

慢性血栓塞栓性肺高血圧症におけるリオシグアトを通じた血管内皮前駆細胞の役割

研究分担者 坂尾 誠一郎

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器内科学 准教授

研究要旨

肺血管内皮細胞の障害は肺血管の機能維持に悪影響を及ぼし、慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）において血栓溶解の遅延や肺血管リモデリングを起こす。血管内皮前駆細胞（EPCs）は骨髄から血管障害部位に誘導され、修復や血管新生に関わるとされるが、CTEPH における EPCs の役割、特に可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）刺激下における EPCs の機能は明らかではない。従って我々は sGC 刺激薬であるリオシグアトが EPCs の数と機能に影響を及ぼしているか調べることを目的とした。CTEPH 患者のうち抗凝固療法以外の治療未導入の者 16 名（Naïve 群）とリオシグアト内服中の患者 14 名（Riociguat 群）の合計 30 名を対象とした。Riociguat 群の末梢血中の EPCs 数は Naïve 群と比較し有意に高値であった。また、血管新生に関連する遺伝子も Riociguat 群は Naïve 群と比較し有意に高発現していた。さらにヒト肺微小血管内皮細胞（hPMVECs）を EPCs で刺激すると、Riociguat 群で刺激した hPMVECs は Naïve 群で刺激したものに比べ、脈管形成能も遊走能も有意に亢進していた。これらの機能は sGC 刺激薬の一つである BAY41-2272 で刺激した hPMVECs よりも勝っていた。以上より、CTEPH においてリオシグアトは EPCs を通じ内皮細胞の機能を高めることで病態に対し、保護的に働く可能性がある。

共同研究者：

山本慶子、西村倫太郎、加藤史照、内藤亮、須田理香、関根亜由美、重城喬行、重田文子、田邊信宏、巽浩一郎

A. 研究目的

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）は進行性の希少疾患で、内科的治療としては血管拡張薬が主体であるが、肺末梢動脈のリモデリング抑制も重要な治療標的となりうる。したがって CTEPH における肺血管内皮機能は重要な研究課題の一つである。血管内皮前駆細胞（EPCs）は骨髄から障害血管部位に誘導され内皮の修復や血管新生に関与するとされるが、病的状態においては血管リモデリングに関与するとの報告もある。PAH において末梢血液中 EPCs が肺血管拡張薬による治療後に増加したとの報告があるが、その機能や治療効果については PAH においても CTEPH においても明らかになっていない。一方肺血管拡張薬の中ではホスホジエステラーゼ 5 インヒビター（PDE5i）、可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）刺激薬、エンドセリン受容体拮抗薬（ERA）において内皮機能改善効果や血管リモデリングの予防効果が報告されている。以上より sGC 刺激薬であるリオシグアトも循環血液中 EPCs の数と内皮機能を改善し、ひいては血管リモデリング抑制作用をもつ可能性が考えられる。本研究では CTEPH における EPCs を通じたリオシグアトの作用を確認することを目的とした。

B. 研究方法

CTEPH 患者のうち抗凝固療法以外の治療未導入の者 16 名（Naïve 群）とリオシグアト内服中の患者 14 名（Riociguat 群）の合計 30 名を対象とした。末梢血液中の EPCs 数の測定はフローサイトメトリーを用い、CD34⁺/CD133⁺ /CD309⁺を EPCs と定義しカウントした。EPCs の機能測定は PCR 法ないしヒト肺血管微

小内皮細胞(hPMVECs) を各群 EPCs および EPCs の上清 (EPCs-CM) で刺激し tube formation assay および wound healing assay で評価した。さらに、sGC 刺激薬の hPMVECs に対する直接作用と比較するため、BAY41-2272 で hPMVECs を刺激し EPCs-CM による刺激と比較した。

C. 研究結果

Naïve 群と Riociguat 群のベースラインは性別、年齢、血行動態、運動耐用能等において有意な差は認めなかった。循環血液中の EPCs(CD34⁺/CD133⁺/CD309⁺ cells)は Riociguat 群は Naive 群と比較し有意に高値だった。Naïve 群の EPCs と血行動態その他のパラメーターに相関は認めなかった。EPCs における血管新生関連の PCR-array を施行したところ、84 種類中 26 もの遺伝子で Riociguat 群の EPCs は Naive 群より有意に高発現していた一方、Naive 群 EPCs が Riociguat 群 EPCs より有意に高発現している遺伝子はひとつもなかった。さらに hPMVECs と EPCs および EPCs-CM との共培養において Riociguat 群では Naïve 群と比較し有意に tube formation と wound healing assay で勝り、その作用は BAY41-2272 による直接刺激より勝った。

D. 考察

本研究で、リオシグアトは CTEPH 患者の EPCs を通じ内皮機能を高めること、その作用は sGC 刺激薬の直接作用より勝っていたことを示した。また、PCR-array においても Riociguat 群の EPCs は血管新生に関する遺伝子を高発現していた。さらに、リオシグアトによる治療で末梢血中の EPCs 数が上昇する可能性を示した。CTEPH における不十分な血管新生はリモデリングに関与し、予後不良因子であるとの報告があることを踏まえると、リオシグアトによる治療は CTEPH の EPCs を通じ内皮機能を高め、末梢血管のリモデリングを防ぐ可能性が考えられる。この作用は PEA の適応外となっている末梢型 CTEPH や PEA 後残存肺高血圧を呈する患者に特に有用である可能性がある。

E. 結論

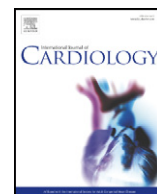
リオシグアトによる治療は CTEPH の EPCs を通じ血管内皮機能を高め、末梢血管のリモデリングを防ぐ可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文

Yamamoto K, Nishimura R, Kato F, Naito A, Suda R, Sekine A, Jujo T, Shigeta A, Sakao S, Tanabe N, Tatsumi K. Protective role of endothelial progenitor cells stimulated by riociguat in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol.* 2020;299:263-270.

doi:10.1016/j.ijcard.2019.07.017.



Protective role of endothelial progenitor cells stimulated by riociguat in chronic thromboembolic pulmonary hypertension☆☆☆

Keiko Yamamoto^{a,*}, Rintaro Nishimura^a, Fumiaki Kato^b, Akira Naito^a, Rika Suda^a, Ayumi Sekine^a, Takayuki Jujo^a, Ayako Shigeta^a, Seiichiro Sakao^a, Nobuhiro Tanabe^a, Koichiro Tatsumi^a

^a Department of Respiriology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, Japan

^b Department of Respiriology, Hamamatsu Medical Center, 432-8580, 328, Tomitsuka-cho, Naka-ku, Hamamatsu-shi, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2019

Received in revised form 6 June 2019

Accepted 4 July 2019

Available online 15 July 2019

Keywords:

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension

Soluble guanylate cyclase

Endothelial progenitor cells

Angiogenesis

ABSTRACT

Background: Pulmonary endothelial damage has a negative impact on the maintenance of normal pulmonary vascular function. Such damage results in delayed thrombus dissolution and vascular remodeling in chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). Although endothelial progenitor cells (EPCs) may be incorporated into neovasculature during vascular repair, their function in CTEPH remains unclarified, especially under the augmentation of soluble guanylate cyclase (sGC) activity.

Methods and results: We evaluated the effect of EPCs on endothelial function and compared the effect of riociguat, a sGC stimulator, on the number and function of circulating EPCs in two groups of CTEPH patients. The two groups consisted 16 CTEPH patients who were treatment naïve (Naïve group), and 14 CTEPH patients who were being treated with riociguat, a sGC stimulator (Riociguat group). The number of circulating EPCs in the Riociguat group was significantly higher than that in the Naïve group. Gene expression levels associated with angiogenesis were significantly higher in EPCs of the Riociguat group. EPC-stimulated tube formation and migration of human pulmonary microvascular endothelial cell (hPMVEC) in the Riociguat group exceeded that in the Naïve group. The angiogenic ability of hPMVECs stimulated by EPCs in the Riociguat group was enhanced compared to that of the sGC stimulator, BAY 41–2272.

Conclusion: These findings indicate that riociguat may induce EPCs to play a protective role via modulation of endothelial functions associated with CTEPH.

Translation aspect of the work: Endothelial dysfunction exacerbates CTEPH. Riociguat enhanced the protective role of EPCs via neovascularization, which prevented vascular remodeling and alleviated CTEPH.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is a rare and progressive disease. It is characterized by organized thrombi that obstruct pulmonary arteries and cause small vessel disease, similar to those present in pulmonary arterial hypertension (PAH) [1,2]. Medical treatment of CTEPH targets vasodilation. However, pulmonary vascular remodeling is also an important therapeutic target in CTEPH. Endothelial repair mechanisms including

angiogenesis may play a crucial role in vascular remodeling. Therefore, detailed investigations of pulmonary endothelial functions, and their association with vascular injury and repair, may lead to therapeutic benefits to CTEPH patients.

Endothelial progenitor cells (EPCs), derived from the bone marrow, enter peripheral circulation to participate in re-endothelialization or neovascularization of damaged vessels, either directly or through paracrine effects [3]. However, controversial findings, such as EPC dysfunction as well as EPC participation in vascular remodeling, have been reported in PAH [4,5]. Reportedly, the number of circulating EPCs is elevated in PAH patients treated with vasodilators [4,6]. However, neither the function of circulating EPCs nor the effect of treatment on EPCs have been satisfactorily elucidated in PAH or CTEPH.

Pulmonary vasodilators are commonly used in both PAH and CTEPH. It has been reported that vasodilators including phosphodiesterase 5 inhibitor (PDE5i), soluble guanylate cyclase (sGC) stimulator, and the endothelin receptor antagonist (ERA) have augmented endothelial function [7], and prevented vascular remodeling in rat PAH models [8].

☆ **Statement of Authorship:** The authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

☆☆ **Acknowledgement of grant support:** This study was supported in part by a grant from the Respiratory Failure Research Group of the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan [H26-Intractable Diseases-General-076], a grant from the Pulmonary Hypertension Research Group from the Japan Agency for Medical Research and Development, AMED [15ek0109127h0001], and by JSPS KAKENHI [JP19K17665].

* Corresponding author at: Department of Respiriology, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan.

E-mail address: shiitake@mx7.ttcn.ne.jp (K. Yamamoto).

