

可溶性 Epoxide Hydrolase 阻害による 新規肺高血圧症の治療法の開発

所属：佐賀大学 医学部 内科学講座

助成対象者：野出孝一

共同研究者：白木 綾

田中 敦史

中神 啓徳

概要

Epoxyeicosatrienoic acids (EETs)は肺動脈内皮細胞の炎症を減弱し、アポトーシスや肺動脈平滑筋の増殖・遊走を抑制する。EETsは内皮由来過分極因子(EDHF)の有力候補とされ、強力な血管拡張反応を有していることから、肺動脈性肺高血圧症に対して有効であることが期待される。EETsを長時間に作用させるために、その分解酵素である soluble epoxide hydrolase (sEH)をワクチンにより阻害することでEETs活性を上昇させ、その抗炎症・抗線維化作用を発揮させることによる肺高血圧症の治療法を開発した。

abstract

英文の abstract

Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) attenuate inflammation of pulmonary artery endothelial cells, inhibits apoptosis and proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle. EETs are promising candidate for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), which is expected to be effective against pulmonary arterial hypertension because of its potent vasodilatory response.

In order to prolong the action of EETs, we developed a treatment for pulmonary hypertension by inhibiting their degrading enzyme,

soluble epoxide hydrolase (sEH), by using an anti-sEH vaccine to increase EETs levels and exert their anti-inflammatory and anti-fibrotic effects.

研究内容

「背景」

Epoxyeicosatrienoic acid (EET)は肺動脈内皮細胞の炎症を減弱させ、肺動脈内皮細胞のアポトーシスや肺動脈平滑筋のmigrationを抑制する作用を持つ。EETはEDHFの最有力候補とされ、強力な血管拡張反応を有していることが報告されていることから、(肺動脈性)肺高血圧症に対して大有効であると期待される。動物実験では体内EET濃度を上昇させる可溶性エポキシド・ヒドロラーゼ/soluble epoxide hydrolase(sEH阻害剤)がモノクロタリン誘発性肺高血圧ラットにおいて有効である。開発された数個のsEH阻害剤については人への応用が試みられようとしてつつあるものの、メタボリック症候群などが対象であり、肺高血圧症に関しての適用は考慮されていない。そこで、受容体が不明であり半減期の短いEETを長時間作用させ、肺高血圧の治療として用いるため、我々はワクチン治療を採用することを考えた。ワクチンによる慢性疾患への治療は、現在、主に動物モデルにおいて試みられている。例えば、アンジオテンシンⅡに対するワクチンにより血圧の低下が認められ、糖尿病モデルマウスにおいて、DPP4に対するワクチンにより血糖の改善が認められるなど、ワクチン治療は新規の治療法として注目されている。高血圧治療に関しては、すでにヒトへの臨床試験も始まっている。

「目的」

本研究では、EETの分解酵素であるsoluble epoxide hydrolase (sEH)をワクチンにより阻害することで体内のEETを上昇させ、長時間に亘ってその抗炎症・抗線維化作用を発揮させることを目指した。具体的には、ウィスターラットに、モノクロタリンを投与し肺高血圧症を発症させ、抗sEHワクチンの効果を検討した。これにより、肺高血圧症の治療方法を開発することを目的とした。

「研究方法」

本研究は、可溶性 Epoxide hydrolase (sEH) を標的としたワクチン治療により sEH を阻害し、肺高血圧症に対する創薬を行う。血管拡張作用と抗炎症効果を持つ EETs を増加させ、肺動脈肥厚を抑制することにより肺高血圧症を治療することを目指した。

本研究ではモノクロタリン誘発肺高血圧症ラットに対しワクチン治療を試み、予後改善効果、肺動脈圧測定による圧軽減効果、肺動脈肥厚軽減効果など、動物モデルにおける有効性を確認する。さらに、sEH 構造のどの部分がワクチン治療に適しているのかを明らかにした。

中和抗体を産生可能な部分を解析し、ペプチド化した後、T 細胞活性化を促す KLH (keyhole limpet hemocyanin) と結合させ、フロイントのアジュバントと混和して投与した。

1) ワクチンの製造

sEH の構造解析を行い、酵素活性部分、構造保持部分、結合部などの重要部分に位置する場所の候補ペプチドを製造する。BL6 マウス (4 匹、8~9 週齢雄マウス, n=4) に投与し、中和抗体が産生されるペプチドを探索した。抗体価が上昇する有力ペプチドを絞り込んだ。

2) ワクチンの効果の探索

モノクロタリン誘発性肺高血圧モデルラット (n=20)

肺の末梢動脈に炎症を起こさせる MCT 投与時に EET が十分に上昇している必要があることから、4 週齢 Wistar rat に対しワクチン治療を開始した。ワクチンは 2 週間毎に投与した。MCT は 8 週齢で投与した。効果判定については、生存曲線による予後改善効果、右室壁/左室壁重量、心臓/体重比、超音波、心内圧カテーテルによる心機能計測、病理的検索、蛋白発現解析などで行った。体内での EET 濃度上昇は採血により、質量分析にて行った。サーチュインやテロメア長なども検討した。

動物実験に関しては、動物愛護の精神に基づき、3R の原則を順守した。

「結果」

モノクロタリン誘発性肺高血圧症モデルラットが病理学的に肺動脈リモデリングを起こしていたことから、肺高血圧症のモデルとして利用することが可能であることが判明した。

血清中の抗体価量を検討し、ワクチン投与は4週、6週、8週、10週の計4回の皮下投与が適していることが判明した。抗sEHワクチンで血清中のsEH中和抗体の上昇、sEH酵素活性の抑制されていることが確認された。よって、抗sEHワクチンがラット生体内において我々が想定した薬理学的作用を発揮していることが確認された。

「今後」

現在我々はsEHワクチンがモノクロタリン誘発性肺高血圧症に対し保護的効果があるか否か実験中である。sEHワクチンは肺高血圧症のみならず、心筋梗塞や心不全にも効果を認める可能性があることから、これらの疾患群についても治療効果を確認していく予定である。

引用文献

特記事項なし

本助成に関わる成果物

[論文発表]

未発表

[口頭発表]

未発表

[ポスター発表]

未発表

[その他]