

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）選択的 Rho キナーゼ阻害薬の肺高血圧症患者における有効性評価を可能とするコンパニオン診断薬の開発

（英語）Development of a companion diagnostic agent that makes it possible to evaluate the efficacy of selective Rho-kinase inhibitors in patients with pulmonary hypertension

研究開発実施期間：2015年4月1日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）佐藤 公雄

（英語）Kimio Satoh

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）高度教養教育・学生支援機構 臨床医学開発室/東北大学病院・循環器内科

（英語）Institute for Excellence in Higher Education /Department of cardiovascular medicine, Tohoku University

II 研究開発の概要

肺高血圧症は依然として予後不良の疾患である。近年、新しい分子標的薬が使用できるようになったが、これらの薬剤の投与により有効性を発揮できる患者を予め知る手段は無く、多剤併用している現状がある。また、これらの分子標的薬は非常に高価であり、より有効性を発揮できる患者選択と信頼できる有効性の評価方法が必要とされている。従って、肺高血圧症の患者選択や薬剤有効性評価の為に診断薬の開発は、薬剤の有効性の投薬前予測が可能となり、投与後の有効性評価も可能とする。以上の目的の為に、酸化ストレス増幅蛋白サイクロフィリンAに着目した測定キット開発を進めてきた。さらに、本研究課題実施によりライブラリー化された大量の肺高血圧症患者由来の血清・血漿・樹立細胞を用い、昨今可能となったメタボローム解析や全エクソーム解析を網羅的に行うことで、多面的な次世代診断法や治療効果の評価方法開発に繋がる探索的スクリーニングを実施した。

1. サイクロフィリン A の病態的意義

ヒト血漿中でのサイクロフィリン A (CyPA) の意義については、未解明の点も多く、さらなる心血管疾患における病態との関連を解明する意義は高い。本研究における病態意義の解明のため、最近爆発的に増加している高齢者心不全患者における臨床的意義についても検討を行ったところ、心不全患者では健常者に比して血漿中 CyPA 濃度が著明に上昇していることが確認された (図1)。実際、心不全患者が肺高血圧症を伴うと非常に予後が悪いことが分かっていることから、血漿中 CyPA 値が予後予測のバイオマーカーとして有効であることが示唆された。そこで、175 名の心不全患者の長期予後情報を収集し、予後予測能の評価を行ったところ、血漿中 CyPA 濃度が高い (10 以上) 患者群では低い患者群に比して、長期生命予後が著しく悪いことが判明した (図2)。また、心不全のバイオマーカーとして既に確立されている BNP との比較を行ったところ、Hazard ratio について、BNP が 3.0 であるのに対して、CyPA では 3.8 と非常に高いことが判明した (図2)。さらに、CyPA と BNP を組み合わせることで、Hazard ratio 8.6 まで上昇し、非常に高い予後予測能を有することが確認された (図3)。このように、CyPA と BNP を併用することで、全く新しい切り口の心不全患者の予後予測のためのバイオマーカーとして有効であることが分かった。以上、心機能低下患者における血漿中 CyPA の意義の検証により、これまで検証出来ていなかった新たな病態における重要性を確認することが出来た。

2. 肺高血圧症患者由来試料を用いたオミックス解析

肺高血圧症の病態の本質は、肺動脈血管平滑筋細胞の異常な増殖性にあるが、そのメカニズムは不明である。そこで、肺動脈血管平滑筋細胞の発現蛋白や分泌蛋白のオミックス解析を進め、候補物質の発展的なスクリーニングを実施することとした。患者由来の血漿検体を用いた網羅的検証を、東北メディカル・メガバンク機構 (ToMMo) のプラットフォームを用い実施した。また、種を超えた再現性を考慮し、実際の患者由来の肺動脈血管平滑筋細胞の培養液に加えて、患者由来血漿と肺高血圧モデル動物の血漿について、それぞれメタボローム解析を実施した。それぞれの解析で有意差をもって変動していた分子の重なり合いを評価し、全てのサンプルで有意差をもって変動していた分子に着目し、肺高血圧症患者血漿中濃度

図1. 心不全患者では血漿中CyPAの上昇を認めた。

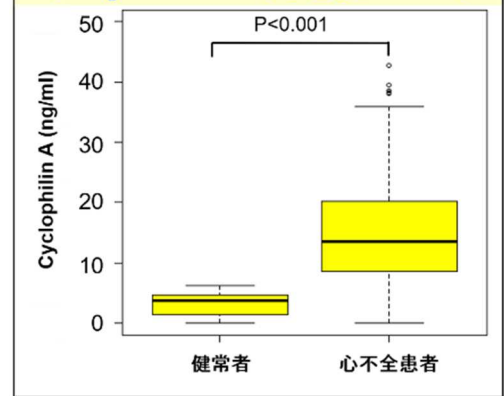


図2. 血漿中CyPA濃度は心不全患者の予後を予測する

一次エンドポイント: 全死亡、心不全入院

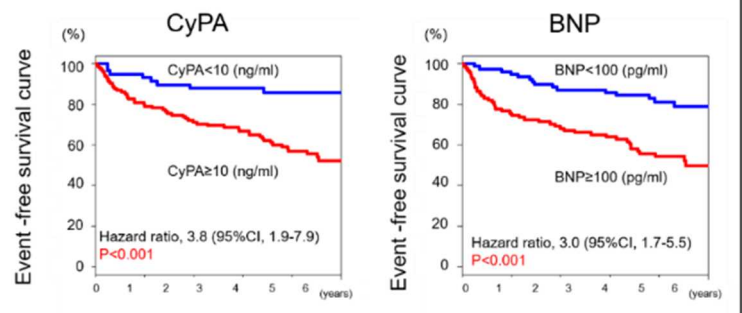
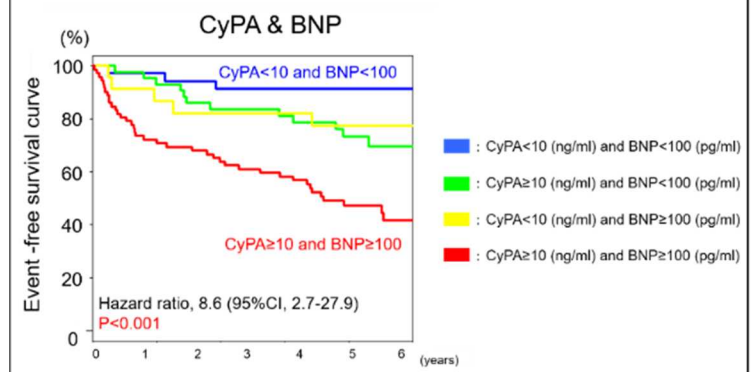


図3. 血漿中CyPAとBNPによるイベント予測

一次エンドポイント: 全死亡、心不全入院



の変化を確認する解析を行ったところ、肺高血圧症のタイプ別診断も可能とする全く新しい分子が複数見出されてきた。さらに、肺高血圧症患者の末梢血サイトカインの網羅的解析を実施した。このように、構築済みの末梢血サイトカインデータ・次項で述べる全エクソーム解析データに、本項のオミックス研究データを加え、全データの網羅的比較解析を行うことで、世界初の早期診断技術発見の基盤構築に成功した。今後は、得られたビッグデータを多角的に解析することで、次世代バイオマーカーに資するファクターの組み合わせを抽出して行く作業を実施していく。

3. 肺高血圧症患者における全 exome 解析データの臨床情報との比較解析

肺高血圧症患者の遺伝子サンプルについては、全 Exome 解析によって一塩基多型 (SNP) のスクリーニングを実施した。ToMMo の健常人パネルとの比較において、有意差を有する SNP が一人の患者当たり約 4000 あることが分かった。ToMMo の健常人全ゲノムパネルは、上記の肺高血圧症患者と同一の地域 (主に東日本) から登録された比較対象遺伝子パネルであり、比較情報としての妥当性とデータ精度が非常に高く、これまで世界的にも行われてこなかった精度の高い比較が可能であり、全く新しい SNP の発見が期待される。実際、今回実施した最初のスクリーニングによって、全く新しい SNP が複数見出されてきた。希少疾患で限られた症例数の検討でありながら、これまでに報告されていないような新規病因蛋白が見つかり始めている。このように、日本の肺高血圧症患者においても多彩な遺伝的背景を有することが本研究で確認することが出来た。こうした遺伝的背景に加え、各種の環境因子の刺激によって発症が促進されて肺動脈性肺高血圧症が進行することが伺われるが、それぞれの因子がどのようなネットワークを形成することで、その発症を規定しているのかについては、全く分かっていない。

4. 今後の課題と方向性

進行した肺高血圧症患者由来の肺動脈血管平滑筋細胞は癌類似の増殖性を示すために微小肺動脈壁の肥厚を起こし、内腔の狭小化が進行し、肺高血圧症の発症に至る。我々は別の研究で、健常者由来の肺動脈血管平滑筋細胞と患者由来細胞の遺伝子発現の網羅的比較を行い、有意差を示す 1858 種類の発現遺伝子の変化を確認した。本研究では、mRNA レベルからさらに進めて、前項で述べたオミックス解析による分子・蛋白網羅解析の結果が得られた。さらに、遺伝的背景 (SNPs) についても大量のデータを得た。遺伝子サンプルについては、ToMMo との共同研究によって、全エクソーム解析データが手元にある。膨大な遺伝子情報に加えて、血清中サイトカイン・アレイデータ、カテーテルによる血行動態評価も含めた重症度や治療反応性等の臨床データが紐づけされた状態であり、あらゆる横断的解析が可能な基盤が整った。一人の患者あたり、exome だけでも平均 4000 の SNP の存在が明らかになってきたことから、今後は臨床情報との網羅的比較解析を進めていく。このように、臨床検体由来のビッグデータを多層的に解析し、それらが形成するネットワーク網を解き明かすことで、より詳細な病態の理解と発展的な診断技術開発を進めていく。本来の目的は、一つのターゲット分子・サイクロフィリン A のキット開発を目的とした患者由来ライブラリーの構築であったが、本研究助成のお蔭で今後の発展的な研究基盤を構築するための大量の情報を得ることが出来た。今後、この情報基盤を有効利用し、全く新しい早期診断や薬剤治療評価のためのバイオマーカーのスクリーニングを進めていく。

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is still a disease with poor prognosis. Recently, we can use new molecular-targeted drugs. However, it is difficult to know patients who can demonstrate their effectiveness before administration of these drugs. In addition, these drugs are very expensive, and thus it is necessary to select a patient that can demonstrate more efficacy and a method for evaluating reliable effectiveness. Here, selection of a patient with PAH and development of a diagnostic agent for evaluating drug effectiveness makes it possible to predict the efficacy of a drug before its administration. For these purposes, we have been developing the measurement kit

focusing on the oxidative stress-augmenting protein cyclophilin A (CyPA). In this project, by using blood samples and primary-cultured pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from patients with PAH, we also conducted an exploratory screening leading to the development of next generation diagnostic and evaluation methods of the therapeutic effects.

1. Pathophysiological Significance of CyPA

As to the significance of CyPA in human plasma, it is crucial to elucidate the relationship with pathological condition in several cardiovascular diseases. In the present study, based on the increasing elderly heart failure patients, we investigated the role of plasma CyPA in those patients. As a result, in the heart failure patients, plasma levels of CyPA were significantly elevated compared with those without heart failure. Here, it is known that patients with heart failure have very poor prognosis when they had with pulmonary hypertension. Thus, we next performed analyses on long-term prognosis of 175 patients with heart failure. Importantly, we found that long-term prognosis was poor in patients with higher plasma CyPA (>10 ng/mL) compared with those with lower CyPA. Furthermore, by combining CyPA and BNP, the hazard ratio rose up to 8.6 and had a very high prognostic potential. Thus, by using CyPA and BNP in combination, it will be effective to predict prognosis in patients with heart failure.

2. Omics Analysis Using Samples Derived from Patients with PAH

The essence of the pathology of PAH is excessive proliferation of PASMCs, but its mechanism is still obscure. Thus, we conducted advanced screening of candidate substances by promoting the omics analysis of expressed protein and secretory protein from PASMCs. Comprehensive verification using plasma specimens derived from patients was conducted using the platform in Tohoku Medical and Mechanical Banking Organization (ToMMo). Additionally, in consideration of reproducibility beyond species, metabolomic analysis was performed on plasma from PAH patients and plasmas from animal models of pulmonary hypertension in addition to culture media of PASMCs from PAH patients. We evaluated the overlapping of molecules that changed with significant differences in each analysis. Then, we focused on the molecules which changed with significant difference in all samples and analyzed to confirm the change in plasma concentration of PAH patients. Here, several completely new molecules have been found which make it possible to diagnose based on the type of pulmonary hypertension. In this way, by adding the Omics research data, we have established a system for comprehensive comparative analysis of all data. Now, it is possible to discover the world's first early diagnosis technology. From now on, by analyzing the obtained big data diversely, we will carry out the task of extracting combinations of factors that contribute to the next generation biomarkers.

3. Comparative Analysis of Clinical Information and Total Exome Data in Patients with PAH

For genetic samples of patients with pulmonary hypertension, single nucleotide polymorphism (SNP) screening was performed by total exome analysis. In comparison with the healthy panel of ToMMo, there was about 4000 SNPs with significant difference per patient. By using the system, it is expected to discover a completely new SNP in patients with pulmonary hypertension. Indeed, several new SNPs have been found in the first screening conducted up to now.

4. Future Direction

PASMCs harvested from advanced patients with PAH show cancer-like proliferation, causing thickening of the pulmonary artery wall, progress of narrowing of the lumen, and the development of pulmonary hypertension. In this study, further progress was made from the mRNA level, and results of the molecular / protein coverage analysis by the omics analysis described in the previous section. Furthermore, a large amount of data was also obtained for genetic background (SNPs). In addition to enormous genetic information, clinical data such as serum cytokine / array data, hemodynamics data from catheter examination, therapeutic reactivity etc are linked, and it is a base on which all cross-sectional analysis is possible. In this way, by analyzing big data derived from clinical specimens in a multilayered manner, we will further understand the detailed pathology and develop diagnostic technology. In the future, we will use this information infrastructure effectively and screen biomarkers for completely new early diagnosis and evaluation of drug treatment.

5. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧

国外論文

1. Kikuchi N, **Satoh K**, Kurosawa R, Yaoita N, Md. Elias Al-Mamun, Mohammad Abdul Hai Siddique, Omura J, Sato T, Nogi M, Sunamura S, Miyata S, Shimokawa H. Selenoprotein P promotes vascular smooth muscle cell proliferation and pulmonary hypertension -A possible novel therapeutic target- *Circulation* 2018 (in press).
2. Satoh T, **Satoh K**, Yaoita N, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Numano K, Md. Elias-Al-Mamun, Mohammad Abdul Hai Siddique, Sunamura S, Nogi M, Suzuki K, Miyata S, Morser J, Shimokawa H. Activated TAFI promotes the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension -A possible novel therapeutic target- *Circ Res*. 120:1246-1262, 2017. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310640
3. Ohtsuki T, **Satoh K**, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, Nogi M, Sunamura S, Yaoita N, Aoki T, Tatebe S, Sugimura K, Takahashi J, Miyata S, Shimokawa H. Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin A in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 37:685-693, 2017. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308986
4. Omura J, **Satoh K**, Kikuchi N, et al. Protective roles of endothelial AMP-activated protein kinase against hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Circ Res*. 119:197-209, 2016. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.308178
5. Suzuki K, **Satoh K**, Ikeda S, et al. Basigin promotes cardiac fibrosis and failure in response to chronic pressure-overload in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 36:636-646, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306686
6. Kudo S, **Satoh K**, Nogi M, et al. SmgGDS as a crucial mediator of the inhibitory effects of statins on cardiac hypertrophy and fibrosis -Novel mechanism of the pleiotropic effects of statins- *Hypertension* 67:878-889, 2016. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.07089
7. Yaoita N, **Satoh K**, Satoh T, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 36: 1293-1301, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306845
8. Yaoita N, **Satoh K**, Shimokawa H. Novel therapeutic targets of pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 36: e97-e102, 2016. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308263
9. Shimokawa H, Sunamura S, **Satoh K**. RhoA/Rho-kinase in the cardiovascular system. *Circ Res*. 118:352-366, 2016. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532
10. **Satoh K**, Kikuchi N, Kurosawa R, Shimokawa H. PDE1C negatively regulates growth factor receptor degradation and promotes vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*. 116:1098-1100, 2015. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306139
11. **Satoh K**. Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases. *Tohoku J Exp Med*. 235:1-15, 2015. (Review) doi: 10.1620/tjem.235.1
12. Shimokawa H, **Satoh K**. 2015 ATVB plenary lecture: translational research on Rho-kinase in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 35:1756-1769, 2015. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305353

(2) 特許

肺高血圧症関連特許 5 件 PCT 出願済み。