし、終末期に右心不全に至る進行性・難治性疾患である。近年、いくつかの血管拡張薬が PAH の進行抑制のために使用されているが、その治療効果は未だ満足できるものではなく、新規治療薬の開発が望まれている。PAH 患者の肺組織では、肺小動脈壁の肥厚、新生内膜、叢状病変（plexiform lesion）などの病理学的所見が認められる。これらの病的変化は遺伝的要因のみならず、低酸素や炎症などの環境的要因によっても惹起される。これまで、低酸素曝露による PAH モデルを中心とした動物実験により、PAH の発症機序の研究が行われてきた。低酸素曝露された肺動脈では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の制御異常により肺動脈の過収縮やリモデリングが惹起されることが示されているが、その詳細な分子機序は未だ明確になっていない。

1 型 Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体（NCX1）は、血管平滑筋細胞の Ca^{2+} シグナル形成や Ca^{2+} ホメオ

スタシスに關与する重要な Ca^{2+} 輸送体である。最近、特發性 PAH 患者由来の肺動脈平滑筋細胞において、NCX1 発現が増大していることが報告されているが、その病態形成における役割は不明である。そこで、本研究では、NCX1 遺伝子欠損マウスおよび特異的 NCX1 阻害薬を用いて、低酸素誘發 PAH の發症・進展における NCX1 の病態生理学的意義について検討した。

【対象と方法】

C57BL/6J 系統の野生型マウス (WT マウス) および NCX1 ヘテロ欠損マウス (NCX1-KO マウス) を用いて、低酸素誘發 PAH モデル (10%酸素、4 週間飼育) を作製し、右室収縮期圧、右室心重量比 (右室/左室+中隔壁)、肺小動脈筋性を測定した。また、Real-time PCR により肺動脈の NCX1 および血管リモデリング因子の遺伝子発現量、免疫染色により肺組織の NCX1 発現局在を解析した。さらに、WT マウスを用いた低酸素誘發 PAH モデルに特異的 NCX1 阻害薬 (SEA0400) を 4 週間投与し、PAH の病態形成に及ぼす影響を検討した。

【結果】

低酸素飼育 (10%酸素、4 週間) した WT マウスの肺動脈では、血管リモデリング因子 (HIF-1 α 、TGF- β 1、Basigin) とともに、NCX1 の遺伝子発現が増加していた。また、免疫染色により肺組織の NCX1 発現分布を調べたところ、肺動脈に高発現していることを確認した。低酸素飼育した WT マウスの右室収縮期圧は通常酸素飼育した WT マウスに比較して有意に上昇し、また、右室心重量比も有意に増大し、PAH モデルとしての病態形成が認められた。一方、全身性に NCX1 発現が半減している NCX1-KO マウスを用いて、同様の低酸素誘發 PAH モデルを作製したところ、右室収縮期圧は上昇するものの、WT マウスの同モデルに比較して有意に軽度であった。また、右室心重量比は増加傾向を示したが、有意な変化ではなかった。次に、WT マウスの低酸素誘發 PAH モデルに特異的 NCX1 阻害薬

SEA0400 を投与したところ、右室収縮期圧の上昇は有意に抑制された。右室心重量比の増大に対しては軽度の抑制傾向を示した。興味深いことに、SEA0400 は低酸素誘発 PAH モデルの肺小動脈血管数には影響しなかったが、肺小動脈筋性を有意に抑制した。

【結論】

本研究では、低酸素誘発 PAH モデルマウスの肺動脈において NCX1 が高発現していること、また、遺伝子欠損や特異的阻害薬により NCX1 を機能抑制すると、低酸素誘発 PAH モデルの病態形成（右室収縮期圧の上昇、右室肥大、肺小動脈筋性化）が抑制されることを明らかにした。これらの知見は、低酸素誘発 PAH の発症・進展には、NCX1 の機能亢進が関与することを示唆している。NCX1 を標的とした特異的阻害薬や核酸医薬は、PAH 治療の新たなアプローチになり得ると考えられる。

審査の結果の要旨

本論文は、難治性・致死性疾患である肺高血圧症の病態生理において近年特に注目されている Ca^{2+} シグナルの関与の検討と、同シグナルをターゲットとした治療開発を目指し、1 型 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) 遺伝子欠損マウス (KO マウス) 及び NCX1 特異的阻害剤 (SEA0400) を用いて、肺動脈性肺高血圧症 (PAH) における NCX1 の機能的役割を解析した研究である。PAH の代表的モデル動物である低酸素誘発肺高血圧マウスを作成し検討したところ、以下の 3 つの結果を得た。①野生型マウス (WT マウス) 肺動脈で NCX1 発現が亢進する、②KO マウスではモデル動物における肺高血圧の指標である右室収縮期圧 (RVSP) 上昇が WT マウスと比較して有意に軽減し、右心負荷の指標である右室心筋重量比 (RV/(LV+S)) に関しても軽度の増大にとどまる、③WT マウスへ SEA0400 を持続全身投与し NCX1 を薬理的に阻害すると、RVSP 上昇は対照群と比較して有意に抑制され、RV/(LV+S) も軽度の抑制傾向を示す。さらに、PAH のリモデリングの指標である肺小動脈の筋性化が有意に抑制される。これらの結果は NCX1 の PAH 病態形成における機能的な重要性を示している。NCX1 は PAH の新しい創薬標的となることが期待される。

1. 斬新さ

これまで PAH における NCX1 の関与の検討は *in vitro* にとどまっておき、モデル動物や特異的阻害剤を用いた検討は行われていなかった。本研究はモデル動物を用いて PAH において NCX1 が病態促進的に働くこと、ならびに、NCX1 特異的阻害剤である SEA400 が機能的並びに組織学的に病的変化を抑制しうることを初めて明らかにした。

2. 重要性

近年、PAH の病態形成における Ca^{2+} シグナリングの関与が盛んに研究されている。本研究は細胞内外の Ca^{2+} シグナリングにおいて単独あるいは他のイオントランスポーターと共同で重要な役割を果たす NCX1 の PAH における機能的役割を、モデル動物を用いて解明した点で重要である。また、将来的には NCX1 は PAH の新しい創薬標的になること、既存の NCX 阻害剤の臨床応用が進むことが期待される。

3. 実験方法の正確性

本研究では NCX1 遺伝子欠損マウスならびに NCX1 特異的阻害薬の 2 種の研究ツールを用いて、代表的な PAH モデルである低酸素誘発肺高血圧モデルを作成し PAH における NCX1 の機能的役割を解明した。野生型マウスにおける低酸素誘発肺高血圧モデルでは NCX1 の発現亢進が得られたこと、また、NCX1 遺伝子欠損マウスを用いた実験と NCX1 特異的阻害剤の全身投与では病的変化が抑制されたことは理論的にも矛盾せず、各実験結果間の整合性が保たれており十分な正確性が担保されていると考えられる。

4. 表現の明瞭性

本研究で得られたデータは写真や図表を用いて視覚的に理解しやすく示しており、また、研究目的、実験結果、考察は結論に向かい一貫した論調で簡潔かつ明瞭に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q：NCX1 ホモ欠損マウスではなくヘテロ欠損マウスを用いた理由はなにか？

A：NCX1 のホモ欠損マウスは胎生致死であるためヘテロ欠損マウスを用いた

Q：蛋白レベルでの NCX1 発現の検討は行ったか？

A：ウェスタンブロットを実施はしているが明瞭な図を得られず、免疫抗体法と RT-PCR の結果を論文で使用した。

Q：論文中で HE 染色による免疫染色ではなく蛍光抗体法による免疫染色を用いた理由はなにか？

A：肺小動脈の筋性化の画像解析ソフトを用いた評価にあたり、先行論文も参考にして、蛍光抗体法の方が定量評価に適すると判断した。

Q：HE染色でははっきりと認識できるような病的変化ではないということか？

A：そのとおりで、本研究に用いたモデルでは6段階のPAHの病理のうち、比較的弱い段階の変化しか得られない。

Q：低酸素飼育期間を長く設定することでより強い変化がもたらされるのではないか？

A：先行論文では、低酸素飼育期間を延長しても強い変化は示されていない

Q：先行論文ではラットを用いたより重症のPAHモデルがあるようだがそういったモデルでの検討は行っていないか？

A：論文中には示していないが、ご指摘のモデル(SuHxラット)の標本を用いてのNCX1の関与の検討も行っている。

Q：SEA0400の治療効果は、既存のPAH治療薬と比べてどうであると推測されるか？

A：例えばエンドセリン受容体拮抗薬などと比べたときに、そのより下流に位置するCa²⁺シグナル全体を阻害することを考えると、より強いのではないかという印象を持っている。

Q：血管平滑筋のNCX1阻害が全身（例えば大動脈など）に及ぶことの影響はあるか？

A：全身血圧に関する予備検討を行っているが、野生型と比較して明らかな変化は見られなかった。

Q：NCX1の抑制の影響は病的変化が強いほど強力に出てくるように思われるが、より強いPAHモデルでの検討も必要ではないか？

A：ご指摘の通りで、より重症の疾患モデルとして前述のSuHxラットが確立されており、今後はそういったモデルでのNCX1阻害の効果の検討が必要と考えている。ただ、今回はNCX1遺伝子改変動物を用いた実験系であり、遺伝子改変にはマウスのほうが適していると考えたためマウスを用いた疾患モデルで実施した。

Q：低酸素飼育の条件を10%、4週間に設定した理由はなにか？

A：先行論文も参考に4週間を設定した。2週間、4週間、6週間に低酸素期間を振った検討も行ったが群間差はみられなかった。

Q：NCX1の発現検討の際にHIF-1 α やTGF- β 1, Basiginの検討併せて行っているがこれらを検討対象とした理由はなにか？

A：HIF-1 α は低酸素を用いた本実験系では重要性が非常に高いと考え選択した。TGF- β 1やBasiginは本実験系を構築する際に実験動物モデルを種々検討した際に、特に重症のモデル動物であるSuHxラットにおいて、関与している可能性がRhoキナーゼとともに示唆されており、PAHの病態形成において重要な分子であると判断し選択した。

Q : TRP チャネルなどと比較すると NCX はそこまで PAH で関与が強いとは先行論文では示されていないが、なぜ NCX を研究対象としようと思ったのか？

A : 肺高血圧症を研究しようと思った際に、知己の研究者が共同研究先の福岡大学薬理学教室で NCX の研究を実施していたことが思い浮かび、確固たる科学的論拠があったわけではないが、NCX と肺高血圧が関与しているのではという直感を得たことが NCX をテーマとして選んだ理由である。

Q : NCX と TRP は共役しており、TRP の変化が NCX に影響しうると思われるが KO マウスでその変化は検討しているか？

A : 野生型マウスでの RNA による検討のみではあるが、低酸素誘発肺高血圧モデルでは TRPC の発現が変化していることを確認している。

Q : NCX1 の PAH における病態形成仮説の中で提唱している HIF-1 α や TGF- β 1、Basigin の変化はどういった順序であると考えているか？

A : HIF-1 α が最も上流に位置してシクロフィリン A の転写を促進し、増大したシクロフィリンがそのレセプターである Basigin へと結合するという順番を考えている。TGF- β 1 もシクロフィリン A 同様に HIF-1 α の下流に位置しているのではないかと考えているが、本研究ではこれらの因子の関与は未検討であり、あくまでも仮説である。

Q : SEA0400 の投与開始タイミングは？

A : 成獣マウスに対して、低酸素飼育直前に浸透圧ポンプを植え込むことで低酸素期間全体を通じて投与している。

Q : SEA0400 の投与を病態形成後に実施しての検討はしているか？

A : 本研究においては実施していない

Q : 病態形成後に投与した場合、SEA0400 はどの程度効果を生じると考えられるか？

A : 本研究で抑制された肺高血圧性変化は機能的にも組織学的にも軽度であり、本実験系で SEA0400 はあくまでも軽度の変化に対して抑制作用を有していると判断する。高度の組織学的変化に対して、それを正常状態までリバースするほどの効能はないであろうと推測している。

Q : (参考データとして示した NCX1 コンディショナルノックアウトマウスの結果を受けて) NCX1 のノックアウトタイミングを操作することで最適な治療タイミングについて検討できるのではないか

A : その通りと考える。

Q：肺高血圧には PAH(グループ 1)のほかにも低酸素関連肺高血圧症(グループ 3)などが存在し、肺移植においてはグループ 3 の肺高血圧も多い。グループ 3 肺高血圧における NCX1 の関与についてどう考えられるか？

A：本実験系で用いた低酸素誘発肺高血圧モデルは広く PAH の実験動物としてもちいられているが、実際にはグループ 3 としての要素も持ち合わせていると思われる。今後は肺移植患者の臨床データや検体を用いたグループ 3 肺高血圧と NCX1 の関連の検討も必要と考え立案・実施中である。

本論文は、肺動脈性肺高血圧症の病態形成における 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX1)の機能的な重要性ならびに薬剤標的としての可能性を実験的に証明した意義深い研究である。内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭性に問題はなく、論文の内容や発展的内容に関する審査員との質疑応答のやりとりも適切であった。以上を踏まえ審査員で討議の結果、本論文は学位に値すると評価された。