

肺動脈性肺高血圧症におけるプロスタサイクリン受容体作動薬セレキシパグの作用

著者	本田 洋平
著者別表示	HONDA Yohei
雑誌名	博士論文本文Full
学位授与番号	13301甲第5558号
学位名	博士（創薬科学）
学位授与年月日	2022-09-26
URL	http://hdl.handle.net/2297/00068872

doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240692>



博士論文

肺動脈性肺高血圧症に対する プロスタサイクリン受容体作動薬セレキシパグの作用

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬理学研究室

学籍番号 1929012013

氏名 本田 洋平

主任指導教員名 金田 勝幸 教授

目次

Chapter 1 緒言	1
Chapter 2 急性肺高血圧症モデルラットに対するセレキシパグの作用.....	5
2.1. 序文	5
2.2. 方法	6
2.2.1. 動物の飼育	6
2.2.2. 試薬の調製	6
2.2.3. 急性肺高血圧症モデルラットの作製.....	7
2.2.4. 右室収縮期圧、全身血圧および心拍数の測定.....	8
2.2.5. 統計解析	9
2.3. 結果	10
2.4. 考察	12
Chapter 3 肺高血圧症モデルラットに対するセレキシパグの早期介入試験.....	13
3.1. 序文	13
3.2. 方法	15
3.2.1. 動物の飼育	15
3.2.2. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの作製.....	15
3.2.3. 全身血圧および心拍数の測定.....	16
3.2.4. 右室収縮期圧の測定	16
3.2.5. 右心肥大の評価および組織採材.....	17
3.2.6. 組織学的解析	17
3.2.7. 統計解析	17
3.3. 結果	19
3.3.1. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態早期におけるセレキシパグの血行動態および右心肥大に対する作用.....	19
3.3.2. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態早期におけるセレキシパグの血管病変に対する作用	20
3.4. 考察	22
Chapter 4 肺高血圧症モデルラットに対するセレキシパグの後期介入試験.....	23
4.1. 序文	23
4.2. 方法	25
4.2.1. 動物の飼育	25
4.2.2. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの作製.....	25
4.2.3. 全身血圧および心拍数の測定.....	26
4.2.4. 右室収縮期圧の測定	26

4.2.5.	右心肥大の評価および組織採材.....	26
4.2.6.	組織学的解析	27
4.2.7.	コラーゲン産生抑制作用評価.....	28
4.2.8.	統計解析	29
4.3.	結果	31
4.3.1.	Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態進行期におけるセレキシパグの血行動態および右心肥大に対する作用.....	31
4.3.2.	Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態進行期におけるセレキシパグの血管病変に対する作用	32
4.3.3.	Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの肺血管閉塞病変におけるセレキシパグの増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用.....	34
4.3.4.	Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの肺小血管線維化に対するセレキシパグの作用	36
4.3.5.	ヒト肺線維芽細胞におけるコラーゲン産生に対するセレキシパグの作用.....	38
4.4.	考察	39
Chapter5	右心不全に対するセレキシパグの作用	41
5.1.	序文	41
5.2.	方法	42
5.2.1.	動物の飼育	42
5.2.2.	Fischer ラットを用いた Sugен 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットにおける死亡率の評価	42
5.2.3.	統計解析	42
5.3.	結果	43
5.4.	考察	45
Chapter6	おわりに	46
	引用文献	48
	謝辞	54

略語

本論文に使用した略語は以下の通りである。

AUC_{0-∞}	Area under plasma concentration-time curve from 0 to infinity
DAB	3,3'-diaminobenzidine
EVG	Elastica van Gieson
HR	Heart rate
MAP	Mean arterial blood pressure
PAH	Pulmonary arterial hypertension
RV/LV+S	Ratio of the weight of the right ventricle to that of the left ventricle + septum
RVSP	Right ventricular systolic pressure
SD rat	Sprague-Dawley rat
SMA	α -smooth muscle actin
SuHx	Sugen 5416/hypoxia induced pulmonary arterial hypertension model
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TGF-β	Transforming growth factor- β
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling
vWF	von Willebrand factor

Chapter 1 緒言

肺動脈性肺高血圧症の症状と治療

肺高血圧症は、肺血管の収縮や狭窄、閉塞により、心臓から肺へ血液を送り出す血管である肺動脈の血圧、すなわち肺動脈圧が上昇し、心臓や肺の機能障害を呈する進行性の疾患である。肺動脈圧の高い状態が継続することで右心室に負荷が掛かり、次第に右心肥大が進行し、最終的には右心不全に至る (Schermuly et al. 2011)。本邦の肺高血圧症治療ガイドラインでは、右心カテーテル検査において、安静時の肺動脈圧の平均値が 25 mmHg 以上の場合に肺高血圧症と定義されている。肺高血圧症の自覚症状としては、労作時の呼吸困難や息切れ、易疲労感、動悸等が挙げられ、右心不全を伴うと肝鬱血や消化管浮腫に伴う腹部膨満感、食欲不振などの消化器症状、下腿浮腫等を示すようになる。

肺高血圧症はその病因や関連する因子に応じ、5つの群に分類される。その中で肺動脈に主要な病変が存在する肺高血圧症である肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension : PAH) は、肺高血圧症臨床分類であるニース分類において第1群に該当する疾患群であり、最も典型的な肺高血圧症としての臨床像を呈する。PAH は本邦において指定難病にも認定されており、2020年度の特定医療費受給者証所持者数は4,230人であった。PAHの自然歴は極めて不良であり、治療薬が存在しなかった時期の平均余命は2.8年、1年生存率、3年生存率および5年生存率はそれぞれ68%、48%および34%と報告されている (D'Alonzo et al. 1991)。

PAHの病態の中心は、血管拡張因子と血管収縮因子の不均衡による末梢肺動脈の収縮や、血管リモデリングと呼ばれる血管の形態・構造変化である (Figure 1)。末梢肺動脈の収縮には、血管内皮細胞から産生される血管拡張因子である一酸化窒素やプロスタサイクリン、また血管収縮因子であるエンドセリンが関与しており、PAHでは、これらの血管拡張因子の産生低下や血管収縮因子の発現亢進が認められる (Giaid et al. 1995、Christman et al. 1992、Rubens et al. 2001)。一方、血管リモデリング所見は末梢の肺小動脈を中心に認められ、その病態形成には血管平滑筋細胞や内皮細胞の増殖、細胞外マトリックスの過剰沈着、またアポトーシス抵抗性が関与していると考えられる (Sakao et al. 2010、Nakamura et al. 2012)。

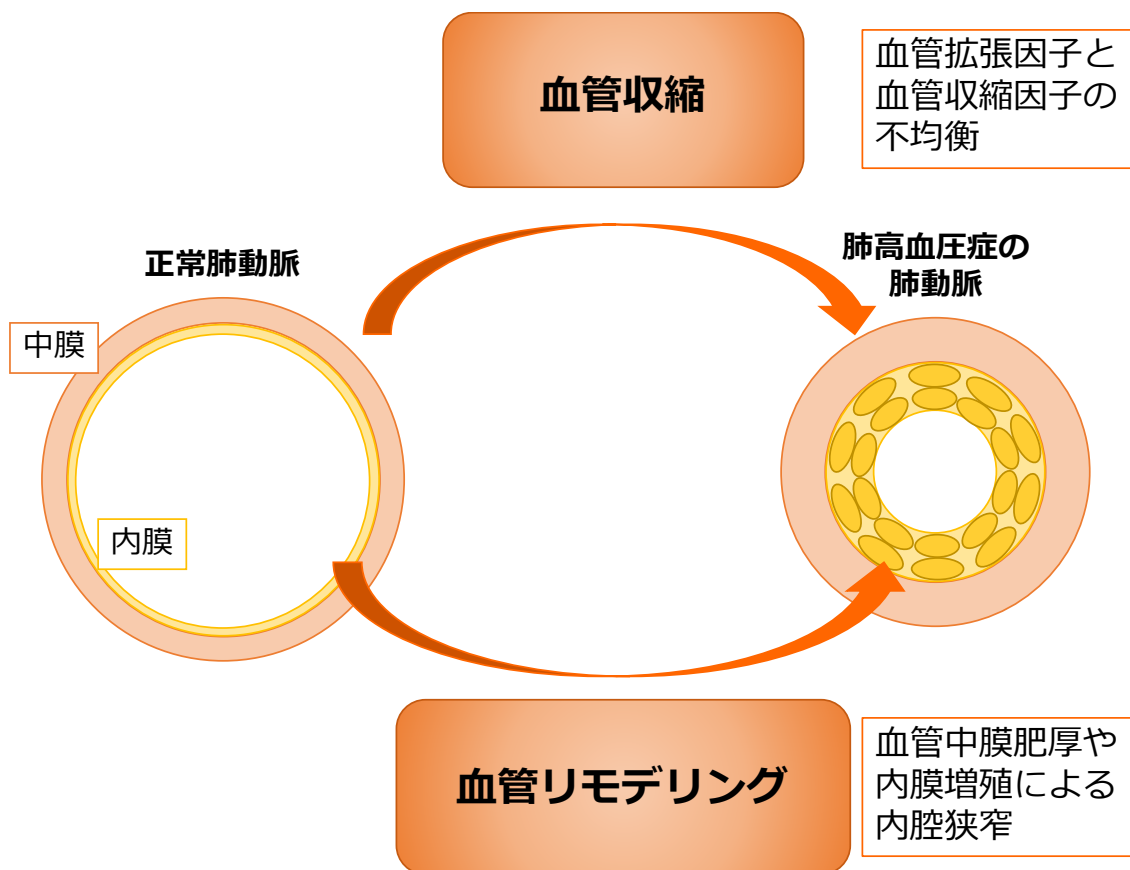


Figure 1 Pathological mechanisms of pulmonary arterial hypertension (PAH).

PAH の病態解明の進歩に伴い、1990 年代以降に次々と PAH に対する治療薬が開発されており、現在では特異的薬物治療として、狭窄した肺血管を拡張し血行動態を改善する 3 系統の肺血管拡張薬がある。すなわち、プロスタサイクリン経路に属するプロスタサイクリンとその誘導体、エンドセリン経路に属するエンドセリン受容体拮抗薬、および一酸化窒素系製剤のホスホジエステラーゼ 5 阻害薬とグアニル酸シクラーゼ刺激剤が使用可能である。これらの単剤または組み合わせにより、PAH の生命予後は改善してきた。

プロスタサイクリン受容体作動薬セレキシパグ

プロスタサイクリンは強力な肺血管拡張作用を有する内在性物質である。その受容体であるプロスタサイクリン受容体は、肺血管の弛緩や肺動脈平滑筋細胞の増殖制御に重要な役割を担っている。また PAH においては、プロスタサイクリンの産生量が低下することも報告されている。それゆえプロスタサイクリンは、PAH の治療薬として有用であると考えられ、医薬品への応用が検討されてきたが、その血中半減期は極めて短く、

経口剤として用いるには安定性の向上が大きな課題であった。そんな中、本邦では 1999 年にプロスタサイクリン自体の持続静注療法であるエポプロステノールが承認され、治療薬の登場により PAH の予後は大きく改善した (Olschewski et al. 2004, Barst et al. 1996)。ただしエポプロステノールの投与には、中心静脈にカテーテルを留置し、輸液ポンプにより持続注入する必要があることから、生活制限や、カテーテルの留置による感染症のリスク等、患者の Quality of Life を損なう点が課題であった。

セレキシパグは日本新薬で創製された非プロスタノイド構造を有するプロスタサイクリン受容体作動薬である。その大きな特徴として、経口投与可能な点が挙げられる (Asaki et al. 2015)。セレキシパグはプロドラッグであり、経口投与後、肝臓において加水分解され、その活性本体である MRE-269 に変換される。生体内において MRE-269 の血漿中濃度は長時間維持されることから、セレキシパグは経口投与で薬効持続可能な PAH 治療薬として有望であると考えられた。

PAH 患者を対象とした国内および海外第 II 相臨床試験において、セレキシパグの肺血管抵抗に対する作用を評価したところ、セレキシパグ投与群ではプラセボ群に比べ有意な改善が認められた (Tanabe et al. 2017, Simonneau et al. 2012)。またセレキシパグの有効性を検証した海外第 III 相試験である GRIPHON 試験において、セレキシパグ投与群はプラセボ投与群と比較し、主要評価項目である morbidity/mortality イベントの発現リスクを 40%低下させた (Sitbon et al. 2015)。これらの結果を受けセレキシパグは、米国、欧州および日本において、PAH の治療薬として承認されている (Galiè et al., 2019)。

PAH に対するプロスタサイクリン受容体作動薬の作用機序

PAH に対し、プロスタサイクリン受容体作動薬が治療薬として有用であることが臨床的に証明されたにも関わらず、PAH の病態に対する薬理学的作用、すなわち複雑な肺血管リモデリングや右心不全による死亡リスクに対する作用は、臨床研究だけでは明らかにすることが難しく、未だ不明な点が多い。そのため、病態モデル動物等を用いた研究により、PAH に対するセレキシパグの詳細な作用メカニズムを明らかにすることが重要である。近年、Sprague-Dawley (SD) ラットに対し、血管内皮細胞増殖因子受容体阻害剤である Sugen 5416 の皮下投与後、低酸素濃度への曝露を組み合わせる (Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデル) ことで、PAH の病態で見られる閉塞性内膜病変や、叢状病変と呼ばれる特徴的な複合血管病変を動物モデルにおいて再現できることが報告された (Abe et al. 2010, Shinohara et al. 2015)。これらの病理学的特徴は、同じく PAH

モデルとしてよく用いられている、モノクロタリン投与によるモデルや、低酸素曝露によるモデル動物では観察されないものである (Bonnet et al. 2017)。また SD ラットを用いた Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルでは、重篤な右心肥大や右室の機能障害を呈し、右室のグルコース取り込み量も増加している (Legchenko et al. 2018)。これらの右心不全に関わる表現型は、実際に PAH 患者で認められるものと共通点が多い。以上を考慮すると、SD ラットを用いた Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルは、PAH の病態解明や、薬剤の作用メカニズムを検証する際の最適な実験的病態モデルであると考えられる。

また近年、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルに用いるラットの系統により、その表現型に違いのあることが報告されている。例えば Wistar Kyoto rat を用いて Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルを作製した場合、肺血管の閉塞性病変だけでなく、肺気腫様の症状を呈する (Bogaard et al. 2019、2020)。また Fischer 系ラットを用いた場合は、SD ラットと同じく重篤な右心不全を呈する一方で、SD ラットでは死亡例がほとんど見られないのに対し、Fischer 系ラットでは後負荷の増大に適応できず、右心不全による死亡率の高いことが報告されている (Jiang et al. 2016)。

これまでに、SD ラットを用いた Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルにおいて、プロスタサイクリン受容体作動薬であるイロprost やトレprostニルの有効性を評価した研究報告がある。これらのプロスタサイクリン受容体作動薬は、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの血行動態に対し改善作用を示した一方で、肺血管リモデリングへの有効性は示さなかった (Gomez-Arroyo et al. 2015、Chaudhary et al. 2018)。一方、セレキシパグの活性代謝物である MRE-269 は、他のプロスタサイクリン受容体作動薬と比較し、摘出肺血管において強力な血管拡張作用を示すことが報告されており、その理由の一つとしてプロスタサイクリン受容体への高い選択性が寄与していることが考えられる (Fuchikami et al. 2017)。よって Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルにおいて、セレキシパグは強力な血管拡張作用により、血管病変を含む肺高血圧症の特徴的な病態を改善する可能性があると考えられる。

本研究の目的

本研究では、PAH に対するプロスタサイクリン受容体作動薬セレキシパグの詳細な作用メカニズムを明らかにするため、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットを中心とした病態モデルを用いて、セレキシパグの薬理学的作用を検証した。

Chapter2 急性肺高血圧症モデルラットに対するセレキシパグの作用

2.1. 序文

セレキシパグの活性代謝物である MRE-269 は、健常なヒト、ブタおよびラットより摘出した血管において、強い弛緩作用を示すことが報告されている。また、モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットより摘出したリモデリングを伴う肺血管においても、正常ラットより摘出した肺血管と同様に血管弛緩作用を示している。このことからセレキシパグは、正常ラットだけでなく肺高血圧症モデルラットの肺血管においても、血管拡張作用を示すと考えられる。しかしながら *in vivo* の肺高血圧症モデル動物において、肺血行動態または全身血圧に対するセレキシパグの急性的な作用についてはこれまでに検討されていない。

トロンボキサン A₂ は、活性化した血小板から産生される物質であり、血小板凝集作用の他、血管平滑筋細胞に存在するトロンボキサン A₂ 受容体の活性化し、イノシトールリン酸の蓄積を介して血管収縮を引き起こす作用を有する (Nakahara et al. 2008、Yamamoto et al. 1995)。PAH 患者の血漿中においても、トロンボキサン A₂ が増加していることが報告されている (Christman et al. 1992)。従って、トロンボキサン A₂ 受容体アゴニストである U46619 をラットへ静脈内投与すると、肺血管の収縮を介し右室収縮期圧の速やかな上昇を引き起こされ、これを急性 PAH モデルとして使用することができる (Pankey et al. 2011)。そこで本章では、血管収縮因子であるトロンボキサン A₂ 受容体アゴニストを持続的に静脈内投与することで急性的に肺高血圧症を発症させたラットにおいて、セレキシパグの肺および全身の血行動態に対する作用を検討した。

2.2. 方法

2.2.1. 動物の飼育

Sprague-Dawley ラット (Slc:SD、日本 SLC、浜松) は 5 週齢、雄を購入し 1 週間の検査後に使用した。飼育は温度 20~26°C、湿度 35~75%、換気 15 回以上/時間、照明時間 8:00~20:00 の条件下で行った。餌および水は自由に摂取させた。実験は全て動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、令和元年 6 月 19 日最終改正) に基づき定められた日本新薬株式会社の動物実験に関する社内規程に従い実施した。

2.2.2. 試薬の調製

- ・カルバミン酸エチル溶液

カルバミン酸エチル (富士フイルム和光純薬、大阪) を生理食塩水 (大塚生食注、大塚製薬、徳島) に 2.4 g/mL の濃度で溶解し調製した。

- ・ヘパリン加生理食塩水

ヘパリンナトリウム (ヘパリンナトリウム注 N5 千単位/5 mL 「AY」、エイワイファーマ、東京) を生理食塩水に希釈し、100 単位/mL の濃度に調製した。

- ・U46619 溶液

U46619 (5 mg、10 mg/mL 酢酸メチル、Cayman Chemical、米国) の溶媒を窒素ガスにより揮発させ、1 mL のジメチルスルホキシド (ナカライテスク、京都) に再溶解して 5 mg/mL ストック溶液を調製した。36 μ L ずつ 1.5 mL マイクロチューブ 26 本に分注し、-80°C で保存した。実験の際にストック溶液を溶解し、生理食塩水で希釈し 60 μ g/mL に調製した。

・0.5w/v%メチルセルロース溶液

メチルセルロース（メトローズ SM-400、信越化学工業、東京）を蒸留水（大塚蒸留水、大塚製薬）に 0.5 w/v%の濃度で溶解し調製した。

・セレキシパグ投与液

セレキシパグは日本新薬にて合成した。0.5w/v%メチルセルロース溶液を用いて、セレキシパグを 0.6 mg/mL の濃度で懸濁して調製した。

2.2.3. 急性肺高血圧症モデルラットの作製

ラットに対し、カルバミン酸エチル溶液を 1.2 g/kg の用量で皮下投与し麻酔した。ラットを動物用体温制御装置（ATB-1100、日本光電、東京）のラバーマットに仰向けに寝かせ、測定中体温が 37°Cに保たれるようにした。全身血圧および心拍数を測定するため、右大腿部を切開し、大腿動脈を露出させ、ヘパリン加生理食塩水を満たしたポリエチレンカニューレ（PE-50、Becton, Dickinson and Company、米国）を挿入した。挿入したポリエチレンカニューレは、8 連ブリッジアンプ（FE228、ADInstruments、オーストラリア）に取り付けた動物用ディスプレイ血圧トランスジューサ（MLT0699、ADInstruments）に接続した。また U46619 溶液を静脈内投与するため、ラットの左大腿部を切開し、大腿静脈を露出させ、別のポリエチレンカニューレを挿入した。右室収縮期圧を測定するため、ラット頸部を切開し右頸静脈を露出させ、別のポリエチレンカニューレを挿入し、血圧トランスジューサに接続した。セレキシパグまたは媒体を投与するため、ラットの腹部を正中切開し、十二指腸にシリコンチューブ（内径 1 mm×外径 3 mm、アズワン、大阪）を挿入した（Figure 2-1）。

シリンジポンプを用いて U46619 溶液を持続静脈内投与することで、右室収縮期圧を上昇させた。静注速度は、0.6～1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の範囲内で実施し、右室収縮期圧が 45～55 mmHg になるよう調節した。

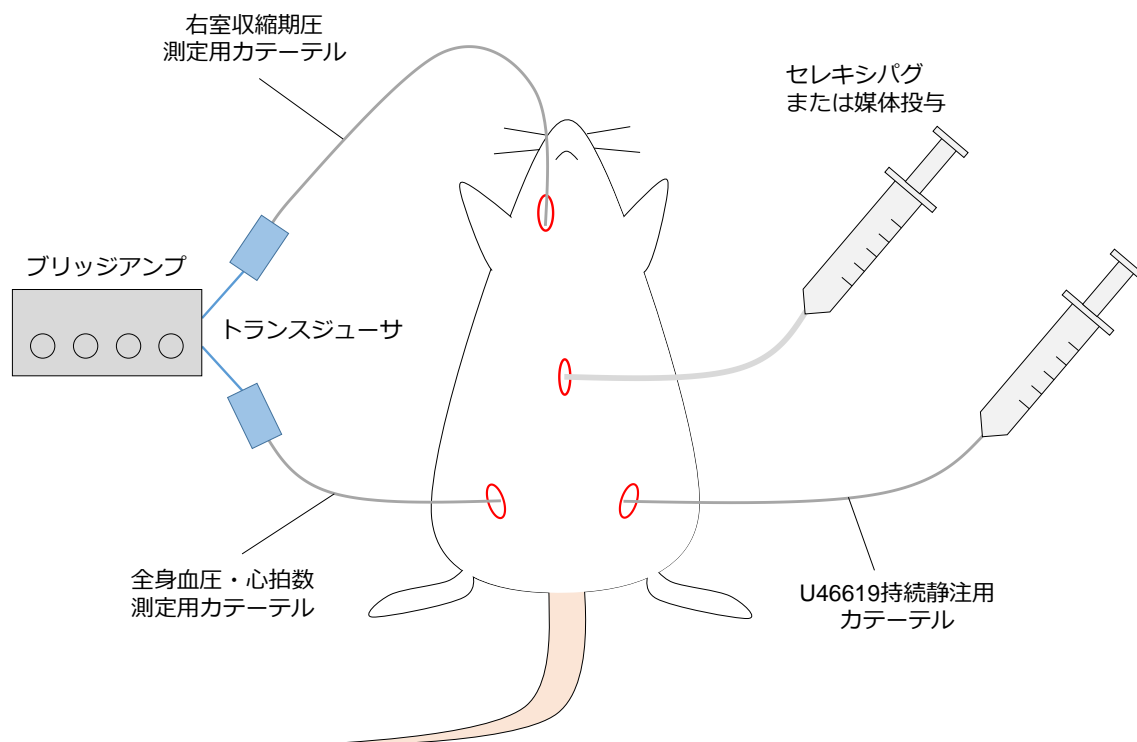


Figure 2-1 Schematic diagram of the study using acute PAH model rats.

2.2.4. 右室収縮期圧、全身血圧および心拍数の測定

U46619 溶液の持続静脈内投与により上昇した右室収縮期圧が安定したことを確認した後、薬剤投与直前（0分）の右室収縮期圧、全身血圧および心拍数を測定し、セレキシパグ投与液（3 mg/kg）または媒体（0.5w/v%メチルセルロース溶液）を十二指腸内投与した。右室収縮期圧、全身血圧および心拍数は、セレキシパグ投与液または媒体投与後 120 分間測定した。セレキシパグ投与液または媒体投与後 10、20、30、60、90 および 120 分における、右室収縮期圧、全身血圧および心拍数の 1 分間の平均値を PowerLab ソフトウェア（ADInstruments）により算出し、測定値とした（Figure 2-2）。右室収縮期圧、全身血圧および心拍数の 0 分の値からの変化率を、投与後 10～120 分について算出した。

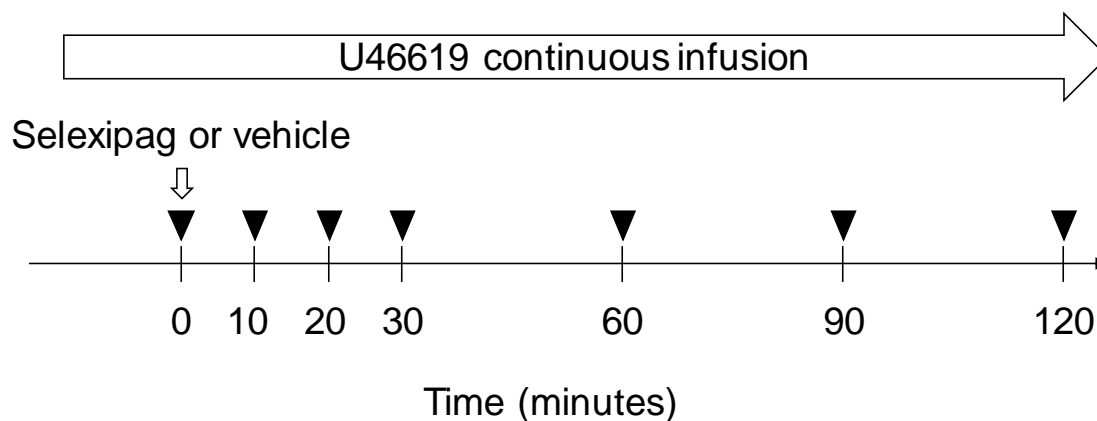


Figure 2-2 Study design using U46619-induced acute PAH model rats.

Scheme of the study using acute PAH model rats. Black arrow heads indicate the time for the assessment of the hemodynamic parameters.

2.2.5. 統計解析

セレキシパグ投与液または媒体投与後 10、20、30、60、90 および 120 分における、右室収縮期圧、全身血圧および心拍数の 0 分の値からの変化率について分散分析を実施し、有意な差が検出された場合に各測定時点において Student の t 検定を行った。いずれも統計解析は SAS version 9.3 (SAS Institute、米国) および EXSUS Version 8.1.0 (CAC クロア、東京) を用いて行い、危険率 5%未満を有意と判定した。

2.3. 結果

PAH モデルラットの慢性的な病態に対するセレキシパグの効果を検証する前に、トロンボキサン A₂ 受容体アゴニストである U46619 により急性的に PAH を惹起したラットにおいて、セレキシパグの血行動態に対する作用を検証した。U46619 の持続的な静脈内投与により、ラットの右室収縮期圧は 35.5 ± 0.9 mmHg から 48.1 ± 0.7 mmHg まで上昇した。過去に、セレキシパグを 3 mg/kg の用量でラットに経口投与すると、心拍数のわずかな上昇が認められるものの血圧には影響しないことが報告されていたため、本章ではラットに対しセレキシパグを 3 mg/kg の用量で十二指腸内投与した (Kuwano et al. 2007)。その結果、右室収縮期圧は投与後 30 分以内に媒体投与群に比べ有意に低下し、この作用は測定最終点の 120 分まで持続していた。全身血圧および心拍数については、セレキシパグ投与によりいずれの測定時間においても、媒体投与群と比較し有意な変化は認められなかった (Figure 2-3)。右室収縮期圧の下げ幅の最大値は、測定時間 0 分の値を基準とし 16% であり、実測値としては 7.9 mmHg であった。

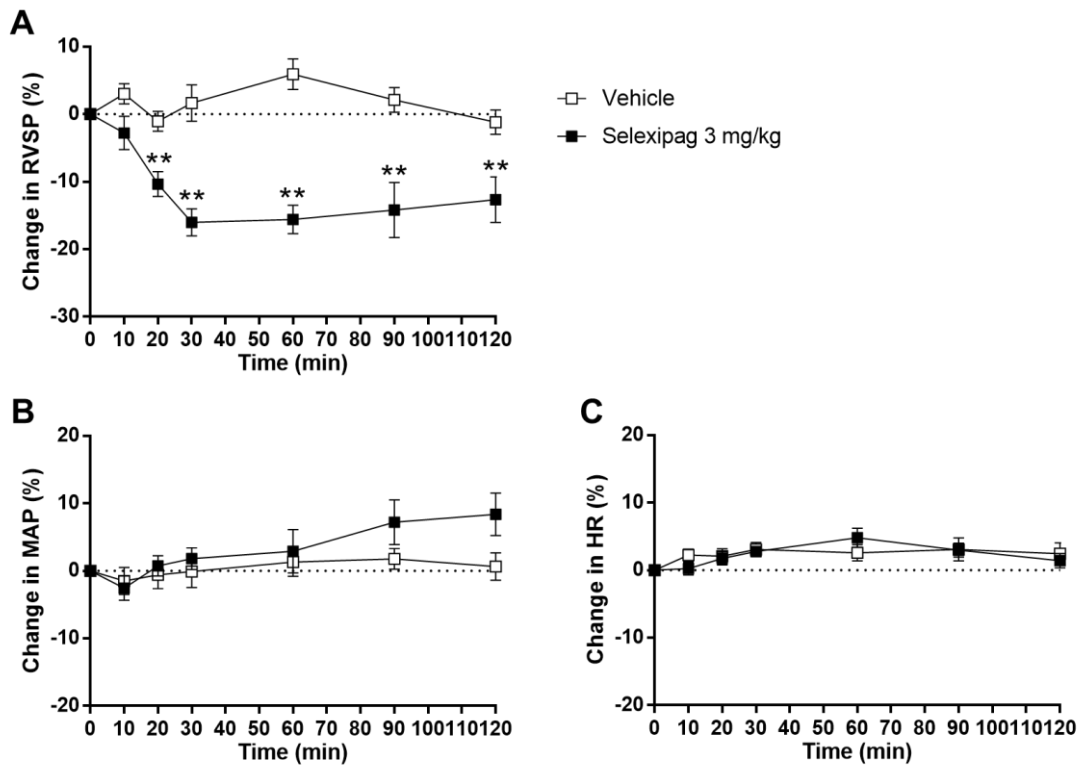


Figure 2-3 Hemodynamic effects of selexipag in U46619-induced acute PAH model rats.

(A) Effects of selexipag on right ventricular systolic pressure (RVSP), (B) mean arterial blood pressure (MAP) and (C) heart rate (HR). The percentage change in RVSP, MAP and HR from the value at 0 min were calculated for each measurement until 120 min. Statistical analyses were performed using repeated measures ANOVA followed by Student's t-test. **P<0.01 vs. vehicle. Values are means \pm S.E.M. N = 8 per group.

2.4. 考察

本章では、トロンボキササン A₂ 受容体アゴニストの投与により作製した急性肺高血圧症モデルラットの血行動態に対する、プロスタサイクリン受容体作動薬セレキシパグの作用を検討した。本モデルにおける右室収縮期圧の上昇は、トロンボキササン A₂ 受容体アゴニストの肺血管収縮作用によるものと考えられる。肺動脈へ血液を送り出す力の源は右心室であり、肺血管の狭窄に伴い肺血管抵抗が上昇すると、血液循環を維持するためにより強い右心室の負荷が必要となり、結果として右室収縮期圧が上昇する。

本章での実験結果は、セレキシパグが効果的に肺血管を拡張し右室収縮期圧を低下させる一方、全身循環への影響は無いことを示している。またセレキシパグ投与後、活性本体である MRE-269 へ速やかに変換されることや、ラットにおいて MRE-269 が比較的長い半減期を有することに一致し、本章の実験においてセレキシパグの右室収縮期圧低下作用は少なくとも2時間は安定して持続した (Nakamura et al. 2007)。この長時間持続する肺血管拡張作用が、PAH の病態に対するセレキシパグの主要な作用であり、全身循環への影響が小さいことは、低血圧等の副作用のリスクが低いことを示唆していると考えられる。

Chapter3 肺高血圧症モデルラットに対するセレキシパグの早期介入試験

3.1. 序文

植物アルカロイドであるモノクロタリンをラットに投与することで、PAH に類似した表現型を呈することが知られている。すなわち、右室収縮期圧の上昇や右心肥大の進行、病理学的には肺動脈における中膜の肥厚が認められることから、PAH に対する薬剤の薬理学的作用を検討するために幅広く使用されている動物モデルである。セレキシパグについても、モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットにおける薬効評価の報告があり、右心肥大の抑制や肺動脈の中膜肥厚を抑制することが示されている (Kuвано et al. 2008)。一方でモノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットでは、ヒト PAH で特徴的な病変である血管内膜の増殖や、瘤状の血管内に毛細血管の増生を認める、叢状病変と呼ばれる複合血管病変は認められない。

近年、血管内皮細胞増殖因子受容体拮抗薬である Sugen 5416 をラットに皮下投与後、低酸素濃度下で飼育することで、重症な肺高血圧症を呈することが報告された。血管内皮細胞増殖因子受容体の阻害により、肺血管内皮細胞にはアポトーシスが誘導される一方、一部アポトーシス抵抗性の細胞クローンが残存する。残存した細胞クローンは低酸素刺激に応答し、アポトーシス抵抗性の血管内皮細胞の増殖が生じることで肺血管病変が形成されることが考えられる (Sakao et al. 2005)。本モデルの特徴として、モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットでは認められない、閉塞性内膜病変等の特徴的な血管病変を呈することが挙げられる。よって Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルを用いることで、PAH の病態に対する薬剤のより詳細な作用メカニズムを検証することが可能である。

Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットにおける右室収縮期圧や右心肥大は、Sugen 5416 皮下投与後 5 週頃まで経時的に上昇し、その後持続することが報告されている (Toba et al. 2013)。そこで本章ではまず、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラ

ットの病態形成が進行する初期段階において、血行動態および血管病変に対するセレキシパグの病態進行抑制作用を検証する早期介入試験を実施した。

3.2. 方法

3.2.1. 動物の飼育

2.2.1 の方法に準じる。

3.2.2. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの作製

Sugen 5416 は日本新薬にて合成し、0.5%カルボキシメチルセルロース（シグマアルドリッチ、米国）、0.9%塩化ナトリウム（ナカライテスク、京都）、0.4%ポリソルベート 80（シグマアルドリッチ）および 0.9%ベンジルアルコール（ナカライテスク）を含む緩衝液に 5 mg/mL の濃度になるよう溶解させた。6 週齢、雄の SD ラットに対し、Sugen 5416 を 20 mg/kg の用量で皮下投与し、10%酸素濃度環境において 3 週間飼育した（Abe et al. 2010）。その後、ラットを正常酸素濃度環境に戻し飼育した。正常対照群のラットは、実験期間を通じて正常酸素濃度環境にて飼育された。Sugen 5416 皮下投与 3 週間後より、正常対照群および媒体投与群には 0.5w/v%メチルセルロース溶液を、セレキシパグ投与群には、0.5w/v%メチルセルロースに懸濁したセレキシパグ投与液を、それぞれ 3 週間、1 日 2 回連日経口投与した。また薬剤投与による病態の改善作用を検討するため、媒体またはセレキシパグ投与開始直前である病態惹起 3 週後に各種評価を実施する病態群（SuHx 3w）を置いた（Figure 3-1）。

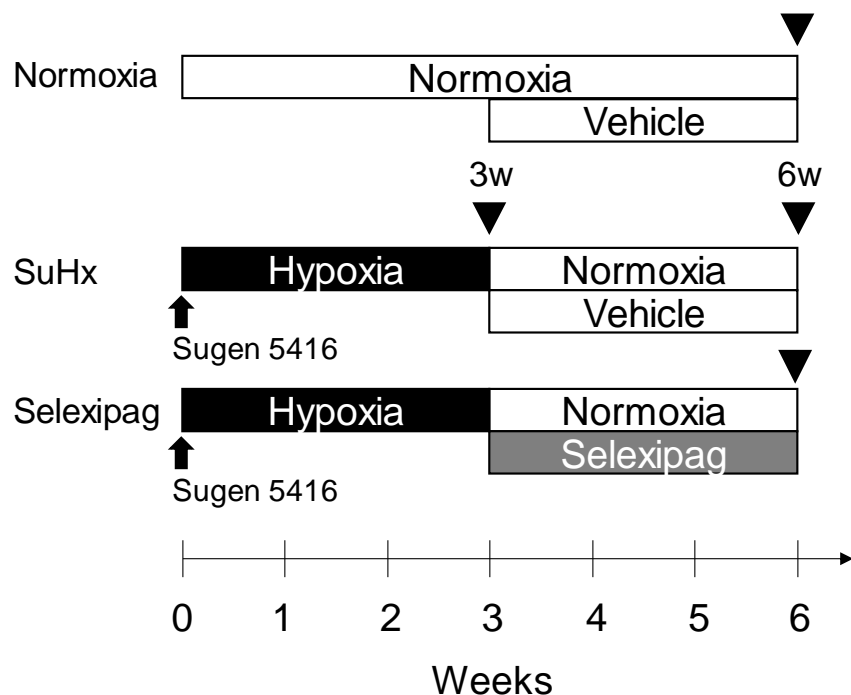


Figure 3-1 Study design using the Sugden 5416/hypoxia induced PAH rat model.

Scheme of the early-intervention study. Black arrow heads indicate the date for the assessment of the outcome parameters.

3.2.3. 全身血圧および心拍数の測定

右室収縮期圧測定の前日、非観血血圧測定装置（BP-98A、ソフトロン、東京）を用いて、覚醒下のラットを 37°C に保たれた保温器に設置し、ラット用カフプローブをラットの尾部に取り付け、全身血圧および心拍数を測定した。

3.2.4. 右室収縮期圧の測定

ラットに対しイソフルラン（ファイザー、米国）を用いて麻酔し、小動物用ベンチレータ（SAR-830AP、CWE、米国）に接続し機械的に換気させた。ラットを動物用体温制御装置（ATB-1100）のラバーマットに仰向けに寝かせ、測定中体温が 37°C に保たれるようにした。右室収縮期圧を測定するため、ヘパリン加生理食塩水を満たしたポリエチレンカニューレ（PE-50）をラット右頸静脈より挿入し、カニューレの先端を右心室へ

到達させた。カニューレを 8 連ブリッジアンプ (FE228) に取り付けた動物用ディスプレイ
血圧トランスジューサ (MLT0699) に接続し、PowerLab 16/35 データ収録システム
(ADInstruments) を用いて右室収縮期圧の値を 5 分間記録し、その平均値を測定値とし
た。測定開始前に水銀式血圧計 (アコマ医科工業、東京) を用いて圧力の校正を実施し
た。

3.2.5. 右心肥大の評価および組織採材

右室収縮期圧測定後、3%イソフルラン麻酔下において、ラットの腹部大動脈より放
血させることでラットを安楽死させた。左肺を摘出し、ヘパリン加生理食塩水で灌流し
た後、10%中性緩衝ホルマリン液 (富士フィルム和光純薬) によって固定した。右心室
および左心室+中隔の重量をそれぞれ測定し、右室重量比 (右心室/左心室+中隔) を算
出した。

3.2.6. 組織学的解析

左肺組織のパラフィン包埋およびエラスチカ・ワンギーソン染色はアプライドメディ
カルリサーチ (大阪) にて実施した。染色した切片は、明視野バーチャルスライドスキ
ャナー (Aperio CS2、ライカバイオシステムズ、ドイツ) を用いてデジタルスライド化
し、Aperio ImageScope (ライカバイオシステムズ) を用いて解析を実施した。肺動脈の
閉塞性病変の評価には、直径 30-50 μm の動脈を遠位部より順に各肺切片において 30 個
選択し解析した。肺動脈の閉塞性病変は、血管内腔が 50%以上閉塞しているものと定義
した (Shinohara et al. 2015、Oka et al. 2007)。

3.2.7. 統計解析

右室収縮期圧、右室重量比および閉塞した血管病変の割合については、正常対照群、
病態惹起 3 週後に評価した群、媒体投与群、セレキシバグ 10 mg/kg 投与群および 30
mg/kg 投与群において、Tukey の検定を行った。全身血圧および心拍数については、正

常対照群、媒体投与群、セレキシパグ 10 mg/kg 投与群および 30 mg/kg 投与群において、Tukey の検定を行った。いずれも統計解析は SAS version 9.3 および EXSUS Version 8.1.0 を用いて行い、危険率 5%未満を有意と判定した。

3.3. 結果

3.3.1. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態早期におけるセレキシパグの血行動態および右心肥大に対する作用

SD ラットに対し Sugen 5416 を皮下投与し、10%酸素環境下で3週間飼育することにより、右室収縮期圧の有意な上昇（正常対照群； 37.6 ± 0.8 mmHg、病態惹起3週後； 95.7 ± 4.2 mmHg、Figure 3-2A）および右心肥大の指標である右室重量比の上昇（正常対照群； 0.23 ± 0.01 、病態惹起3週後； 0.63 ± 0.02 、Figure 3-2B）が認められた。肺高血圧症の重症度は、U46619 誘発急性肺高血圧症モデルラットと Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットで異なる。実際、本モデルにおいて右室収縮期圧は、病態惹起より6週後に 141.1 ± 6.2 mmHgまで上昇した一方（正常対照群； 37.6 ± 0.8 mmHg）、急性モデルでの右室収縮期圧の上昇幅は 35.5 ± 0.9 mmHg から 48.1 ± 0.7 mmHg までであり、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルでの上昇幅のほうが大きかった。それゆえ、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルにおけるセレキシパグの用量は、重症度を考慮すると急性モデルで用いた 3 mg/kg よりも高い用量が必要であると考え、 10 mg/kg または 30 mg/kg の1日2回経口投与を設定した。

早期介入試験において、評価最終点における媒体投与群の右室収縮期圧は 141.1 ± 6.2 mmHg であり、媒体またはセレキシパグ投与開始直前の病態惹起3週後の値（ 95.7 ± 4.2 mmHg）よりさらに上昇していた。一方、右室重量比については、病態惹起3週後の値（ 0.63 ± 0.02 ）と評価最終点の値（ 0.65 ± 0.03 ）で差は認められなかった。セレキシパグを 30 mg/kg の用量で投与した群では、評価最終点において媒体投与群と比較し右室収縮期圧の有意な低下（ 102.1 ± 5.7 mmHg）が認められた一方、全身血圧または心拍数への作用は認められなかった（Figure 3-2A、C および D）。右室収縮期圧の低下に一致し、右室重量比はセレキシパグを 10 mg/kg の用量で投与した群（ 0.56 ± 0.02 ）および 30 mg/kg の用量で投与した群（ 0.50 ± 0.02 ）いずれにおいても、媒体投与群と

比較し有意に低かった (Figure 3-2B)。

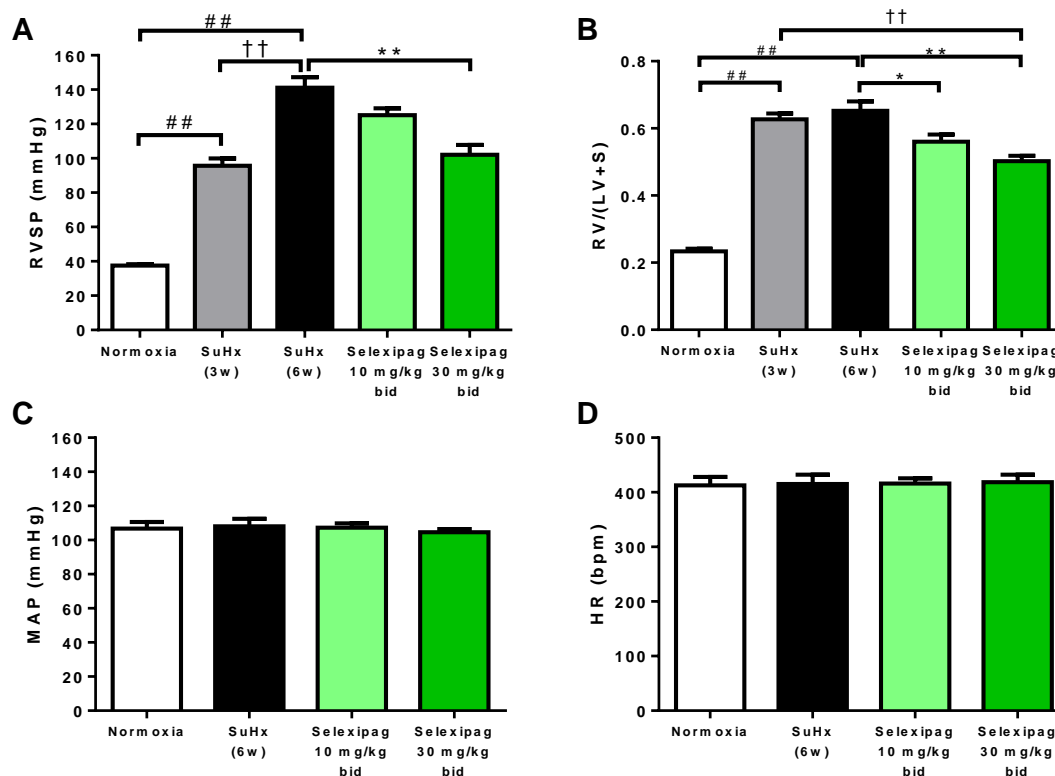


Figure 3-2 Hemodynamic effects of selexipag in the early-intervention study of SuHx rats.

(A) Effect of selexipag on right ventricular systolic pressure (RVSP), (B) the ratio of the weight of the right ventricle to that of the left ventricle + septum (RV/LV + S), (C) mean arterial blood pressure (MAP) and (D) heart rate (HR). Statistical analyses were performed using Tukey's test. ##P<0.01 vs. normoxia, ††P<0.01 vs. SuHx (3w), *P<0.05 and **P<0.01 vs. SuHx (6w). Values are means ± S.E.M. N = 8–10 per group.

3.3.2. Sugon 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態早期におけるセレキシパグの血管病変に対する作用

肺血管における閉塞病変は、PAH 患者および Sugon 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットにおいて認められる病理所見であり、肺血管抵抗の増大および右室収縮期圧の上昇の原因となる (Schermuly et al. 2011、Abe et al. 2010)。肺血管の閉塞病変に対する

セレキシパグの作用を検証するため、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの肺病理切片において、閉塞病変を有する小血管の割合を病理組織学的に評価した。媒体またはセレキシパグ投与開始直時における閉塞血管の割合は $14.2 \pm 2\%$ であったのに対し、その後3週間媒体を投与した群では $55 \pm 5\%$ であり、閉塞血管の割合が増加していた。閉塞病変の増悪は、右室収縮期圧の上昇と一致していた。一方、セレキシパグを 30 mg/kg の用量で投与した群では、媒体投与群と比較し閉塞病変を有する血管の割合が有意に低下しており ($26 \pm 7\%$)、右室収縮期圧に対するセレキシパグの作用と一致する結果であった (Figure 3-3)。

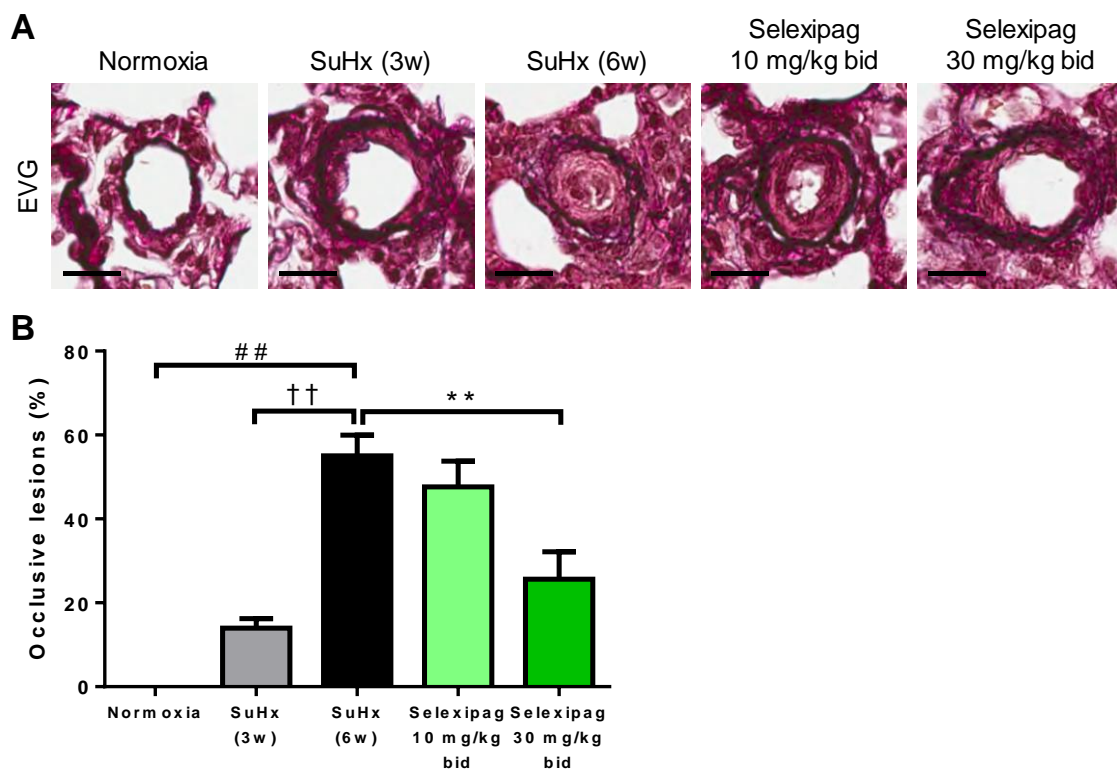


Figure 3-3 Effect of selexipag on occlusive lesions in the early intervention study of SuHx rats.

(A) Representative photographs of occlusive lesions of pulmonary vessels (scale bars = $20 \mu\text{m}$) and (B) the percentage of occlusive lesions among the vessels. Statistical analysis was performed using Tukey's test. $\#\#P < 0.01$ vs. normoxia, $\dagger \dagger P < 0.01$ vs. SuHx (3w), $**P < 0.01$ vs. SuHx (6w). Values are means \pm S.E.M. $N = 8-10$ per group.

3.4. 考察

SD ラットを用いた Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルにおける病態の表現型の時間経過は、報告によって多少異なる (Shinohara et al. 2015、Kato et al. 2017)。本章の実験において、SD ラットを用いた本モデルは、Sugen 5416 投与後 3 週後の時点で右室収縮期圧の有意な上昇および肺血管の閉塞病変の割合増加が認められており、いずれの項目も媒体投与群、すなわち Sugen 5416 投与後 6 週でさらに増悪していた。そのため、病態の進行期におけるセレキシパグの作用を評価する目的で、本章では早期介入試験を実施した。

本章では、セレキシパグ 20 または 60 mg/kg/day の用量において、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの右心肥大が抑制され、血行動態についてはセレキシパグを 60 mg/kg/day の用量で投与した際に改善した。これまでに、モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットにおいて、セレキシパグ 6 mg/kg/day の用量で同様に改善効果が報告されている。一方、臨床において PAH を適応とし承認されているセレキシパグの用量は最大 3.2 mg/day である。ラットにおいて、セレキシパグを 60 mg/kg/day の用量で投与した際、活性代謝物である MRE-269 の薬物血漿中濃度時間曲線下面積 (投与後 0 時間から無限時間まで、 $AUC_{0-\infty}$) は、健常者においてセレキシパグを 3.2 mg 経口投与した際の MRE-269 の $AUC_{0-\infty}$ に比べおよそ 100 倍高い値である (Asaki et al. 2015、Kaufmann et al. 2015)。セレキシパグの投与量に関する動物モデルと臨床用量との差については、セレキシパグまたは MRE-269 のプロスタサイクリン受容体への親和性の動物種差が一部関与していると考えられる。実際に、ヒトプロスタサイクリン受容体に対する MRE-269 の親和性は、ラットプロスタサイクリン受容体に対する親和性に比較し約 10 倍高い (Kuвано et al. 2007)。加えて、セレキシパグと同様に、プロスタサイクリン誘導体であるトレプロスチニルは、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルにおいて血行動態を改善するが、その用量は臨床またはモノクロタリン誘発高血圧症モデルラットで使用される用量に比べ 10 倍以上高い (Chaudhary et al. 2018)。これらの用量の乖離は、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルにおける PAH の病態の重症度の違いに起因する可能性が考えられる。

Chapter4 肺高血圧症モデルラットに対するセレキシパグの後期介入試験

4.1. 序文

PAH においては、肺動脈の内腔狭窄がその病態の主体である。内腔狭窄の要因として、血管収縮物質やプロスタサイクリン等血管拡張物質の不均衡による末梢肺動脈の攣縮に加え、肺血管リモデリングが関与することが報告されている。すなわち PAH においては、筋性動脈において中膜平滑筋細胞の肥大および細胞数の増加による肺動脈中膜壁の肥厚が観察される。また、肺高血圧症における血管病変の程度を分類する Heath-Edwards 分類においてグレード 3 に相当する病変では、内膜を構成する細胞の増加による内膜肥厚が認められる。さらに PAH の進行例における肺血管の閉塞性病変において、 α -アクチン陽性細胞が認められることが報告されており、肺血管における線維化病変が病態に関与する可能性が示唆されている（福田 圭一他、2018）。

Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットでは、Sugen 5416 投与後 8 週頃の肺血管において、新生内膜病変が認められることが報告されている（Abe et al. 2010）。また、ファイブロネクチンや I 型コラーゲン等の線維化に関与する蛋白質の増加することも報告されており、上記臨床において特徴的な血管病変に極めて類似した表現型を呈する（Liu et al. 2015）。よって本モデルを用いることで、PAH の進行例で認められる新生内膜病変や線維化に対する薬剤の作用を検証することができると考えられる。

一方、過去の報告によると、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの血行動態や右心肥大は、病態惹起後 5 週頃にピークに達し、その後持続する（Toba et al. 2013）。内膜病変の形成時期も考慮し本章では、PAH の病態が確立した Sugen 5416 投与後 5 週から 8 週の期間において、セレキシパグの反復投与を実施した。臨床においても PAH にセレキシパグの投与が推奨されるのは、自覚症状に乏しい病態初期ではなく、肺高血圧症の臨床症状に基づく重症度分類であるニューヨーク心臓協会（NYHA）/世界保健機関（WHO）機能分類で II 度または III 度に分類される、ある程度病態の進行した患者で

あり、本章の薬剤投与タイミングと合致していると考えられる（福田 恵一他、2018）。

4.2. 方法

4.2.1. 動物の飼育

2.2.1 の方法に準じる。

4.2.2. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの作製

3.2.2 の方法に準じ、Sugen 5416 を調製した。6 週齢、雄の SD ラットに対し、Sugen 5416 を 20 mg/kg の用量で皮下投与し、10%酸素濃度環境において 3 週間飼育した後、ラットを正常酸素濃度環境に戻し、さらに 2 週間飼育した。正常対照群のラットは、実験期間を通じて正常酸素濃度環境にて飼育された。Sugen 5416 投与 5 週間後より、正常対照群および媒体投与群には 0.5w/v%メチルセルロース溶液を、セレキシパグ投与群には、0.5w/v%メチルセルロースに懸濁したセレキシパグ投与液を、それぞれ 3 週間、1 日 2 回連日経口投与した。3 週間の投与後、全身血圧、心拍数および右室収縮期圧を測定した。また薬剤投与による病態の改善作用を検討するため、媒体またはセレキシパグ投与開始直前である病態惹起 5 週後に各種評価を実施する病態群 (SuHx 5w) を置いた (Figure 4-1)。

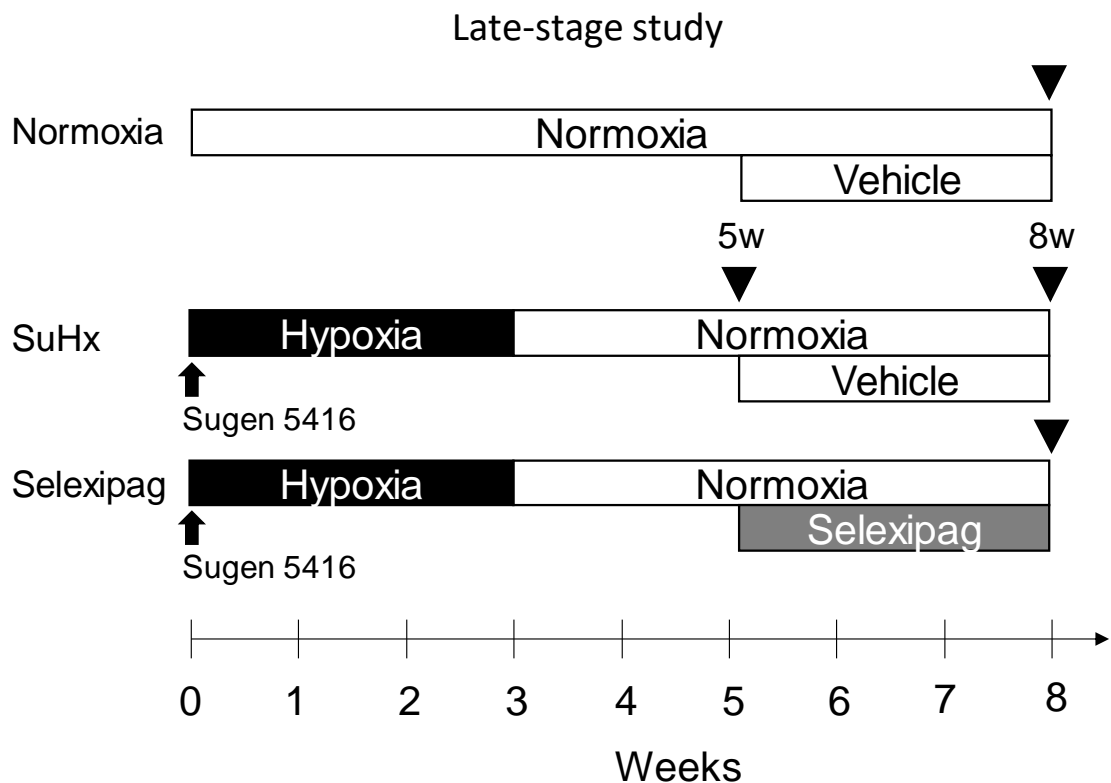


Figure 4-1 Study design using the Sugen 5416/hypoxia induced PAH rat model.

Scheme of the late-intervention study. Black arrow heads indicate the date for the assessment of the outcome parameters.

4.2.3. 全身血圧および心拍数の測定

3.2.3 の方法に準じる。

4.2.4. 右室収縮期圧の測定

3.2.4 の方法に準じる。

4.2.5. 右心肥大の評価および組織採材

3.2.5 の方法に準じる。

4.2.6. 組織学的解析

- ・閉塞病変の評価

4.2.6 の方法に準じる。

- ・血管中膜肥厚の評価

血管中膜肥厚の評価には、直径 50-200 μm の血管を用いた。血管中膜肥厚の割合は、 $[(\text{血管外径} - \text{血管内径}) / \text{血管外径}] \times 100$ の式により算出した (Shinohara et al. 2014)。

- ・抗 Ki67 抗体による免疫組織染色および Ki-67 陽性血管の評価

肺組織のパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し再水和した。切片をエチレンジアミン四酢酸緩衝液 (pH9.0) に浸し、95°Cの温度で 40 分間抗原賦活処理を実施した。蒸留水による洗浄後、内在性パーオキシダーゼ不活性化のため 3%過酸化水素に 10 分間浸した。洗浄後、抗 Ki-67 抗体 (ニチレイバイオサイエンス、東京) を用いて室温で 60 分間インキュベートした。0.05% Tween20 含有トリス緩衝生理食塩水 (TBST) による洗浄後、ポリマー試薬 (ENVISION+, DAKO、デンマーク) を 30 分反応させ、再度 TBST で洗浄した後、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB) 基質キット (ニチレイ) を用いて発色処理を実施した。各切片において、直径 30-50 μm の血管を遠位部より順に 30 個選択し、少なくとも 1 個以上の細胞が抗 Ki-67 抗体によって染色された血管を、Ki-67 陽性血管としてカウントした。各切片における評価対象血管の総数のうち、Ki-67 陽性血管数の占める割合を算出した。

- ・抗 Von Willebrand factor 抗体による免疫組織染色

肺組織のパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し再水和した。切片をプロテイナーゼ K (S3020、DAKO) にて室温で 5 分間反応させた後、蒸留水で洗浄し、3%過酸化水素に室温で 10 分間反応させた。蒸留水および TBST で洗浄後、抗ヒト第 VIII 因子関連抗原・ウサギポリクローナル抗体 (A0082、DAKO) を 4°Cの温度で一晩反応させた。TBST で洗浄後、ポリマー試薬 (ENVISION+, DAKO) を室温にて 30 分間反応させ、再度 TBST で洗浄した後、DAB 基質キット (ニチレイ) を用いて発色処理を実施した。

- ・ TUNEL 法による染色

肺血管において、terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling (TUNEL) 法によりアポトーシス細胞死を検出した。染色には、ApopTag Peroxidase In Situ apoptosis Detection Kit (メルク、ドイツ) を用いた。

- ・ 抗 I 型コラーゲン抗体による免疫組織染色および I 型コラーゲン発現度合いの評価

肺組織のパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理および再水和した後、切片に対しプロテイナーゼ K (S3020) を室温で 5 分間反応させた。蒸留水で洗浄後、3%過酸化水素を室温で 10 分間反応させた。蒸留水および TBST で洗浄後、抗 I 型コラーゲン・ヤギポリクローナル抗体 (1310-01、SouthernBiotech、米国) を 4°C の温度で一晩反応させた。TBST で洗浄後、ポリマー試薬 (ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (G)、ニチレイ) を室温にて 30 分間反応させた。TBST で洗浄後、DAB 基質キットを用いて発色処理を実施した。I 型コラーゲン発現度合いの評価には、血管外膜により囲まれた領域中の DAB 陽性ピクセルの数を、ImageScope ソフトウェアのマクロ機能である Positive Pixel Count v9 を用いて計数した。各血管において、血管領域に対する陽性ピクセル数の割合を算出し、各肺組織切片内の 30 個の血管について平方マイクロメートル毎の陽性ピクセル数の平均を各個体の値とした (Shinohara et al. 2015、Liu et al. 2015、Orellana et al. 2017)。

4.2.7. コラーゲン産生抑制作用評価

- ・ 細胞培養

健康人由来ヒト肺線維芽細胞 (Lonza Inc.、スイス) は、基本培地 (FBM、ロンザジャパン、東京) に線維芽細胞添加因子キット (FGMTM-BulletKitTM、ロンザジャパン) を加えた専用培地中で、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

- ・ 試薬の調製

MRE-269 は日本新薬にて合成した。MRE-269 を秤量し、10 mM の濃度になるようジメチルスルホキシド (ナカライテスク) に溶解した。さらにジメチルスルホキシドで段

階希釈することで、最終濃度（10、1、0.1 および 0.01 μM ）の 1000 倍溶液（10、1、0.1 および 0.01 mM ）を調製した。各 1000 倍溶液 10 μL を基本培地 990 μL で希釈し、10 倍液（100、10、1 および 0.1 μM ）を調製した。コントロール溶液として 10 μL のジメチルスルホキシドを基本培地 990 μL で希釈した 1%ジメチルスルホキシド溶液を調製した。

ヒトトランスフォーミング増殖因子 β （TGF- β 、PeproTech、米国）を基本培地で希釈し、10 倍液（100 ng/mL 、最終濃度 10 ng/mL ）を調製した。

・細胞増殖活性およびコラーゲン産生量の測定

正常ヒト肺線維芽細胞を 96 ウェルプレートに 5×10^3 cells/ウェルの細胞数で分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 にて一晩培養した。アスピレーターで培養液を全量除去した後、新たに基本培地 100 μL /ウェルを添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 にて一晩培養した。

アスピレーターでウェル中の基本培地を全量除去した後、新たに基本培地 80 μL を各ウェルに添加した。無刺激群（TGF- β （-））および対照群（control、TGF- β （+））には 1%ジメチルスルホキシド溶液を、MRE-269 処置群には各濃度の MRE-269 溶液を 10 μL ずつ添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 にて 2 時間培養した後、無刺激群には基本培地を、その他の群には 100 ng/mL の TGF- β 溶液をそれぞれ 10 μL ずつ添加し、さらに 2 日間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 にて培養した。

細胞の培養上清を回収し、コラーゲン産生量の測定に使用した。新たに基本培地 100 μL を各ウェルに加え、5 mg/mL の 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 溶液（ナカライテスク）を 10 μL ずつ各ウェルに添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 にて 4 時間培養した。4 時間後、各ウェルに 0.04 M 塩酸イソプロパノール溶液を 100 μL ずつ加え、マイクロプレートリーダーで 595 nm における吸光度を測定し、細胞増殖活性値を求めた。

回収した培養上清中の procollagen Type I C-peptide 濃度を、Procollagen Type I C-peptide EIA Kit（タカラバイオ、滋賀）を用いて測定した。Procollagen Type I C-peptide 濃度測定値を細胞増殖活性測定値で補正し、無刺激群の平均値を 1 とした相対値を計算した。

4.2.8. 統計解析

右室収縮期圧、右室重量比および閉塞した血管病変の割合、血管中膜肥厚、Ki-67 陽性血管の評価および I 型コラーゲン発現度合いの評価については、正常対照群、病態惹起 5 週後の群、媒体投与群およびセレキシパグ投与群において、Tukey の検定を行った。全身血圧および心拍数については、正常対照群、媒体投与群およびセレキシパグ投与群において、Tukey の検定を行った。コラーゲン産生抑制作用の評価については、無刺激対照群と control 群に関して Student の t 検定（両側）を実施し、有意である場合に、control 群を対照として MRE-269 処置群について Dunnett の多重比較法（両側）で有意差検定を行った。いずれも統計解析は SAS version 9.3 および EXSUS Version 8.1.0 を用いて行い、危険率 5%未満を有意と判定した。

4.3. 結果

4.3.1. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態進行期におけるセレキシパグの血行動態および右心肥大に対する作用

早期介入試験において、セレキシパグを 30 mg/kg の用量で 1 日 2 回経口投与することにより、右室収縮期圧および閉塞血管病変の有意な改善を示したものの、10 mg/kg の用量ではそれらの作用は認められなかった。そのため、後期介入試験においては、セレキシパグの用量として 30 mg/kg を 1 日 2 回経口投与のみを設定した。後期介入試験においては、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットは 3 週間の 10%酸素濃度への曝露の後、さらに常酸素下で 2 週間飼育され、そこから 3 週間、媒体またはセレキシパグが連日経口投与された。媒体またはセレキシパグ投与開始時には、右室収縮期圧 (37.9 ± 0.8 mmHg から 116.2 ± 5.1 mmHg) および右室重量比 (0.23 ± 0.01 から 0.62 ± 0.03) は有意に上昇しており、媒体投与群では最終評価点でもさらなる上昇は認められなかった (最終評価点における媒体投与群の右室収縮期圧 ; 114.6 ± 7.3 mmHg、右室重量比 ; 0.63 ± 0.03)。セレキシパグ投与群では、媒体投与群に比べ右室収縮期圧 (82.1 ± 8.1 mmHg) および右室重量比 (0.43 ± 0.02) は有意に低下しており、加えて薬剤投与開始時と比較しても有意な低下を示した (Figure 4-2A および B)。一方で全身血圧または心拍数への作用は見られなかった (Figure 4-2C および D)。

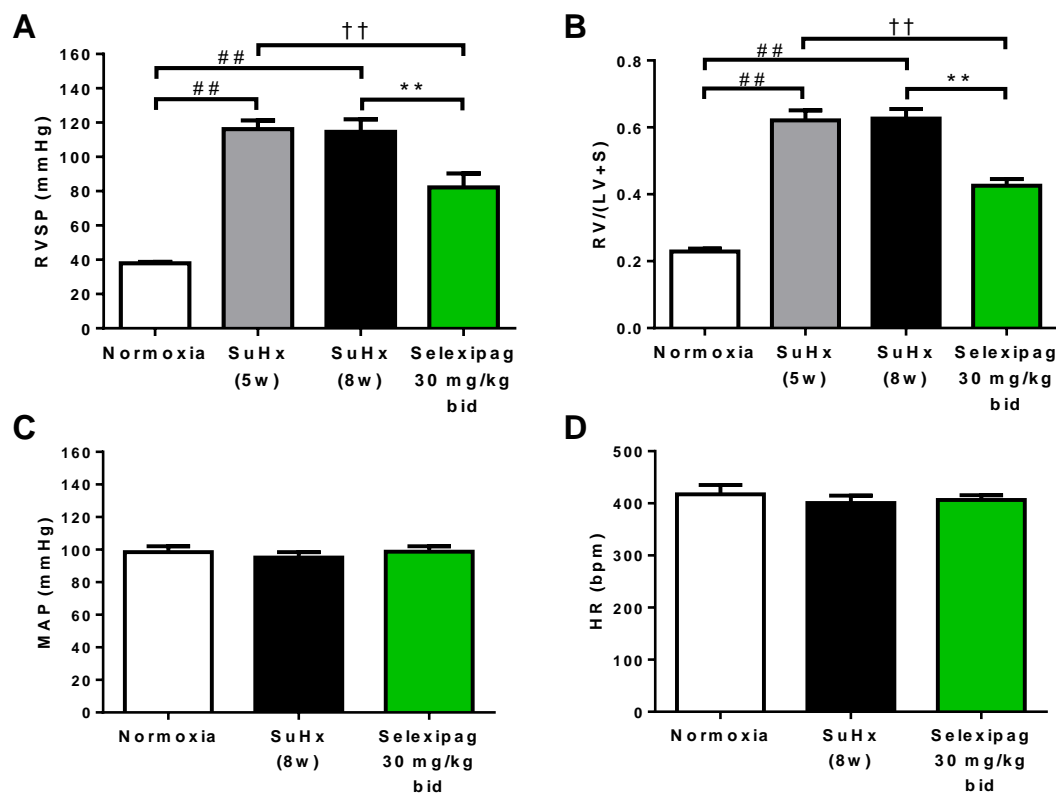


Figure 4-2 Hemodynamic effects of selexipag in the late-intervention study of SuHx rats.

(A) RVSP, (B) RV/LV + S, (C) MAP and (D) HR. Statistical analyses were performed using Tukey's test. ##P<0.01 vs. normoxia, † †P<0.01 vs. SuHx (5w), **P<0.01 vs. SuHx (8w). Values are means \pm S.E.M. N = 10 per group.

4.3.2. Sugén 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの病態進行期におけるセレキシパグの血管病変に対する作用

右室収縮期圧の上昇と同様に、閉塞血管病変の割合は、Sugén 5416 投与後 5 週の時点で有意に増加し (41 \pm 5%)、その後 3 週間媒体を投与した場合もさらなる有意な変化は見られなかった (54 \pm 5%)。一方、セレキシパグを 30 mg/kg の用量で 1 日 2 回投与した群では、媒体投与群と比較した場合だけでなく、薬剤投与開始時と比較しても有意に血管の閉塞病変の割合が減少していた (28 \pm 5%、Figure 4-3A および B)。

右室収縮期圧および肺動脈圧の上昇は、PAH 患者において肺動脈の中膜肥厚を引き起こすことが報告されている (Stacher et al. 2012)。本実験においても、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットの肺血管の中膜肥厚が認められ (正常ラット ; 12.2 ± 1.1%、SuHx 5w ; 27.4 ± 1.7%、SuHx 8w ; 29.5 ± 1.6%)、セレキシパグ投与群では、媒体投与群および薬剤投与開始時いずれと比較しても、有意な肥厚の減弱が認められた (16 ± 1.1%、Figure4-3A および C)。

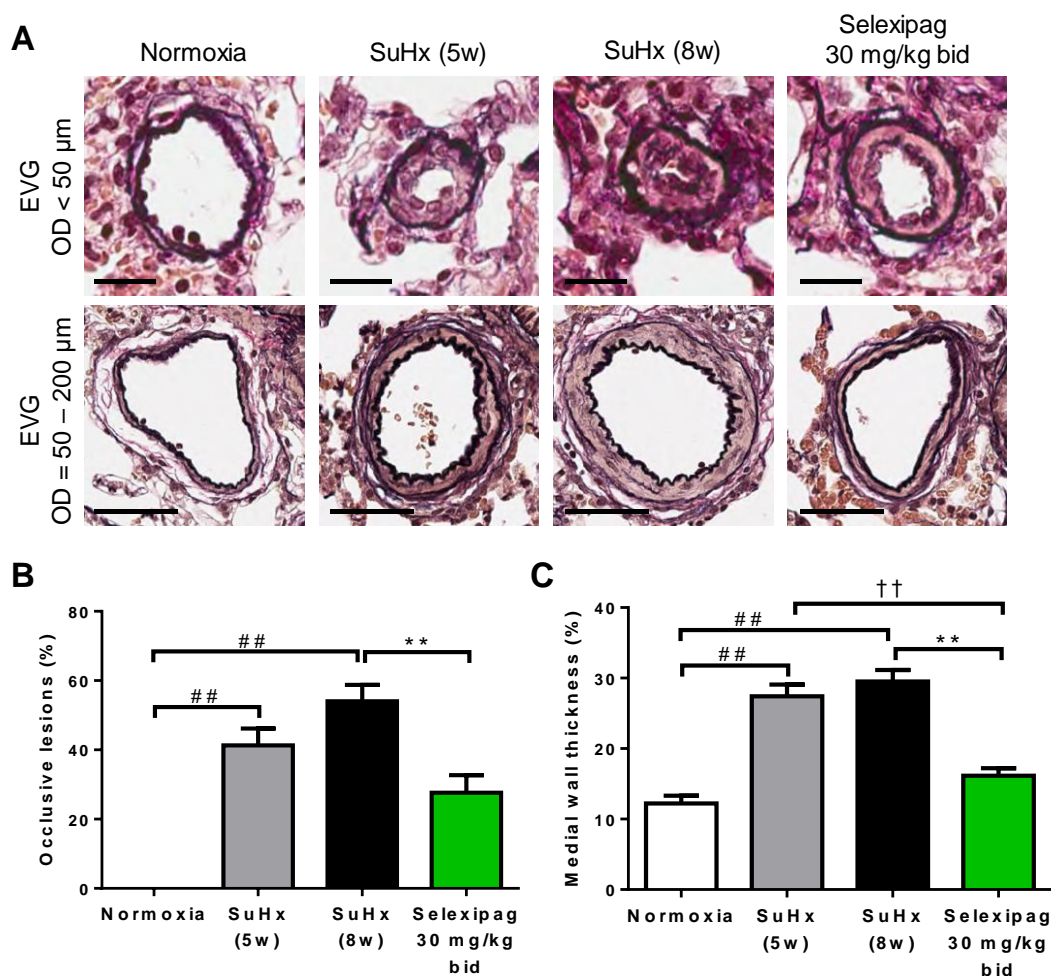


Figure 4-3 Effect of selexipag on occlusive lesions in the late-intervention study of SuHx

rats.

(A) Representative photographs of occlusive lesions (top; scale bar = 20 μm) and medial wall thickness of pulmonary vessels (bottom; scale bars = 50 μm), (B) the percentage of occlusive lesions among the vessels and (C) the percentage of medial thickness. Statistical analyses were performed using Tukey's test. ##P<0.01 vs. normoxia, † † P<0.01 vs. SuHx (5w), **P<0.01 vs. SuHx (8w). Values are means ± S.E.M. N = 10 per group.

4.3.3. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの肺血管閉塞性病変におけるセレキシパグの増殖抑制作用およびアポトーシス誘導作用

PAH に対するセレキシパグの保護的作用の詳細なメカニズムを検証するため、後期介入試験において入手した肺血管を用いて解析を実施した。PAH 患者の肺血管における閉塞性病変には、異常な細胞増殖や血管の線維化が認められる。Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットの閉塞肺血管においても、細胞増殖のマーカーである Ki-67 陽性細胞の増加や、I 型コラーゲン等を含む線維性蛋白質の発現増加が報告されている (Shinohara et al. 2015、Liu et al. 2015)。

本実験においても、薬剤投与開始時の Ki-67 陽性細胞の割合 ($41 \pm 2.9\%$) は、正常対照群 ($16 \pm 1.7\%$) と比較し増加しており、媒体投与群ではさらなる増加が認められた ($65 \pm 1.7\%$)。一方セレキシパグ投与群では、薬剤投与開始時および媒体投与群いずれと比較しても、Ki-67 陽性細胞の割合が有意に低下していた ($29 \pm 3.0\%$ 、Figure 4-4A および B)。Ki-67 陽性細胞は、閉塞した血管の管腔または新生内膜に見られ、正常な外観の血管には認められなかった。そこで、Ki-67 陽性細胞の発現部位を特定するため、Ki-67 陽性細胞を持つ血管を選択し、内皮細胞のマーカーである ヴォン・ヴィレブランド因子に対する抗体を用いて免疫染色を実施した。ヴォン・ヴィレブランド因子は、閉塞していない、または部分的に閉塞している血管の内膜において染色が認められ、中膜や外膜では見られなかった一方、Ki-67 陽性細胞は、部分的または完全に閉塞した血管の内膜および中膜いずれにおいても認められた (Figure 4-4A)。

閉塞した血管において、細胞のアポトーシスを評価するため、アポトーシスを起こした細胞の断片化 DNA を検出する TUNEL 法により染色を行った。TUNEL 陽性細胞は、媒体投与群に比べセレキシパグ投与群の閉塞した肺血管の内膜中膜複合体に多く見られた (Figure 4-4C)。

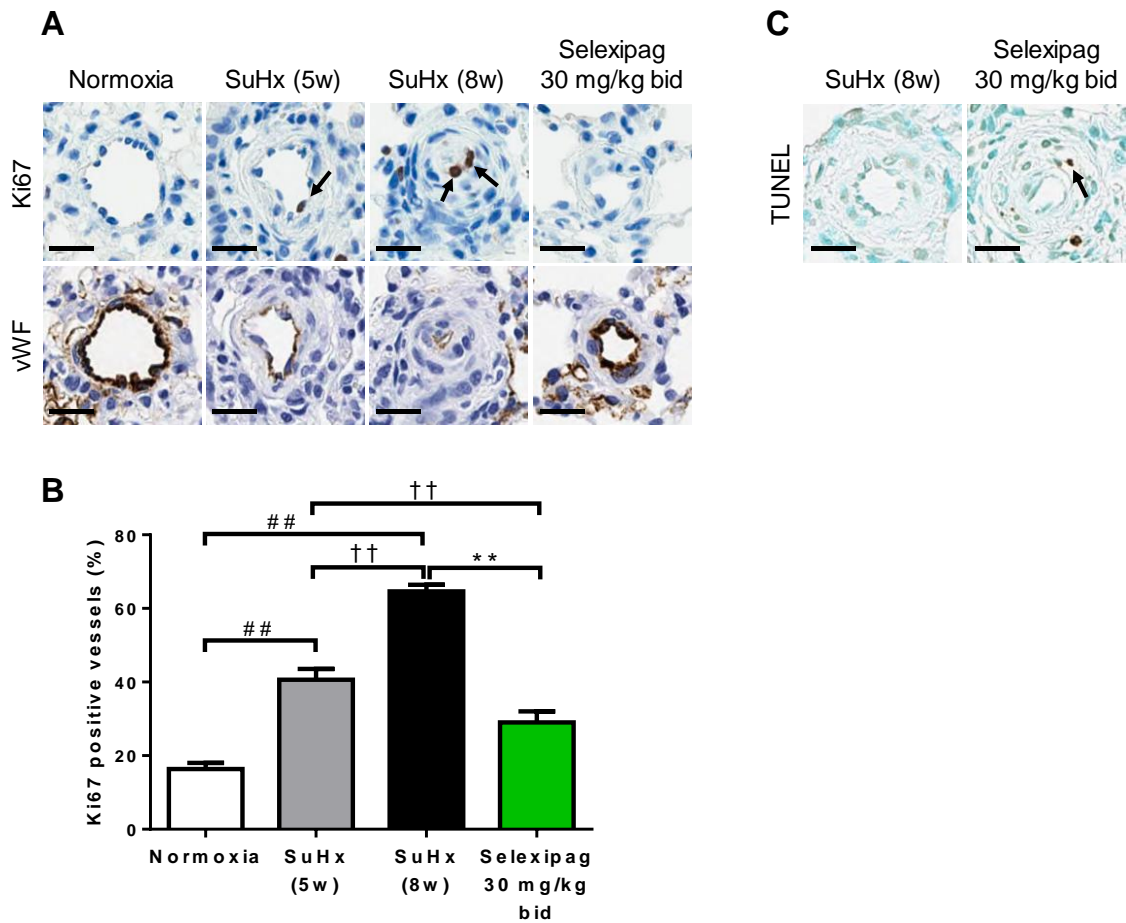


Figure 4-4 Effects of selexipag on cell proliferation and apoptosis in occlusive lesions in the late-intervention study.

Cells positive for the cell proliferation marker Ki-67 and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling (TUNEL), a method for identifying apoptotic cells, were detected immunohistochemically (arrows). (A) Representative photomicrographs of vessels from each group (top, Ki-67; bottom, von Willebrand factor (vWF) ; scale bars = 20 μ m), (B) percentage of Ki-67-positive vessels and (C) representative photomicrographs of vessels with TUNEL-positive cells. Statistical analysis was performed using Tukey's test. ## P <0.01 vs. normoxia, †† P <0.01 vs. SuHx-5w, ** P <0.01 vs. SuHx-8w. Values are means \pm S.E.M. N = 10 per group.

4.3.4. Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの肺小血管線維化に対するセレキシパグの作用

肺血管において、線維化に関わる細胞外マトリックス蛋白質であるI型コラーゲンの発現を、免疫組織学的に評価した。閉塞した肺血管の割合に一致して、抗I型コラーゲン抗体のシグナル強度は、薬剤投与開始時に有意に上昇し（正常ラット； 0.49 ± 0.03 pixels/ μm^2 、SuHx 5w； 1.06 ± 0.04 pixels/ μm^2 ）、媒体投与群ではさらなる変化は認められなかった（ 1.04 ± 0.05 pixels/ μm^2 ）。セレキシパグ投与群では、薬剤投与開始時および媒体投与群いずれと比較しても、シグナル強度の有意な低下が認められた（ 0.81 ± 0.04 pixels/ μm^2 、Figure 4-5）。

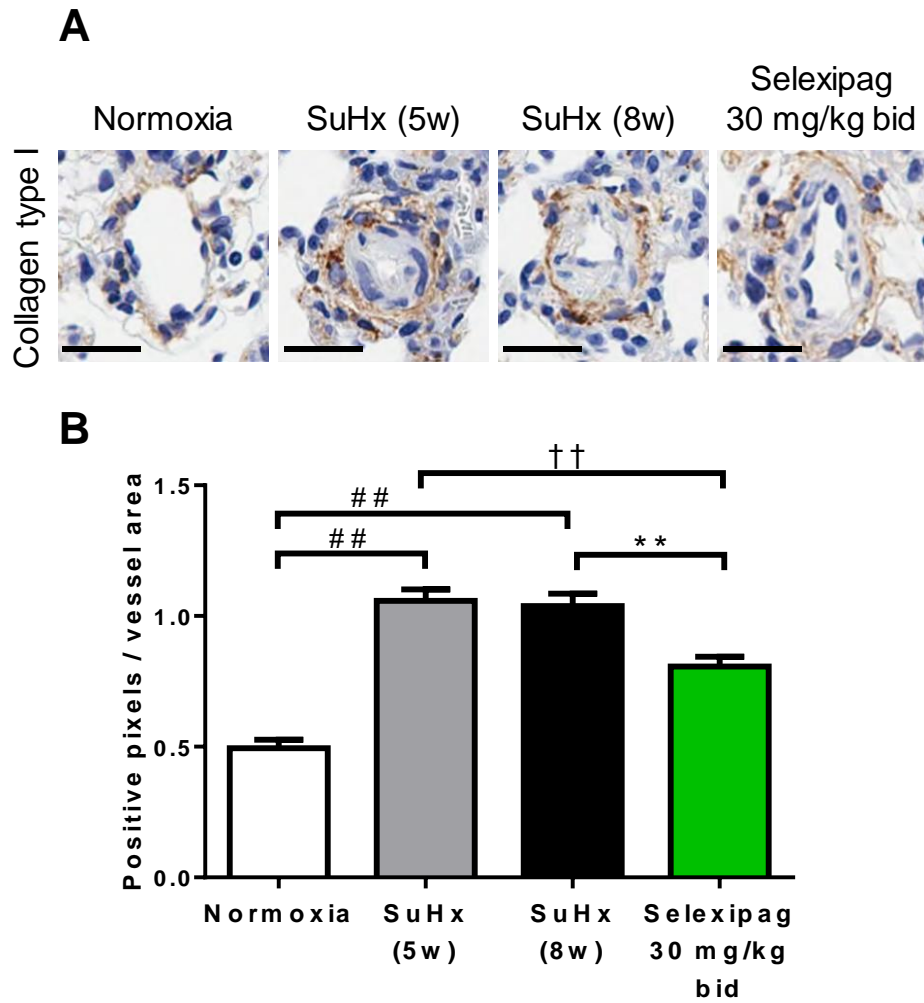


Figure 4-5 Effect of selexipag on expression of collagen type I in the late stage.

Collagen type I was detected immunohistochemically. (A) Representative photomicrographs of vessels from each group (scale bar = 20 μ m) and (B) the number of positive pixels per square micrometer of vessel area. Statistical analysis was performed using Tukey's test. ## P <0.01 vs. normoxia, †† P <0.01 vs. SuHx-5w, ** P <0.01 vs. SuHx-8w. Values are means \pm S.E.M. N = 10 per group.

4.3.5. ヒト肺線維芽細胞におけるコラーゲン産生に対するセレキシパグの作用

ヒト肺線維芽細胞において TGF- β 刺激を加えることで、コラーゲン産生が増加した。それに対し、セレキシパグの活性代謝物である MRE-269 は、0.1 μM から濃度依存的にコラーゲン産生を抑制した (Figure 4-6)。

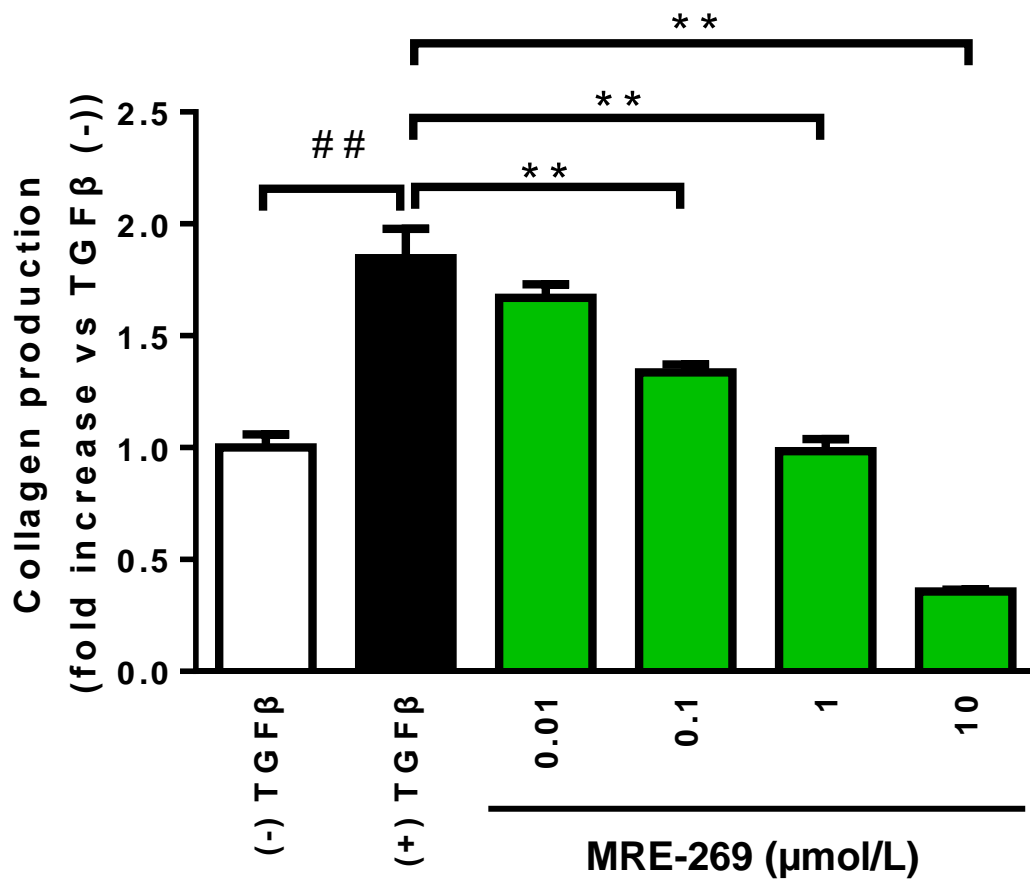


Figure 4-6 Effect of MRE-269 on TGF β -induced collagen production in Normal Human Lung Fibroblasts.

Values are means \pm S.E.M. of four wells. ## $P < 0.01$ vs. TGF- β (-) group by Student's t-test. ** $P < 0.01$ vs. TGF- β (+) group by Dunnett's test.

4.4. 考察

プロスタサイクリン誘導体であるイロprostやトレprostチニルについて、これまでSDラットを用いたSugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルにおいて作用を評価した報告がある。イロprostを2週間吸入投与させると、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットにおいて右心機能の改善や部分的な線維化の改善が認められた一方、右心肥大や肺血管抵抗の増加を改善しなかった (Gomez-Arroyo et al. 2015)。他方、浸透圧ポンプを用いてトレprostチニルを3週間、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットに持続的に皮下投与した場合、血行動態および右心機能を改善した一方で、肺血管リモデリングは改善しなかった (Chaudhary et al. 2018)。セレキシパグについては、動物モデルにおいて心エコーによる右心機能評価を実施した報告は無いが、臨床試験においてPAH患者の心拍出量を増加させたことが報告されている (Simonneau et al. 2012)。このことは、イロprostやトレprostチニル同様、右心機能の改善が本実験において血行動態の改善に寄与している可能性を示唆している。一方、イロprostやトレprostチニルとは異なり、セレキシパグは肺血管の閉塞病変を改善した。これまでにSugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットにおいて、肺血管を結紮し血行動態不可を軽減し、肺の血流を減少させることで、形成された閉塞血管病変が元に戻ることが報告されている (Abe et al. 2016)。このことは、肺血管拡張により血行動態ストレスを強力に減弱させることが、肺血管リモデリングの改善に繋がることを示唆している。これまでにPAH治療薬として国内で承認されている全てのプロスタサイクリン受容体アゴニストの中でも、セレキシパグはラットの摘出肺動脈において最も強力な血管拡張作用を示したことが報告されており、その作用の強さには、プロスタサイクリン受容体への高い選択性と、血管収縮に関わる他のプロスタグランジン受容体への低い親和性が寄与していると考えられている (Fuchikami et al. 2017、Kuwano et al. 2007)。さらに、セレキシパグは β -アドレシン経路の活性化やプロスタサイクリン受容体の脱感作を引き起こさないことが報告されており、ラットの皮膚血流に対するセレキシパグの血管拡張作用は連投により減弱しないことが示されている (Kuwano et al. 2007、Gatfield et al. 2017)。本モデルにおける他のプロスタサイクリン誘導体との作用の差には、以上のような薬理学的特徴が関与している可能性がある。

これまでに、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットの閉塞した肺血管の新生内膜お

よび中膜の両方において、 α -smooth muscle actin (SMA) 陽性平滑筋細胞が認められたことが報告されている。一方、フォン・ヴィレブランド因子陽性内皮細胞は単層の血管内膜に認められ、中膜には認められない (Tamura et al. 2018、Jernigan et al. 2017、Mair et al 2014)。セレキシパグ投与群において、Ki-67 陽性細胞は閉塞した血管の新生内膜および中膜で認められただけでなく、フォン・ヴィレブランド因子陽性の単層の血管内膜にも認められた。このことは、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの肺血管において、新生内膜および中膜で平滑筋様細胞が増殖し、さらに血管内膜で内皮様細胞が増殖している可能性を示唆している。PAH 患者の病態においても、平滑筋細胞および内皮細胞の異常な増殖が、血管リモデリングの進行に重要であることが報告されており、今回の実験結果とも一致する (Humbert et al. 2019)。本研究ではセレキシパグ投与群において、血管の閉塞病変の減少に伴い、Ki-67 陽性細胞の割合が低下し、TUNEL 陽性細胞が内膜中膜複合体において見られた。TUNEL 法により染色されたのは、新生内膜および中膜の平滑筋様細胞であるようだった。

Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットより摘出した血管平滑筋細胞あるいは内皮細胞において、セレキシパグの細胞増殖抑制作用やアポトーシス促進作用を検討した報告はない。しかしながら、セレキシパグを含むプロスタサイクリン受容体作動薬には、血小板由来増殖因子の刺激によるヒト肺血管平滑筋細胞増殖に対し、増殖抑制作用を有することが知られている (Gatfield et al. 2017)。一方で、セレキシパグの血管内皮細胞に対する直接的な作用やアポトーシスに対する作用はこれまでに報告はない。血管平滑筋細胞に対するセレキシパグの増殖抑制作用は、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットにおける血管の閉塞病変の改善に寄与している可能性がある。セレキシパグの血管リモデリングに対する作用の詳細なメカニズムについては、今後さらなる研究が必要である。

セレキシパグは Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットの肺血管の外膜において、I 型コラーゲンの発現を低下させた。加えて、培養ヒト肺線維芽細胞において、TGF- β 刺激による I 型プロコラーゲン C 末端ペプチドの増加を、MRE-269 は有意に抑制した。また、血小板由来増殖因子の刺激により活性化した培養ヒト線維芽細胞において、セレキシパグの抗線維化作用が認められたとの報告もある (Zmajkovicova et al. 2019)。以上より、肺血管に対する強力な弛緩作用に加え、セレキシパグの血管平滑筋細胞や線維芽細胞に対する直接的な作用が、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症ラットにおける肺血管リモデリングや線維化の改善に寄与することが考察される。

Chapter5 右心不全に対するセレキシパグの作用

5.1. 序文

PAHにおいて、高い肺動脈圧が持続すると、肺血管に血液を送り出す右心室に負荷が掛かり続け右心肥大が進行し、最終的には右心室の機能低下である右心不全を来す。旧来の報告において右心不全は、PAHの主要な死因の一つとされていた (D'Alonzo et al. 1991)。治療薬の登場により PAH の生命予後は改善したものの、右心不全の有無は依然病態の予後規定因子である (Galiè et al. 2016)。

PAHの動物モデルである Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットでは、用いるラットの系統によって PAH の表現型の重症度が異なることが報告されている。特に、Fischer ラットを用いてモデルを作製した場合、惹起後 7 週までに重篤な病態を呈し、高い死亡率が認められる一方、SD ラットでは肺動脈圧の上昇や右心肥大が見られるものの、14 週まで死亡例はほとんど認められない。死亡率の異なる原因としては、ラット系統間における血管新生シグナルの応答や、血管の炎症、心代謝に関与する遺伝子の発現パターンの違い等複数の因子の関与により、Fischer ラットは他の系統に比べ右室リモデリングへの適応力に乏しく、右心不全による死亡を呈し易いことが報告されている (Suen et al. 2019)。

そこで本章では、PAH の重要な表現型である右心不全に対するセレキシパグの作用を検討するため、Fischer ラットによる Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルを用いて検討を行った。

5.2. 方法

5.2.1. 動物の飼育

2.2.1 の方法に準じる。Fischer ラット (F344/DuCrIj、日本チャールスリバー、横浜) は 5 週齢、雄を購入し 1 週間の検疫後に使用した。

5.2.2. Fischer ラットを用いた Sugen 5416/低酸素曝露 肺高血圧症モデルラットにおける死亡率の評価

6 週齢、雄性の Fischer ラットに対し Sugen 5416 を 20 mg/kg の用量で皮下投与し、その後 10%酸素濃度環境において 3 週間飼育した。その後、ラットを正常酸素下に戻し飼育した。Sugen 5416 投与後 22 日目から 42 日目まで、ラットに対し媒体 (0.5%w/v メチルセルロース溶液) またはセレキシパグ投与液 (30 mg/kg) を、1 日 2 回経口投与した。ラットの全身状態を 1 日 2 回確認した。観察は 42 日目に終了し、生存していた動物は全て 3%イソフルラン麻酔下、腹部大動脈より放血させることで安楽死させた。各個体より心臓を摘出し、右心室および左心室+中隔の重量を測定し、右室重量比 (右心室/左心室+中隔) を算出した。

5.2.3. 統計解析

媒体投与群およびセレキシパグ投与群の生存曲線を GraphPad Prism 6 を用いて作図し、2 群間の比較をログランク検定により実施した。解析には SAS System Version 9.3 および EXSUS Version 8.1.0 を用い、危険率 5%未満を有意と判定した。

5.3. 結果

PAH モデルにおいて、右心不全による死亡に対するセレキシパグの有用性を評価した。Sugen 5416/低酸素曝露により肺高血圧症を発症した Fischer ラットに対し、媒体またはセレキシパグを 21 日間投与した結果、媒体群では Sugен 5416 皮下投与より 34 日後に初めて死亡個体が確認され、42 日後における生存割合は 30%であった。一方、セレキシパグ投与群では Sugен 5416 皮下投与より 42 日後まで全個体が生存しており、セレキシパグ投与群の死亡率は媒体投与群の死亡率と比較し有意に低かった (Figure 5A)。観察終了時点における生存個体について右室重量比を評価した結果、媒体群と比較しセレキシパグ投与群で右室重量比が有意に低かった (媒体投与群 ; 0.62 ± 0.03 、セレキシパグ投与群 ; 0.50 ± 0.02 、Figure 5B)。

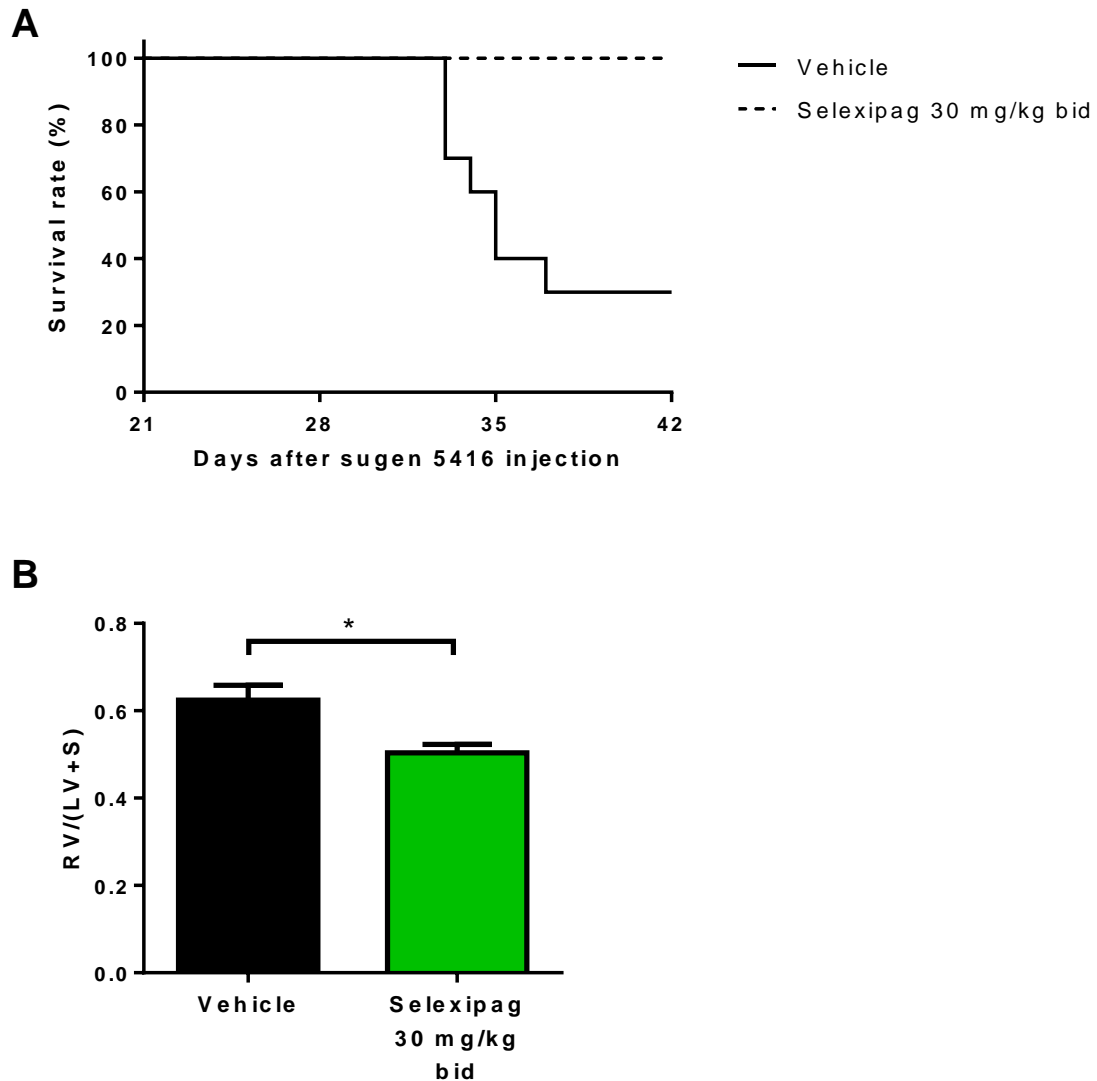


Figure 5 Effect of selexipag on mortality and RV hypertrophy in Fischer rats with SuHx-induced PAH.

(A) Kaplan-meier survival curves for the two groups and (B) RV/LV + S in the surviving animals on day 42. Statistical analysis was performed using log-rank analysis for survival and Student's t-test for RV/LV + S. *P<0.05 vs. vehicle. N = 3–10 per group.

5.4. 考察

Sugen 5416/低酸素曝露の組み合わせにより肺高血圧症を発症した Fischer ラットにおいて、セレキシパグは右心肥大の進行を抑制し、右心不全により死亡する割合を低下させた。我々の知る限り、本実験は Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットの死亡率に対し、PAH 治療薬として承認された薬剤を評価した最初の研究である。PAH において高い肺動脈圧が持続すると、後負荷が増加し、その結果右心肥大が進行し、最終的には右心不全を引き起こす (D'Alonzo et al. 1991、Voelkel et al. 2012)。本研究においてセレキシパグ投与により死亡率が低下したことは、肺血管拡張により肺血管リモデリングが改善し、右室の後負荷が減少した結果による可能性が考えられる。

Chapter 6 おわりに

以上の結果から、プロスタサイクリン受容体作動薬であるセレキシパグは、PAH モデルラットにおいて血行動態および肺動脈閉塞性病変を改善し、右心不全による死亡を抑制した。これらの結果の根底には、肺血管に対するセレキシパグの、プロスタサイクリン受容体を介した強力な作用があると考えられる。本研究結果は、Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットにおいて、血行動態だけでなく肺血管リモデリング、そして右心不全に対するプロスタサイクリン受容体作動薬の作用を検証した初めての報告である。

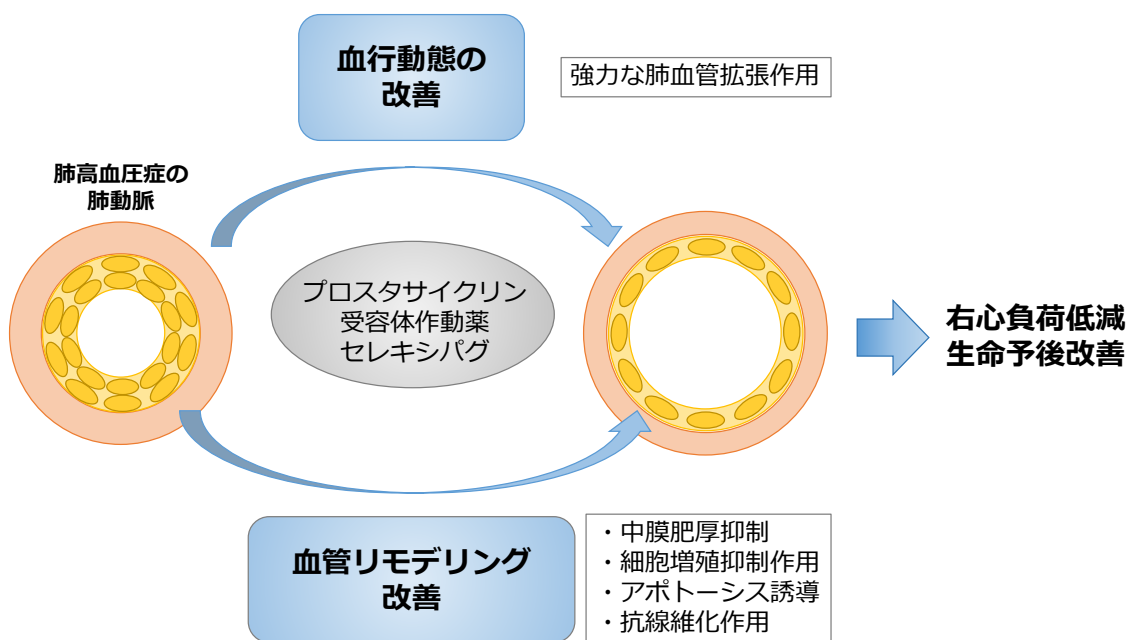


Figure 6 Mechanism of selexipag in PAH.

一方で、肺動脈リモデリングに対するプロスタサイクリン受容体作動薬の詳細なメカニズム、特にアポトーシス誘導作用を報告した研究は無い。今回 Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットにおいて、セレキシパグ投与により認められたアポトーシス誘導作用については、今後 *in vitro* 実験系等も用いて、作用する細胞種やメカニズムについて検証したい。また Sugen 5416/低酸素曝露肺高血圧症モデルラットにおいては、Sugen 5416 皮下投与後 13 週以降において叢状病変を呈することが報告されている (Abe

et al. 2010)。本研究では、Sugen 5416/低酸素誘発肺高血圧症モデルラットにおける組織学的解析で叢状病変は認められなかったため、今後はさらに病態モデルの後期段階においてセレキシパグを評価し、叢状病変形成に対する作用を検討したい。

さらに、右心不全に対するセレキシパグの作用の解明も今後の検討課題である。重症肺高血圧症では、長期の右心負荷により右心不全を呈するが、右心不全では心拍出量、肺動脈血流量が減少するため、肺動脈圧は頭打ち、あるいは低下するため、肺動脈圧は重症度の指標とならない場合がある。そのため、今後は心エコー検査等により、右心機能に対するセレキシパグの作用も検証したい。

セレキシパグは既に PAH 治療薬として承認されている薬剤であり、臨床使用における研究成果も多く報告されている。一方で、臨床での作用または副作用の分子メカニズムについては依然不明な点も多く、詳細な機序解明のためには基礎研究が不可欠であると考えられる。今後もセレキシパグに関する基礎的検討を通じ、未だ解明されていない主作用の詳細な機序や、あるいはこれまで知られていない新規作用を明らかにし、臨床においても有用となる情報を取得していきたい。

引用文献

Schermlay RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology*. 2011. pp.443–455.

D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*. 1991; 115(3): 343–9.

Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995; 333(4): 214–21.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992; 327(2): 70–5.

Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, et al. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 2001; 120(5): 1562–9.

Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 43: 629–634.

Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano K, Matsubara H, Miura D, et al. Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2012; 159(2): 100–6.

Olschewski H, Rose F, Schermuly R, Ghofrani HA, Enke B, Olschewski A, et al. Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*. 2004. pp.139–153.

Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1996; 334: 296–301.

Asaki T, Kuwano K, Morrison K, Gatfield J, Hamamoto T, Clozel M. Selexipag: An oral and selective IP prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Med Chem.* 2015; 58: 7128–7137.

Tanabe N, Ikeda S, Tahara N, Fukuda K, Hatano M, Ito H, et al. Efficacy and safety of an orally administered selective prostacyclin receptor agonist, selexipag, in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2017; 81(9): 1360–1367.

Simonneau G, Torbicki A, Hoeper MM, Delcroix M, Karlovič K, Galiè N, et al. Selexipag: An oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2012; 40: 874–880.

Galiè N, Channick RN, Frantz RP, Grünig E, Jing ZC, Moiseeva O, et al. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2019; 53: 1801889.

Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010; 121: 2747–2754.

Shinohara T, Sawada H, Otsuki S, Yodoya N, Kato T, Ohashi H, et al. Macitentan reverses early obstructive pulmonary vasculopathy in rats: early intervention in overcoming the survivin-mediated resistance to apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015; 308: L523–38.

Bonnet S, Provencher S, Guignabert C, Perros F, Boucherat O, Schermuly RT, et al. Translating research into improved patient care in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; 195: 583–595.

Legchenko E, Chouvarine P, Borchert P, Fernandez-Gonzalez A, Snay E, Meier M, et al. PPAR γ agonist pioglitazone reverses pulmonary hypertension and prevents right heart failure via fatty acid oxidation. *Sci Transl Med.* 2018; 10: eaao0303.

Bogaard HJ, Legchenko E, Chaudhary KR, Sun XQ, Stewart DJ, Hansmann G. Emphysema is at the most-only a mild phenotype in the sugen/hypoxia rat model of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019; 200: 1447–1450.

Bogaard HJ, Legchenko E, Ackermann M, Kühnel MP, Jonigk DD, Chaudhary KR, et al. The

adult sprague-dawley sugen-hypoxia rat is still “the One:” A model of group 1 pulmonary hypertension: Reply to le cras and abman. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 201: 621–624.

Jiang B, Deng Y, Suen C, Taha M, Chaudhary KR, Courtman DW, et al. Marked strain-specific differences in the SU5416 rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016; 54(4): 461–8.

Gomez-Arroyo J, Sakagami M, Syed AA, Farkas L, Van Tassell B, Kraskauskas D, et al. Iloprost reverses established fibrosis in experimental right ventricular failure. *Eur Respir J.* 2015; 45: 449–462.

Chaudhary KR, Deng Y, Suen CM, Taha M, Petersen TH, Mei SHJ, et al. Efficacy of treprostinil in the SU5416-hypoxia model of severe pulmonary arterial hypertension: haemodynamic benefits are not associated with improvements in arterial remodelling. *Br J Pharmacol.* 2018; 175: 3976–3989.

Fuchikami C, Murakami K, Tajima K, Homan J, Kosugi K, Kuramoto K, et al. A comparison of vasodilation mode among selexipag (NS-304; [2-{4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}-N-(methylsulfonyl)acetamide]), its active metabolite MRE-269 and various prostacyclin receptor agonists in rat, porcine and human pulmonary arteries. *Eur J Pharmacol.* 2017; 795: 75–83.

Nakahata N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2008; 118: 18–35.

Yamamoto K, Ebina S, Nakanishi H, Nakahata N. Thromboxane A₂ receptor-mediated signal transduction in rabbit aortic smooth muscle cells. *Gen Pharmacol.* 1995; 26: 1489–1498.

Pankey EA, Bhartiya M, Badejo AM Jr, Haider U, Stasch JP, Murthy SN, et al. Pulmonary and systemic vasodilator responses to the soluble guanylyl cyclase activator, BAY 60-2770, are not dependent on endogenous nitric oxide or reduced heme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300(3): 792–802.

Kuwano K, Hashino A, Asaki T, Hamamoto T, Yamada T, Okubo K, et al. 2-{4-[(5,6-Diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}-N-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304), an orally available and long-acting prostacyclin receptor agonist prodrug. *J Pharmacol Exp Ther.*

2007; 322: 1181–1188.

Nakamura A, Yamada T, Asaki T. Synthesis and evaluation of *N*-acylsulfonamide and *N*-acylsulfonylurea prodrugs of a prostacyclin receptor agonist. *Bioorganic Med Chem.* 2007; 15: 7720–7725.

Kuwano K, Hashino A, Noda K, Kosugi K, Kuwabara K. A long-acting and highly selective prostacyclin receptor agonist prodrug, 2-{4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}-*N*-(methylsulfonyl) acetamide (NS-304), ameliorates rat pulmonary hypertension with unique relaxant responses of its active form, {4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}acetic Acid (MRE-269), on rat pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 326: 691–699.

Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, Wood K, Cool CD, Voelkel N. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J.* 2005; 19(9): 1178–80.

Toba M, Alzoubi A, O'Neill KD, Gairhe S, Matsumoto Y, Oshima K, et al. Temporal hemodynamic and histological progression in Sugen5416/hypoxia/normoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014; 306(2): 243–50.

Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, et al. Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res.* 2007; 100: 923–929.

Kato F, Sakao S, Takeuchi T, Suzuki T, Nishimura R, Yasuda T, et al. Endothelial cell-related autophagic pathways in Sugen/hypoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017; 313: L899–L915.

Kaufmann P, Okubo K, Bruderer S, Mant T, Yamada T, Dingemans J, et al. Pharmacokinetics and tolerability of the novel oral prostacyclin IP receptor agonist selexipag. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2015; 15: 195–203.

Liu P, Yan S, Chen M, Chen A, Yao D, Xu X, et al. Effects of baicalin on collagen and collagen expression in pulmonary arteries of rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Int J Mol Med.* 2015; 35: 901–908.

Orellana R, Garcí'a-Solares J, Donnez J, van Kerk O, Dolmans MM, Donnez O. Important role of collective cell migration and nerve fiber density in the development of deep nodular endometriosis. *Fertil Steril*. 2017; 107: 987–995.

Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV., et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186: 261–272.

Simonneau G, Torbicki A, Hoeper MM, Delcroix M, Karlo'cai K, Galièe N, et al. Selexipag: An oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2012; 40: 874–880.

Abe K, Shinoda M, Tanaka M, Kuwabara Y, Yoshida K, Hirooka Y, et al. Haemodynamic unloading reverses occlusive vascular lesions in severe pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 2016; 111: 16–25.

Gatfield J, Menyhart K, Wanner D, Gnerre C, Monnier L, Morrison K, et al. Selexipag active metabolite ACT-333679 displays strong anticontractile and antiremodeling effects but low β -arrestin recruitment and desensitization potential. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017; 362: 186–199.

Tamura Y, Kumamaru H, Satoh T, Miyata H, Ogawa A, Tanabe N, et al. Effectiveness and outcome of pulmonary arterial hypertension-specific therapy in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2018; 82: 275–282.

Jernigan NL, Naik JS, Weise-Cross L, Detweiler ND, Herbert LM, Yellowhair TR, et al. Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*. 2017; 12.

Mair KM, Wright AF, Duggan N, Rowlands DJ, Hussey MJ, Roberts S, et al. Sex-dependent influence of endogenous estrogen in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 190: 456–467.

Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmüller P, Klinger JR, Nicolls MR, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J*. 2019; 53: 1801887.

Zmajkovicova K, Menyhart K, Bauer Y, Studer R, Renault B, Schnoebelen M, et al. The antifibrotic activity of prostacyclin receptor agonism is mediated through inhibition of YAP/TAZ. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019; 60: 578–591.

Gariè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Coardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016; 37(1): 67–119.

Suen CM, Chaudhary KR, Deng Y, Jiang B, Stewart D. Fischer rats exhibit maladaptive structural and molecular right ventricular remodeling in severe pulmonary hypertension: a genetically prone model for right heart failure. *Cardiovasc Res*. 2019; 115(4): 788–799.

Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ, Nicolls MR. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J*. 2012. pp.1555–1565.

福田 恵一他、肺高血圧症治療ガイドライン（2017年改訂版）、一般社団法人日本循環器学会、2018

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を遂行する上において終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、ご校閲を頂きました金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 創薬科学専攻 薬理学研究室 金田 勝幸 教授に厚く御礼申し上げます。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた、金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 創薬科学専攻 衛生化学研究室 鈴木 亮 教授、同専攻 臨床薬学研究室 菅 幸生 准教授、同専攻 薬物代謝安全性学研究室 深見 達基 准教授、同専攻 薬理学研究室 出山 諭司 准教授に感謝申し上げます。

また、共同研究者としてご協力いただきました、日本新薬株式会社 創薬研究所 桑野 敬市 博士、淵上 千晶 修士、沼倉 佑樹 博士、研開企画部 古杉 圭司 博士、倉本 和也 博士に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究に関して有益なご助言をいただきました、日本新薬株式会社 創薬研究所 Dr. Gerald. E. Smyth、岡 美智子 博士に心より感謝致します。

学位取得にあたり、特別休暇の取得など様々な面でご協力いただきました日本新薬株式会社 探索研究部 藤原 秀豪 部長に厚く御礼申し上げます。

最後に、いつも励まし、温かく見守り、協力してくれた家族に深く感謝いたします。