



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1967号
学位記番号	第398号
氏名	川出 有希子
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	肺高血圧症における好発年齢モデル動物の確立とコロソリン酸による病態改善効果
論文審査担当者	主査： 牧野 利明 副査： 山村 壽男，伊藤 佐生智，岩尾 岳洋

名古屋市立大学 学位論文

肺高血圧症における好発年齢モデル動物の確立と
コロソリン酸による病態改善効果

令和四年度 (2023 年 3 月)

川出 有希子

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野

(指導：山村 寿男 教授)

Comparative analysis of age and therapeutic effects of
corosolic acid in pulmonary arterial hypertension

Akiko Kawade

Department of Molecular and Cellular Pharmacology

Graduate School of Pharmaceutical Science

Nagoya City University

(Thesis adviser: Professor Hisao Yamamura)

一、本論文は、2023 年 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 牧野 利明 教授
副査 山村 寿男 教授
副査 伊藤 佐生智 准教授
副査 岩尾 岳洋 准教授

二、本論文は、学術誌に収載された次の論文を基礎とするものである。

【基礎となる報文】

1) Kawade A, Yamamura A, Fujiwara M, Kobayashi S, Mori S, Horii C, Hiraku A, Suzumura S, Tsukamoto K, Ohara N, Kondo R, Suzuki Y, Yamamura H.
Comparative analysis of age in monocrotaline induced pulmonary hypertensive rats.
Journal of Pharmacological Sciences, 147(1):81-85 (2021).

2) Kawade A, Yamamura A, Kondo R, Suzuki Y, Yamamura H.
Corosolic acid ameliorates vascular remodeling of pulmonary arterial hypertension via the downregulation of STAT3 signaling.
Journal of Pharmacological Sciences, 151(2):119-127 (2023).

【参考論文】

1) Miyaki R, Yamamura A, Kawade A, Fujiwara M, Kondo R, Suzuki Y, Yamamura H.
SKF96365 activates calcium-sensing receptors in pulmonary arterial smooth muscle cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 607:44-48 (2022).

三、本論文の基礎となる研究は、山村 寿男 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

肺高血圧症における好発年齢モデル動物の確立とコロソリン酸による病態改善効果

川出 有希子

【序論】

肺高血圧症とは、様々な要因により慢性的に肺動脈圧が上昇する予後不良の循環器・呼吸器疾患である。肺高血圧症治療ガイドライン（2017 年改訂版）では、安静時の平均肺動脈圧が 25 mmHg 以上の場合を肺高血圧症と定義している。肺高血圧症は、その病因により 5 群に分類される。臨床分類第 1 群は肺動脈性肺高血圧症（PAH）、第 2 群は左心性心疾患に伴う肺高血圧症、第 3 群は肺疾患や低酸素血症に伴う肺高血圧症、第 4 群は慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）、第 5 群は詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症である。

PAH は最も典型的な臨床像を示す肺高血圧症であり、難病に指定されている（指定難病 86）。特に、家族歴や特定の危険因子を伴わない原因不明の PAH は、特発性肺動脈性肺高血圧症（IPAH）とよばれ、PAH 患者の約半数を占める。PAH は肺動脈の攣縮（過収縮）やリモデリング（肥厚、線維化）と特徴とする病態である。これらの病変によって肺血管内腔が狭窄した結果、肺血管抵抗が増加し、肺動脈圧が持続的に上昇する。病態が進行すると、右室に負荷がかかり、右室肥大、さらには右心不全に至る。

PAH の 5 年生存率は、20 年前は 50 %以下であったが、近年の選択的 PAH 治療薬の開発によって、70 %程度まで改善されている。現在、エンドセリン経路（エンドセリン受容体拮抗薬）、プロスタサイクリン（PGI₂）経路（PGI₂ 製剤、PGI₂ (IP) 受容体作動薬）、一酸化窒素（NO）経路（ホスホジエステラーゼ 5（PDE5）阻害薬、可溶性グアニルシクラーゼ（sGC）刺激薬）に作用する薬剤が PAH 治療薬として用いられている。これらの治療薬は、肺血管拡張作用を主な作用機序としているが、対症療法に過ぎず、患者の生活の質（QOL）の改善は未だ不十分である。また、多くの PAH 症例では、単剤で十分な治療効果が得られないため、作用機構の異なる 2 剤さらには 3 剤の治療薬を用いた併用療法が広く行われている。しかし依然として、PAH の根治治療には至らず、また既存薬に抵抗性を示し、効果が十分に得られない患者も多い。そのため、新たな作用メカニズムを有する PAH 治療薬の開発が期待されている。

肺動脈平滑筋の細胞内 Ca²⁺濃度（[Ca²⁺]_{cyt}）は、筋収縮・弛緩、細胞増殖・分化・死などの多彩な生理機能を調節する。[Ca²⁺]_{cyt} 増加は、主に細胞外からの Ca²⁺流入と細胞内 Ca²⁺貯蔵部位からの Ca²⁺遊離によって起こる。各種刺激に応じた Ca²⁺流入を担うのが、細胞膜上に発現する電位依存性 Ca²⁺チャネル（VDCC）、受容体作動性 Ca²⁺（ROC）チャネル、ストア作動性 Ca²⁺（SOC）チャネルなどの Ca²⁺透過性イオンチャネルである。また、G_q タ

ンパク質共役型受容体 (GPCR) が刺激されると、 G_q タンパク質を介してホスホリパーゼ C (PLC) が活性化され、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) とジアシルグリセロール (DG) が産生される。 IP_3 は筋小胞体 (SR) 膜上の IP_3 受容体 (IP_3R) を活性化し、 Ca^{2+} 遊離を促進する。これらの Ca^{2+} 流入や Ca^{2+} 遊離によって、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ が正常範囲内で上昇すると、肺動脈平滑筋細胞 (PASMCs) は収縮や増殖を起こす。しかし、 Ca^{2+} チャネルの発現機能変化によって、過度の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 増加が持続すると、肺動脈平滑筋の攣縮やリモデリングが起こり、PAH の病態が形成される。

本研究では上記の背景に基づいて、以下の 2 点について研究を行った。

- I. PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立
- II. PAH に対するコロソリン酸の薬効評価

【本論】

I. PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立

背景

本邦において、PAH の発症は年間 100 万人に 1~2 人程度で、2020 年度末での患者数は 4,230 人の希少疾患である。PAH は、性差や好発年齢に特徴がある疾患としても知られ、男女比は 1 対 3.6 で女性に多い。年齢層は 20~70 歳代で幅広い (平均 46.8 歳) が、最も患者数が多いのは 30~40 歳である。特に、若い女性に患者が多いのが PAH の性差と好発年齢の特徴である。性差については、性ホルモンおよびその代謝産物が、PAH の発症および病態形成に深く関与すると考えられている。一方、好発年齢の要因についての研究は、殆ど行われていない。その理由として、PAH の好発年齢の解析に適したモデル動物が確立されていないことが挙げられる。

本研究では、PAH の特徴である好発年齢を再現するモデル動物の確立を目指した。

結果および考察

肺高血圧症のモデル動物として汎用されているモノクロタリン誘発性肺高血圧症 (MCT) ラットを用いて、若年モデル (7 週齢) と高齢モデル (20 週齢) における PAH の病態形成を比較した。カプランマイヤー生存曲線を解析した結果、若年モデルの MCT ラットでは、約 14 日目から肺高血圧症を発症し、平均 23.4 日で死亡した。一方、高齢モデルの MCT ラットでは、42 日以上生存し、死亡したラットは皆無であった。

次に、対照群 (溶媒 (Control) 群) および MCT ラット群の 21 日目における臓器重量 (心臓、肺動脈、大動脈) を若年モデルと高齢モデルで比較すると、両者において、心臓および肺動脈の重量が MCT ラットで増加した。一方、大動脈では差は認められなかった。この結果は、若年モデルと高齢モデルの両者において、PAH の特徴である右室肥大および肺動脈肥厚が生じていることを示している。

対照群および MCT ラット群の 21 日目における右室圧 (RVP) を Millar システムで測定

し、肺動脈圧の指標とされる右室収縮期圧（RVSP）を解析した。若年モデルおよび高齢モデルの両者の MCT ラットにおいて、RVSP の上昇が認められた。また、肺動脈の中膜壁（平滑筋層）の肥厚をヘマトキシリン-エオジン（H&E）染色を用いて解析した結果、若年モデルおよび高齢モデルの両者の MCT ラットにおいて、肺動脈の肥厚が認められた。しかしながら、RVSP や肺動脈肥厚においては、若年モデルと高齢モデルの間に差は認められなかった。さらに、これまでに PAH 患者由来の PSMCs における異常な $[Ca^{2+}]_{cyt}$ シグナルに関与していることを見出した Ca^{2+} 感受性受容体（CaSR）と Ca^{2+} 透過性イオンチャネル（TRPC6）の発現変化を、若年モデルおよび高齢モデルの MCT ラットにおいて比較解析した。ラット PSMCs における CaSR と TRPC6 の mRNA およびタンパク質レベルでの発現は、若年モデルおよび高齢モデルの両者の MCT ラットで増加していた。しかしながら、それらの発現増加においては、若年モデルと高齢モデルの間に差は認められなかった。

以上より、若年モデル（7 週齢）と高齢モデル（20 週齢）の MCT ラットが、PAH の好発年齢を再現することが示唆された。

II. PAH に対するコロソリン酸の薬効評価

背景

現在使用されている PAH 治療薬は、血行動態や生存率を改善させるが、根治療法には至っていない。また、既存薬に抵抗性を示し、治療効果が十分に得られない患者も多い。このことから、既存薬とは異なる標的分子を有する新規 PAH 治療薬の開発が期待されている。

コロソリン酸（CRA）は、東南アジアなどに生息するバナバの葉より抽出される天然のトリテルペノイド化合物である。フィリピンなどでは、古くから民間薬として使用され、抗糖尿病作用、抗炎症作用、抗がん作用、抗脂質異常症作用、抗酸化作用などが知られている。さらに、CRA は細胞増殖、遊走、線維化を抑制し、アポトーシスと細胞周期の停止を促進することが知られているが、それらのシグナルメカニズムは細胞種によって様々であり、平滑筋細胞を対象にした研究は殆ど行われていない。

本研究では、PAH の特徴である肺血管リモデリング（PSMCs の過剰な増殖による肥厚）に炎症が関与していることに着目し、抗炎症作用を有する CRA の PAH に対する薬効を *in vitro* および *in vivo* レベルで検討した。

結果および考察

まず、PAH の肺血管リモデリングに対する CRA の作用を *in vitro* レベルで検討した。正常ヒト由来（Normal）および IPAH 患者由来の PSMCs を使用し、WST アッセイおよび BrdU アッセイによって、細胞増殖に対する CRA の薬効を解析した。WST アッセイの結果、Normal 細胞と IPAH 細胞は、ともに時間依存的に増殖したが、播種後 48 時間では IPAH 細胞の増殖が Normal 細胞よりも高かった。IPAH 細胞では、PAH リモデリングにつながる過剰な PSMCs の増殖が起きていることが示された。次に、Normal 細胞と IPAH

細胞の増殖に対する CRA の効果を検討した結果、Normal 細胞においては、低濃度では増殖に影響を与えなかったが、10 μM 以上の濃度では濃度依存的な増殖抑制が認められた。一方、IPAH 細胞では、Normal 細胞よりも低濃度の 3 μM から濃度依存的に増殖抑制することが明らかになった。3~30 μM CRA における細胞増殖抑制効果は、IPAH 細胞の方が強かった。IPAH 細胞の増殖における CRA の阻害効果の IC_{50} 値は 14.1 μM であった。同様に、BrdU アッセイを用いて、Normal 細胞および IPAH 細胞の増殖における CRA の薬効を解析した結果、WST アッセイと同様の細胞増殖抑制効果が得られた。

Normal 細胞および IPAH 細胞を用いて、トランスウェルアッセイによって、細胞遊走に対する CRA の薬効を解析した。IPAH 細胞の遊走は、Normal 細胞に比べて増加していた。IPAH 細胞で増加した遊走は、20 μM CRA によって抑制された。CRA が PSMCs の増殖や遊走を抑制するシグナルメカニズムについて解明するため、PAH の病態形成に関連することが知られている細胞内シグナル分子である Akt、STAT3、SMAD2 の発現変化をウェスタンブロット法で解析した。その結果、STAT3 の発現が IPAH 細胞で有意に増加し、その発現増加は 1 μM CRA によって有意に減少することを見出した。一方、CRA は Akt や SMAD2 のタンパク質発現には影響を与えなかった。

以上の結果より、CRA は PSMCs に発現する STAT3 のシグナル伝達経路を阻害することによって、IPAH 細胞の増殖や遊走を抑制していることが示唆された。

次に、*in vivo* 実験では、偽手術 (Sham、対照群) ラットおよび MCT 肺高血圧症ラットを作製し、PAH 病態の指標である RVP/RVSP、肺動脈肥厚、右心肥大に対する CRA の薬効を検討した。RVSP を測定した結果、MCT ラットで上昇した RVSP が、CRA (1 mg/kg/day、連日腹腔内投与) によって減少した。MCT ラットにおいては、肺動脈の中膜 (平滑筋層) 肥厚は顕著であったが、その肥厚も CRA によって減少した。さらに、右室肥大の指標となる Fulton 比 (右心室重量 / (左心室 + 心室中隔重量)) を算出した結果、MCT ラットで増加し、CRA により低下した。PAH に関する全ての *in vivo* パラメータにおいて、CRA を投与した対照群 (Sham) 群では影響が認められなかった。以上の結果より、CRA は PAH の特徴である肺動脈圧上昇や肺血管リモデリング、右室肥大を改善させることが明らかになった。

以上の *in vitro* 実験と *in vivo* 実験の結果より、CRA が PAH モデル動物である MCT ラットの病態を改善させることが明らかになった。CRA の作用機序として、PSMCs における STAT3 のダウンレギュレーションを介して、細胞増殖や遊走を阻害した結果、肺血管リモデリングや右心肥大を抑制したと推察された。

【結論】

I. PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立

肺高血圧症モデルラットにおいて、PAH に特徴的な好発年齢を再現可能なモデル動物の確立に成功した。本研究成果は、PAH 病態機構の解明につながる重要な知見であると考えられる。

II. PAH に対するコロソリン酸の薬効評価

CRA は、*in vitro* 実験において、IPAH 患者由来の PSMCs の増殖と遊走を抑制し、*in vivo* 実験においては、PAH モデル動物の RVSP の減少、肺血管リモデリングの抑制、右心肥大の抑制を示した。その結果、CRA によって PAH 病態の改善が認められた。本研究成果は、新規 PAH 治療薬の開発につながる重要な知見であると考えられる。

【総括】

本研究成果は、難病である PAH の病態形成機構の解明に重要な知見であり、既存の治療薬とは異なる作用機序を有する新規 PAH 治療薬の開発につながることを考えられる。

博士論文中に以下の略語を用いた。(アルファベット順に記載)

- AMPK : AMP 活性化プロテインキナーゼ (5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase)
- BrdU : 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (5-bromo-2'-deoxyuridine)
- BSA : ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin)
- BW : 体重 (body weight)
- $[Ca^{2+}]_{cyt}$: 細胞質内 Ca^{2+} 濃度 (cytosolic Ca^{2+} concentration)
- CaSR : カルシウム感受性受容体 (Ca^{2+} -sensing receptor)
- CRA : コロソリン酸 (corosolic acid)
- CTEPH : 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (chronic thromboembolic pulmonary hypertension)
- DG : ジアシルグリセロール (diacylglycerol)
- DMSO : ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)
- EGF : 上皮成長因子 (epidermal growth factor)
- EGFR : 上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor)
- FBS : 牛胎児血清 (fetal bovine serum)
- GPCR : G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor)
- H&E : ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin)
- HRP : 西洋わさびペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase)
- *i.p.* : 腹腔内投与 (intraperitoneal administration)
- IP_3 : イノシトール 1,4,5 三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate)
- IP_3R : イノシトール 1,4,5 三リン酸受容体 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor)
- IPAH : 特発性肺動脈性肺高血圧症 (idiopathic pulmonary arterial hypertension)
- JAK : ヤヌスキナーゼ (Janus kinase)
- LV : 左心室 (left ventricle)
- MAPK : 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated protein kinase)
- MCT : モノクロタリン (monocrotaline)
- mPAP : 平均肺動脈圧 (mean pulmonary arterial pressure)
- mTOR : mammalian target of rapamycin
- NO : 一酸化窒素 (nitric oxide)
- NF- κ B : nuclear factor - kappa B
- Nrf2 : NF-E2-related factor 2
- PA : 肺動脈 (pulmonary artery)
- PAH : 肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension)
- PAP : 肺動脈圧 (pulmonary arterial pressure)

- PASM: 肺動脈平滑筋細胞 (pulmonary arterial smooth muscle cell)
- PASM: 肺動脈平滑筋 (pulmonary arterial smooth muscle)
- PDE5: ホスホジエステラーゼ 5 (phosphodiesterase 5)
- PDGF: 血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor)
- PDGFR: 血小板由来成長因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor)
- PGI₂: プロスタグランジン I₂ / プロスタサイクリン (prostaglandin I₂)
- PH: 肺高血圧症 (pulmonary hypertension)
- PI3K: ホスホイノシチド 3 キナーゼ (phosphoinositide 3-kinase)
- PIP₂: ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
- PLC: ホスホリパーゼ C (phospholipase C)
- QOL: 生活の質 (quality of life)
- ROCC: 受容体作動性 Ca²⁺チャネル (receptor-operated Ca²⁺ channel)
- RTK: 受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase)
- RV: 右心室 (right ventricle)
- RVP: 右室圧 (right ventricular pressure)
- RVSP: 右室収縮期圧 (right ventricular systolic pressure)
- S: 心室中隔 (septum)
- *s.c.*: 皮下注射 (subcutaneous injection)
- SD: Sprague-Dawley
- SDS-PAGE: ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
- SOCC: ストア作動性 Ca²⁺チャネル (store-operated Ca²⁺ channel)
- sGC: 可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase)
- SR: 筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum)
- STAT3: signal transducer and activator of transcription 3
- TBS: トリス緩衝生理食塩水 (tris-buffer saline)
- TF: 転写因子 (transcriptional factor)
- TGF-β: トランスフォーミング増殖因子β (transforming growth factor β)
- TRPC6: transient receptor potential canonical subfamily 6
- VDCC: 電位依存性 Ca²⁺チャネル (voltage-dependent Ca²⁺ channel)
- VEGF: 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor)
- VEGFR: 血管内皮増殖因子受容体 (vascular endothelial growth factor receptor)

目次

第1章 序論	1
i. 肺高血圧症の定義と分類	1
ii. PAH の病態と身体的症状	1
iii. PAH の疫学	2
iv. PAH 治療薬	2
v. PASMCs の Ca^{2+} シグナル	3
vi. カルシウム感受性受容体 (CaSR) と transient receptor potential canonical (TRPC)	4
vii. コロソリン酸 (CRA)	5
viii. STAT・Akt・SMAD シグナル経路	5
ix. 研究の背景・目的	6
第2章 実験方法	7
1. 使用薬物・使用溶液	7
2. 実験動物・動物倫理	7
3. モデル動物作製方法	7
A) 研究1：PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立における肺高血圧症動物モデル	7
B) 研究2：PAH に対するコロソリン酸の薬効評価における肺高血圧症動物モデル	8
4. 生存曲線及び体重変動解析	9
5. 組織形態解析	9
A) ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色	9
B) フルトン比	9
C) 組織重量測定	9
6. 右室圧 (RVP)・右室収縮期圧 (RVSP) 測定	10
7. mRNA 抽出及び定量的リアルタイム PCR (qPCR) 法	10
8. タンパク質抽出及びウェスタンブロッティング法	10
9. 実験細胞・培養方法	11
10. 細胞増殖・細胞生存率解析	11
A) WST 法 (細胞生存率)	11
B) 5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) 法 (細胞増殖)	12
11. 細胞遊走解析	12
12. 統計解析	12
第3章 実験結果	13
I. PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立	13
1. 若年モデルと高齢モデルにおける生存率と形態学的特徴の比較	13
2. 若年モデルと高齢モデルにおける肺動脈圧 (右室収縮期圧) の比較	15

3. 若年モデルと高齢モデルにおける肺血管リモデリングの比較	16
4. 若年モデルと高齢モデルにおける CaSR 及び TRPC6 の発現比較	17
Iの要約と考察	20
II. PAH に対するコロソリン酸の薬効評価	23
1. PASMCs の生存率および細胞増殖に対する CRA の作用	23
2. PASMCs の遊走に対する CRA の作用	26
3. PASMCs の増殖シグナルに対する CRA の作用	27
4. MCT ラットの RVSP に対する CRA の薬理効果	29
5. MCT ラットにおける肺血管リモデリングと右室肥大に対する CRA の薬理効果	31
6. ラット肺動脈平滑筋 (PASM) の STAT3 発現に対する CRA の効果	33
IIの要約と考察	35
第4章 結論	38
第5章 謝辞	39
第6章 引用文献	40

第 1 章 序論

i. 肺高血圧症の定義と分類

肺高血圧症とは、様々な要因により慢性的に肺動脈圧が上昇する予後不良の循環器・呼吸器疾患である。肺高血圧症治療ガイドライン（2017 年改訂版）¹では、安静時の平均肺動脈圧（mean PAP）が 25 mmHg 以上の場合を肺高血圧症と定義している。健常人の mPAP は 14 ± 3 mmHg と報告されている²。肺高血圧症は、その病因により 5 群に分類される。臨床分類第 1 群は肺動脈性肺高血圧症（PAH）、第 2 群は左心性心疾患に伴う肺高血圧症、第 3 群は肺疾患や低酸素血症に伴う肺高血圧症、第 4 群は慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）、第 5 群は詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症である³。PAH は最も典型的な臨床像を示す肺高血圧症であり、難病に指定されている（指定難病 86）。PAH はさらに、特発性肺動脈性肺高血圧症（IPAH）、遺伝性 PAH、薬剤・毒物誘発性 PAH、各種疾患に伴う PAH に細分される。なかでも IPAH は、家族歴や特定の危険因子を伴わない原因不明の PAH であり、PAH 患者の約半数を占める³。

ii. PAH の病態と身体的症状

PAH は肺動脈の攣縮（過収縮）やリモデリング（肥厚、線維化）を特徴とする病態である。肺動脈壁は内膜・中膜・外膜からなる三層構造であり、肺血管のリモデリングは、中膜である肺動脈平滑筋細胞（PASMCs）の増殖に起因する。これらの病変によって肺血管内腔が狭窄した結果、肺血管抵抗が増加し、肺動脈圧（PAP）が持続的に上昇する。病態が進行すると、右室に負荷がかかり、右室肥大、さらには右心不全に至る（図 1）¹。PAH の初期症状は、労作時の息切れが最も特徴的であり、疲労感、胸痛、失神を認めることもある。病状が進行し右心不全を呈すると、肝うっ血や消化管浮腫に伴う腹部膨満感、消化器症状、下腿の浮腫などの全身症状が認められる¹。

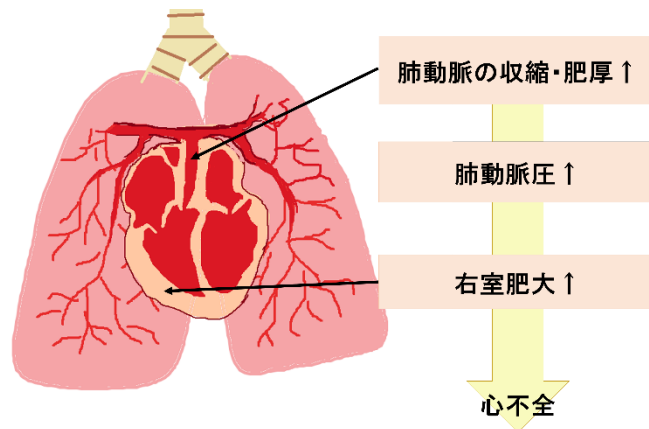


図 1. PAH の病態形成機構

肺動脈の攣縮（過収縮）やリモデリング（肥厚、線維化）によって肺血管内腔が狭窄した結果、肺血管抵抗が増加し、肺動脈圧が持続的に上昇する。病態が進行すると、右室に負荷がかかり、右室肥大、さらには右心不全に至る。

iii. PAH の疫学

本邦において、PAH の発症は年間 100 万人に 1~2 人程度で、2020 年度末での患者数は 4,230 人の希少疾患である。PAH の 5 年生存率は、20 年前は 50 %以下であり、治療未介入の場合、診断からの平均生存期間は 2.8 年と予後不良な疾患であった⁴。近年の選択的 PAH 治療薬の開発によって、生存率は改善されつつあるが、70 %程度に留まっているのが現状である⁵。

PAH は、性差や好発年齢に特徴がある疾患としても知られ、男女比は 1 対 3.6 で女性に多い。年齢層は 20~70 歳代で幅広い（平均 46.8 歳）が、最も患者数が多いのは 30~40 歳である⁶。特に、若い女性に患者が多いのが PAH の性差と好発年齢の特徴である。

iv. PAH 治療薬

現在、PAH 治療薬には 3 系統の薬物が用いられている：①エンドセリン経路（エンドセリン受容体拮抗薬（アンブリセンタン、ボセンタン、マシテンタン）、②プロスタサイクリン（PGI₂）経路（PGI₂製剤（エポプロステノール、ベラプロスト、トレプロスチニル）、PGI₂（IP）受容体作動薬（セレキシパグ）、③一酸化窒素（NO）経路（ホスホジエステラーゼ 5（PDE5）阻害薬（シルデナフィル、タダラフィル）、可溶性グアニルシクラーゼ（sGC）刺激薬（リオシグアト）³。これらの治療薬は、肺血管拡張作用を主な作用機序としているが、対症療法に過ぎず、患者の生活の質（QOL）の改善は未だ不十分である。また、多くの PAH 症例では、単剤で十分な治療効果が得られないため、作用機構の異なる 2 剤さらには 3 剤の治療薬を用いた併用療法が広く行われている¹。しかし依然として、PAH の根治治療には至らず、また既存薬に抵抗性を示し、効果が十分に得られない患者も多い。そのため、新たな作用メカニズムを有する PAH 治療薬の開発が期待されている。

v. PSMCs の Ca^{2+} シグナル

肺動脈平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) は、筋収縮・弛緩、細胞増殖・分化・死などの多彩な生理機能を調節する。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 増加は、主に細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離によって起こる。各種刺激に応じた Ca^{2+} 流入を担うのが、細胞膜上に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC)、受容体作動性 Ca^{2+} チャンネル (ROCC)、ストア作動性 Ca^{2+} チャンネル (SOCC) などの Ca^{2+} 透過性イオンチャンネルである。また、 G_q タンパク質共役型受容体 (GPCR) が刺激されると、 G_q タンパク質を介してホスホリパーゼ C (PLC) が活性化され、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP_2) から、1,4,5-三リン酸 (IP_3) とジアシルグリセロール (DG) が産生される。 IP_3 は筋小胞体 (SR) 膜上の IP_3 受容体 (IP_3R) を活性化し、 Ca^{2+} 遊離を促進する。これらの Ca^{2+} 流入や Ca^{2+} 遊離によって、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ が正常範囲内で上昇すると、肺動脈平滑筋細胞 (PSMCs) は収縮や増殖を起こす。しかし、 Ca^{2+} チャンネルの発現機能変化によって、過度の $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 増加が持続すると、肺動脈平滑筋の攣縮やリモデリングが起こり、PAH の病態が形成される (図 2) ³。

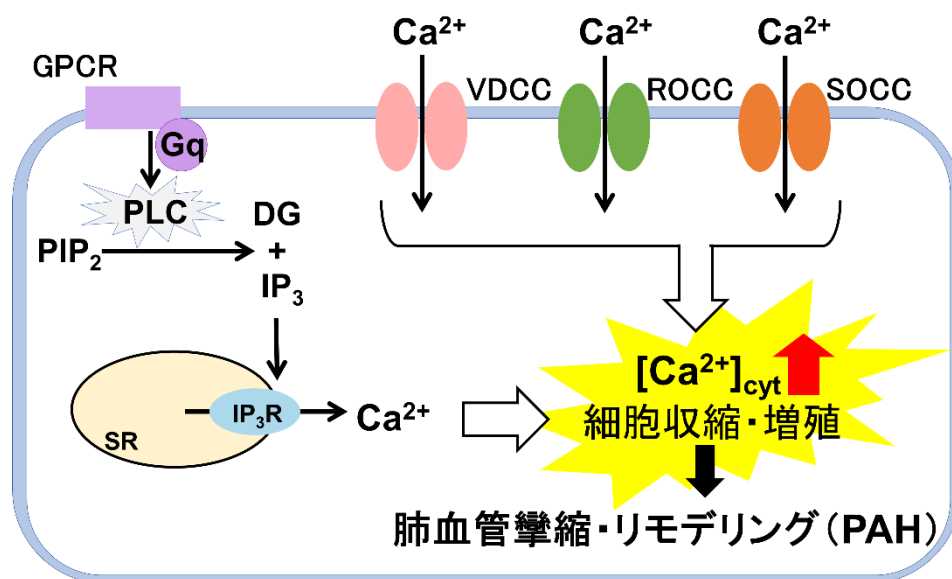


図 2. PSMCs の Ca^{2+} シグナル

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 増加は、主に VDCC、ROCC、SOCC を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離によって起こる。持続的な $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇は、PSMCs の過剰な収縮や増殖を引き起こし、肺血管の攣縮やリモデリングを促進する。

vi. カルシウム感受性受容体 (CaSR) と transient receptor potential canonical (TRPC6)

CaSR や TRPC6 チャネルは、ヒトおよびモデル動物の PSMCs において高発現・機能亢進することが知られている⁷。

CaSR は、細胞外の Ca^{2+} によって活性化される GPCR である。CaSR は G_q タンパク質と共役し、PLC を活性化することで、 PIP_2 から DG と IP_3 を産生する。 IP_3 は SR 膜上の IP_3R に結合し、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位である SR からの Ca^{2+} 遊離を引き起こす。PLC の活性化により産生した DG は、ROCC の一種である TRPC6 の活性化を促すことで、細胞外からの Ca^{2+} 流入を惹起する (図 3)⁸。

このような CaSR と TRPC6 の、発現亢進と機能的連関による Ca^{2+} シグナルの亢進は、PSMCs の増殖を引き起こし、肺血管リモデリングや攣縮を促進することで PAH 病態形成に深く寄与している³。

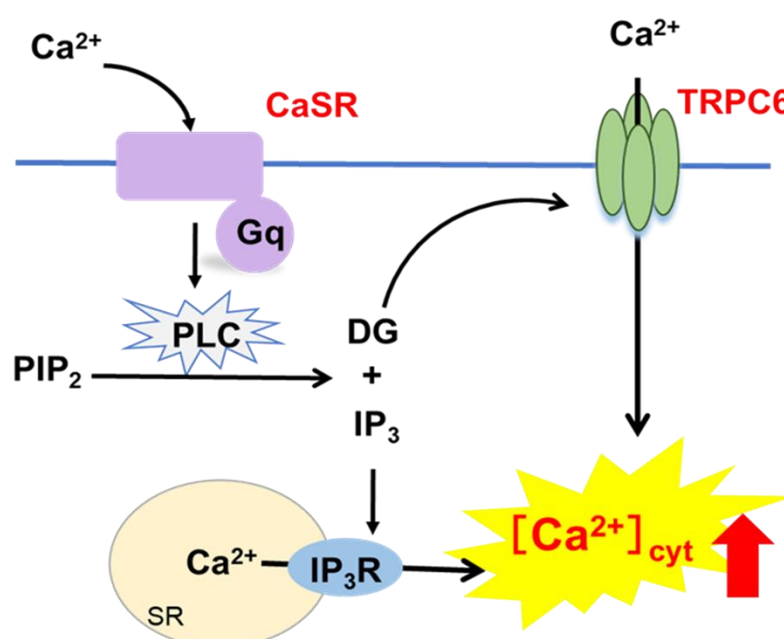


図 3. CaSR と TRPC6 の機能的連関

CaSR は細胞外の Ca^{2+} によって活性化され、 G_q タンパク質と共役し、PLC を活性化することで、 PIP_2 から DG と IP_3 を産生する。 IP_3 は SR 膜上の IP_3R に結合し、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位である SR からの Ca^{2+} 遊離を引き起こす。PLC の活性化により産生した DG は、ROCC の一種である TRPC6 の活性化を促すことで、細胞外からの Ca^{2+} 流入を惹起する。このような機能連関は PAH 病態形成に寄与する。

vii. コロソリン酸 (CRA)

コロソリン酸 (CRA) は、東南アジアなどに生息するバナバの葉より抽出される天然のトリテルペノイド化合物である (図 4) ⁹。フィリピンなどでは、古くから民間薬として使用され、抗糖尿病作用、抗炎症作用、抗がん作用、抗脂質異常症作用、抗酸化作用などが知られている ⁹。さらに、様々ながん細胞において、CRA は細胞増殖、遊走、線維化を抑制し、アポトーシスと細胞周期の停止を促進することが知られている ⁹。特に、卵巣がん細胞において、CRA は **signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)** を介して細胞増殖を抑制したという報告がある ¹⁰。

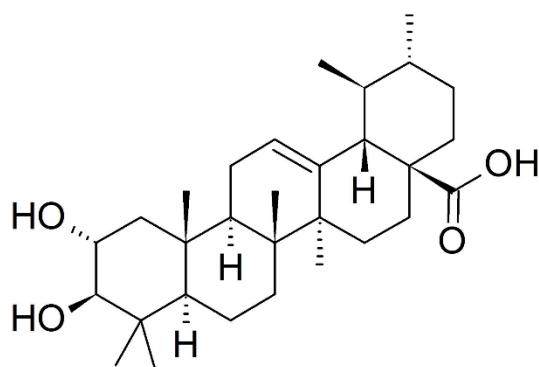


図 4. コロソリン酸の構造

しかし、それらのシグナルメカニズムは細胞種によって様々であり、平滑筋細胞を対象にした研究は殆ど行われていない。

viii. STAT・Akt・SMAD シグナル経路

PAH 病態時には、細胞膜上に発現する受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) や、GPCR の一種である CaSR の発現が上昇することが報告されている ¹¹。その下流因子である、STAT、Akt、SMAD などの分子群は、細胞増殖や遊走、アポトーシスの制御などに寄与することが知られており、PAH 病態形成に重要な因子であると考えられる (図 5)。特に、STAT3 は PAH 患者において発現上昇が認められている ¹²。

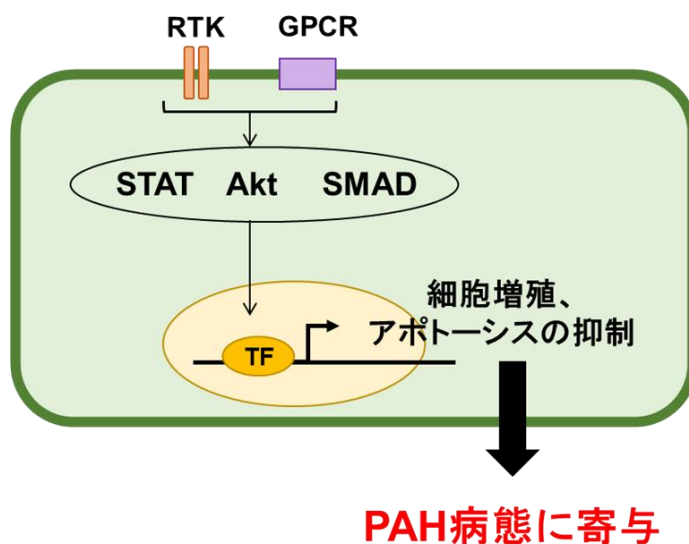


図 5. PAH 病態形成に關与する増殖シグナル
STAT、Akt、SMAD は細胞増殖、遊走、アポトーシスの制御に寄与する因子で、RTK の一種である PDGFR や、GPCR の一種である CaSR などの下流シグナル伝達因子である。これらの増殖因子は PAH 病態の形成に寄与していると考えられる。

ix. 研究の背景・目的

PAH は性差と好発年齢に特徴のある疾患である。性差については、性ホルモンおよびその代謝産物が、PAH の発症および病態形成に深く関与すると考えられている¹³。一方、好発年齢の要因についての研究は、殆ど行われていない。その理由として、PAH の好発年齢の解析に適したモデル動物が確立されていないことが挙げられる。よって本研究では、PAH の好発年齢を再現できるモデル動物の確立を目的とし、若年と高齢のモデル動物を用いて、生存解析や病態を比較検討した。

また、現在使用されている PAH 治療薬は、血行動態や生存率を改善させるが、根治療法には至っておらず、既存薬に抵抗性を示し、治療効果が十分に得られない患者も多い。このことから、既存薬とは異なる標的分子を有する新規 PAH 治療薬の開発が期待されている。

本研究では肺高血圧症モデルラットとして、モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラット（MCT ラット）を用いている。モノクロタリン（MCT）は、マメ科の植物から抽出されるアルカロイドで、*Crotalaria spectabilis* の茎や葉、種子、および *Crotalaria* 属の全植物に含まれる¹⁴。MCT は、ラットにおいて、肝臓シトクロム P450 で代謝され、活性化されることにより、毒性を有すモノクロタリンピロールとなる。モノクロタリンピロールは、心肺系に毒性を示し、肺高血圧症の病態を惹き起こすとされている^{14,15}。MCT ラットは、血行動態や病理組織学的重症度、致死率などの点でヒトと類似しており、再現性や有用性が高いことから、肺高血圧症のモデル動物として汎用されている¹⁵。また、MCT の投与後すぐには肺高血圧症を発症せず、そのプロセスは約 1 週間で徐々に肺血管の炎症・障害などを引き起こし、約 2 週間で PAP が上昇し、約 3 週目には右室肥大に至り、約 4~6 週で死亡するとされている^{15,16}。

本研究では上記の背景に基づいて、以下の 2 点について研究を行った。

- I. PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立
- II. PAH に対するコロソリン酸の薬効評価

第 2 章 実験方法

1. 使用薬物・使用溶液

CRA は、LKT Laboratories (St.Paul, MN, USA) から入手した。その他の試薬は、富士フイルム和光純薬から入手した。

CRA は、*in vitro* 実験では 100 mM、*in vivo* 実験では 10 mg/mL の濃度で、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、ストック原液とした。*in vivo* 実験では、CRA (ストック原液) を 0.1 mg/mL の濃度で生理食塩水に溶解し、ラット体重 100 g あたり 1 mL (1 mg/kg) で腹腔内投与 (*i.p.*) した。

使用した溶液の組成は以下のとおりである。

- ・ PBS (–) : phosphate-buffered saline

137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄

2. 実験動物・動物倫理

動物実験には、Sprague-Dawley (SD) ラットを日本 SLC (浜松) より購入して使用した。

すべての動物実験は、名古屋市立大学・動物バイオ倫理委員会の承認 (H30-P-1) を受け、日本薬理学会の指針に従って実施した。

3. モデル動物作製方法

A) 研究 1 : PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立における肺高血圧症動物モデル

4 週齢もしくは 17 週齢の雄性 SD ラットに溶媒 (生理食塩水, 3 mL/kg, コントロール群) もしくは MCT (60 mg/kg, MCT ラット; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) を単回皮下注射 (*s.c.*) した (図 6)。

4 週齢に上記投与量で、生理食塩水または MCT を投与し、そこから 3 週後の 7 週齢時点を、若年モデルとし、それぞれ、若年モデルコントロールラット (Young Control) または若年モデル MCT ラット (Young MCT) とした。17 週齢においても同様に、生理食塩水または MCT を投与し、そこから 3 週後の 20 週齢時点を、高齢モデルとし、それぞれ高齢モデルコントロールラット (Adult Control) または高齢モデル MCT ラット (Adult MCT) とした。また、生理食塩水または MCT を皮下注射した後、21 日目の各モデルラットにおいて、各臓器・組織 (心臓 (Heart)・肺 (Lung)・肺動脈 (PA)・大動脈 (Aorta)) を摘出した。各臓器・組織重量は、各ラットの BW

で補正した。肺組織は摘出後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、H&E 染色に使用した。また、21 日目の各モデルラットをケタミン（100 mg/kg）とキシラジン（26 mg/kg）の腹腔内注射により麻酔し、右室圧（RVP）・右室収縮期圧（RVSP）を測定した。

以下、Young Control と Young MCT をまとめて、若年モデルと表記し、Adult Control Adult MCT をまとめて高齢モデルと表記する。

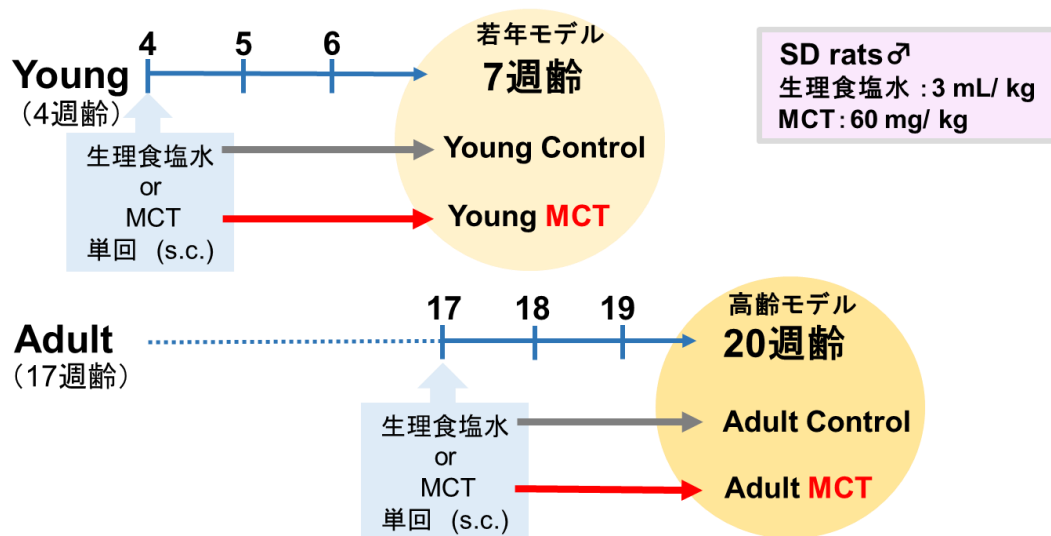


図 6. 研究 1 のモデル動物作製プロトコル

B) 研究 2 : PAH に対するコロソリン酸の薬効評価における肺高血圧症動物モデル

4 週齢の雄性 SD ラットに溶媒（生理食塩水, 3 mL/kg, Sham ラット）もしくは MCT（60 mg/kg, MCT ラット）を単回皮下注射した（Day 0）。その後、Day 7~20 にかけて、1% DMSO 入り生理食塩水（Vehicle）もしくは CRA（1 mg/kg/day）を連日腹腔内注射した（図 7）。

以下、Sham ラットに生理食塩水を連投した群を Sham・Veh、CRA を連投した群を Sham・CRA、MCT ラットに Vehicle を連投した群を MCT・Veh、CRA を連投した群を MCT・CRA と表記した。Day0 において、生理食塩水または MCT を皮下注射した後、Day21 の各モデルラットにおいて、各臓器・組織（心臓・肺・PA）を摘出し、比較解析した。肺組織は摘出後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、H&E 染色に使用した。また、各群 Day21 において、ケタミン（100 mg/kg）とキシラジン（26 mg/kg）の腹腔内注射により麻酔し、血行動態の測定を行い、比較解析した。

以下、Sham・Veh と Sham・CRA をまとめて Sham ラット、MCT・Veh と MCT・CRA をまとめて MCT ラットと表記する。

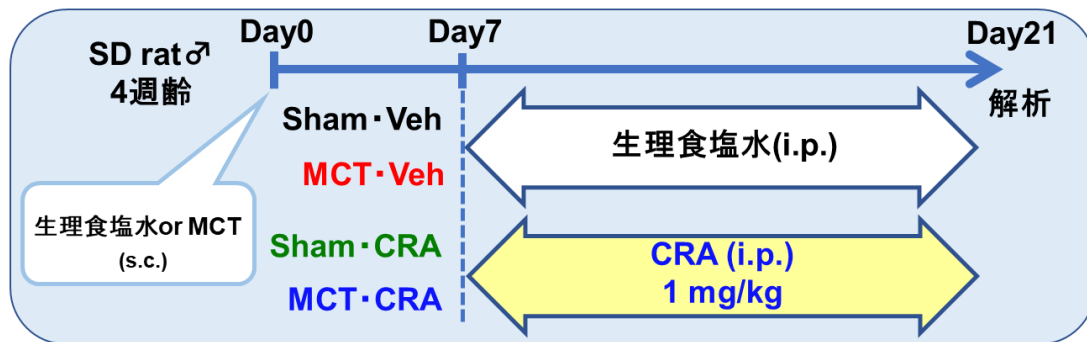


図 7. 研究 2 のモデル動物作製プロトコル

4. 生存曲線及び体重変動解析

若年モデル、高齢モデルのモデル動物を、そこから 21 日目までラットの BW を連日測定した。また、42 日目までの各群のラットの生存率を Kaplan-Meier の生存曲線を用いて評価した。

5. 組織形態解析

A) ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色

摘出した肺組織より、パラフィン包埋切片 (3 ~ 4 μm) の作製及び H&E 染色を行った。ラット肺動脈 (直径 30~90 μm) の H&E 染色画像は、NIS-Elements BR software version 3.2 (ニコン) を搭載した ECLIPSE Ti-U 倒立顕微鏡 (ニコン)、もしくは Digital Sight 1000 カラー顕微鏡カメラ (ニコン) と Plan Fluor 対物レンズ (20 \times /0.50 NA; ニコン) を装備した ECLIPSE Ti2 倒立顕微鏡 (ニコン) を使用して取得し、ImageJ ソフトウェア (バージョン 1.53e; National Institutes of Health) 用いて解析した。

肺動脈中膜の厚さ (PA Medial Wall Thickness) は、長軸方向 (長径、2 箇所) の厚さと短軸方向 (短径、2 箇所) の厚さの平均値として算出した。平均血管径は、外径の長径と短径の平均値として算出した。

B) フルトン比

摘出した心臓より、左心室 (LV)、右心室 (RV)、心室中隔 (S) の重量を測定した。右室肥大のパラメータとして、左心室 (LV) と心室中隔 (S) の和に対する RV の重量比 ($\text{RV}/(\text{LV}+\text{S})$) としてフルトン比 (Fulton index) を算出した。

C) 組織重量測定

若年モデル、高齢モデルから、心臓、PA および大動脈を摘出し、その湿重量を測定した。湿組織重量は、各ラットの BW で補正した。

6. 右室圧 (RVP)・右室収縮期圧 (RVSP) 測定

生理食塩水もしくは MCT 注射後、21 日目の各モデルラットをケタミン (100 mg/kg) とキシラジン (26 mg/kg) の腹腔内注射により麻酔した。MPVS Ultra システム (Millar Instruments) 及び血圧トランスデューサー (MLT0670; ADInstruments) を接続した PowerLab 4/26 システム (ADInstruments) を用いて右頸静脈から RV にカテーテルを留置し、RVP・RVSP をモニターした。RVSP は、30 秒間に測定された RVP のすべてのピーク値の平均値として算出した。

7. mRNA 抽出及び定量的リアルタイム PCR (qPCR) 法

摘出したラット PA を POLYTRON ホモジナイザー (Kinematica AG, Malters, Switzerland) で破碎後、PA のホモジネートから PureLink RNA Mini Kit (Ambion Austin, TX, USA) を用いて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて逆転写して cDNA を取得した。

SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ、京都、日本) と LightCycler 96 real-time PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を使用して、各遺伝子の mRNA 発現を解析した。各遺伝子の mRNA 発現量は、 β -actin の mRNA 発現量に対して補正した。使用したラット各遺伝子に対するプライマーは以下の通りである。

【プライマー配列】

- CaSR (GenBank Accession number, NM_016996)
 - (+) AGGAACTCCATGCGTCAGAAC
 - (-) GAGTCCGCATCTGCACTGT
- TRPC6 (GenBank Accession number, NM_053559)
 - (+) CAGATTTGAAGCACCAAGCTC
 - (-) GCATCTCCATCCATGAGAAACA
- β -actin (GenBank Accession number, NM_031144)
 - (+) AGGCCAACCGTGAAAAGATG
 - (-) ACCAGAGGCATACAGGGACA

8. タンパク質抽出及びウェスタンブロッティング法

ヒト PSMCs およびラット肺動脈平滑筋 (PASMs) から、それぞれ RIPA buffer (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) および T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology) を用いてタンパク質を抽出した。

抽出したタンパク質 (20 mg/lane) を 8 %アクリルアミドゲルを用いて電気泳動 (SDS-

PAGE) し、Immobilon-P PVDF membrane (Millipore, Bedford, USA) に転写した。転写したメンブレンは、5 %ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma-Aldrich) を溶解した Tween 20 添加トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) でブロッキングした後、下記の一次抗体 (1:1000) でインキュベートした。その後、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) で標識された下記の二次抗体 (1:5000) でインキュベートした。これらの抗体は同様に TBS-T にて各濃度に希釈し使用した。ブロッティングシグナルは、イミュノスターLD 試薬 (富士フイルム和光純薬) を用いて可視化し、ImageQuant LAS 4000 システム (GE Healthcare, Waukesha, USA) によって検出、解析した。タンパク質の発現量は、 β -actin の発現量を用いて補正した。

【一次抗体】

anti-CaSR モノクローナル抗体 (MA1-934, Thermo Scientific)
anti-TRPC6 抗体 (ACC-017, Alomone Labs, Jerusalem, Israel)
anti-Akt 抗体 (#9272, Cell Signaling Technology, Danvers, USA)
anti-STAT3 抗体 (#9139, Cell Signaling Technology)
anti-SMAD2 抗体 (#5339, Cell Signaling Technology)
anti- β -actin モノクローナル抗体 (A5316, Sigma-Aldrich)

【二次抗体】

HRP 標識 anti-rabbit IgG 抗体 (#170-6515, Bio-Rad, Hercules, USA)
HRP 標識 anti-mouse IgG 抗体 (#170-6516, Bio-Rad)

【抗体希釈液】

TBS-T : 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.2 % Tween 20 (pH 7.6, HCl)

9. 実験細胞・培養方法

健常者由来 (Lonza, Walkersville, USA) および IPAH 患者由来^{17,18} の PSMCs (passages 5~10) を、10 %ウシ胎児血清 (FBS, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, USA) と 100 U/mL ペニシリン G (富士フイルム和光純薬、大阪、日本)、および 100 μ g/mL ストレプトマイシン (富士フイルム和光純薬) を添加した Medium 199 (Thermo Fisher Scientific) で培養した。さらに、上記培地には、20 μ g/mL endothelial cell growth supplement (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) と、50 μ g/mL D-valine (Sigma-Aldrich) をサプリメントとして添加し、CO₂ インキュベーター内で 37 °C、5 % CO₂ で培養した。

10. 細胞増殖・細胞生存率解析

A) WST 法 (細胞生存率)

96 ウェルプレートに PSMCs (1 \times 10⁴ cells/well) を播種し、37 °C、5 % CO₂ で 6 時間培

養した。その後、溶媒 (Vehicle (Veh) ; 0.1 % DMSO) または CRA を含む培地にて 24~48 時間培養した。Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所、熊本、日本) を使用し、Nivo 3S マイクロプレートリーダー (PerkinElmer, Waltham, USA) を用いて 450 nm における吸光度を測定した。

B) 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) 法 (細胞増殖)

96 ウェルプレートに PSMCs (1×10^4 cells/well) を播種し、37 °C、5 % CO₂ で 6 時間培養した。その後、Vehicle または CRA を含む培地にて 24~48 時間培養した。

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche Diagnostics) を使用し、SpectraMax M3 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) を用いて 370 nm における吸光度を測定した。

11. 細胞遊走解析

PSMCs の細胞遊走は、直径 8 μ m のポアを有するカルチャーインサートと 24 ウェルプレートからなる 24 ウェルトランスウェルプレート (#3428 ; Corning, USA) を用いて、解析した。カルチャーインサート上面に PSMCs (5×10^4 cells/well) を播種後、24 ウェルプレートに設置し、24 時間培養した。この時、カルチャーインサート内 (上部) には、1 %FBS を含む培地を、24 ウェルプレート (下部) には 10 %FBS と Vehicle もしくは CRA を含む培地を添加した。トランスウェルプレートは、4 %パラホルムアルデヒドで固定後、1 %クリスタルバイオレットで細胞を染色した。DS-Vi1 カラー顕微鏡カメラ (ニコン、東京、日本) を接続し、NIS-Elements D イメージングソフトウェア version 3.1 (ニコン) をインストールした SMZ1500 実体顕微鏡 (ニコン) を用いてトランスウェルプレートの画像を取得し、遊走細胞数をカウントした。

12. 統計解析

実験から得られた数値は、すべて平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で示した。

2 群間の差の検定では、Student の *t* 検定を使用した。3 群以上の差の検定は、一元配置分散分析を用いて検定した後、多重比較として Scheffe's test を用いた。Kaplan-Meier の生存解析では、Log-rank 検定を使用した。WST 法、BrdU 法の細胞生存率・増殖解析 (図 13) では、二元配置分散分析を用いて検定した後、多重比較として Scheffe's test を用いた。いずれの検定も、*p* 値が 0.05 未満を有意であるとした。統計解析ソフトとして、BellCurve エクセル統計 version 3.21 もしくは version 4.02 (社会情報サービス) を使用して各検定を行った。

第3章 実験結果

I. PAH の好発年齢を再現するモデル動物の確立

1. 若年モデルと高齢モデルにおける生存率と形態学的特徴の比較

若年モデルおよび高齢モデルラットを作製し、Kaplan-Meier の生存曲線による解析を行った。若年モデルにおいては、先行研究と同様¹⁹に、Young Control のすべてが 42 日目まで生存したのに対し、Young MCT のすべてが死亡し、その平均生存日数は 23.4 ± 1.1 日であった（図 8A）。その一方で、高齢モデルにおいては、Adult Control と Adult MCT のすべてが 42 日目まで生存した。したがって、モデルラットにおいても、肺高血圧症における生存率に週齢差が影響することが示唆された。

続いて、モデルラットの体重変化および心臓、PA、大動脈の各組織重量の変化を若年モデルおよび高齢モデルラットで比較した。Young Control の BW は、21 日目（7 週齢）まで 1 日当たり 7~8 g 増加した。一方、Young MCT の BW は、MCT 投与後 14 日目頃から、徐々に減少し始めた。Adult Control の BW は 21 日目（20 週齢）までわずかに増加傾向であり、減少することはなかった。Adult MCT においても、それと同様の変化が認められた。よって、ラットの週齢はモデルラットの体重変化にも影響を与えることが示唆された（図 8B）。

21 日目の若年モデルおよび高齢モデルから摘出した心臓、PA および大動脈の湿重量を測定した。各臓器・組織重量は、各ラットの BW を用いて補正した。若年モデルでは、Young MCT において心重量の有意な増加が認められ、心肥大の所見を示した（図 8C）²⁰。同様に、Adult MCT でも、Adult Control と比較して心重量の増加が認められた。また、Young MCT と Adult MCT の両群において、PA 重量の有意な増加が認められたのに対し、大動脈の重量には変化は認められなかった。

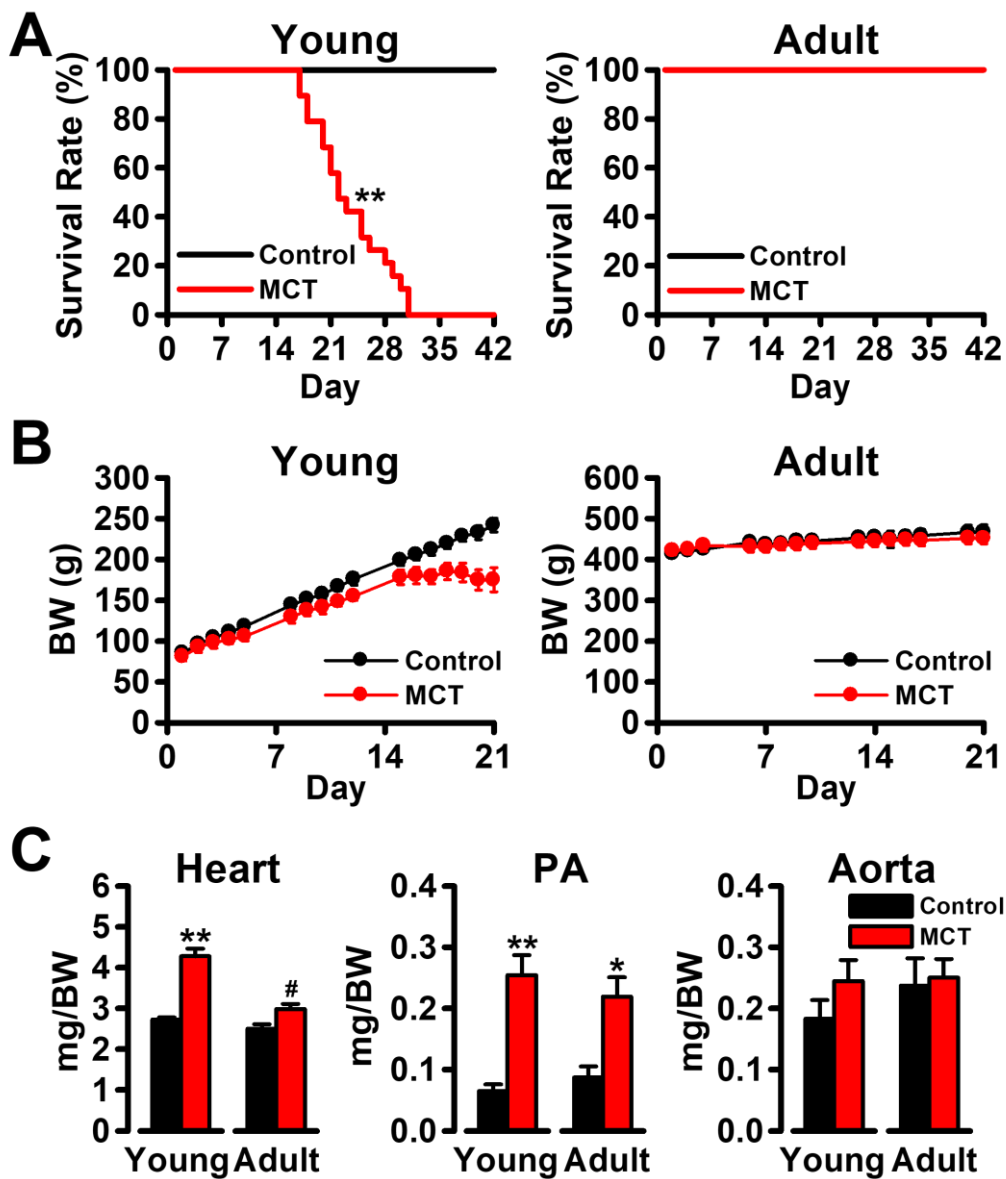


図 8. 若年モデルおよび高齢モデルにおける生存率及び形態学的変化

生存率、体重変化、各組織重量を若年モデルと高齢モデル間で比較した。

(A) 若年モデル（7 週齢、n=19）と高齢モデル（20 週齢、n=13）の Kaplan-Meier 生存曲線を示す。

(B) 若年モデル（7 週齢、n=13）と高齢モデル（20 週齢、n=3~5）の体重変化を示す。

(C) 若年モデル（7 週齢、n=5~6）と高齢モデル（20 週齢、n=3~4）の心臓、PA および大動脈の湿重量を示す。各重量は、湿組織重量を BW で補正して算出した。

【* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control by Log-rank test (A); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control by Scheffe's test (C); # $p < 0.05$ vs. Adult Control by Student's t -test (C)】

2. 若年モデルと高齢モデルにおける肺動脈圧（右室収縮期圧）の比較

肺高血圧症動物モデルにおいては、PAP の指標として、RVSP が使用される。MPVS Ultra システムを用いて、若年モデル（7 週齢）と高齢モデル（20 週齢）それぞれの RVP を測定した。その結果、既報^{12, 21}と同様に、Young MCT と Adult MCT では RVSP がそれぞれのコントロール（Young Control, Adult Control）と比較して有意に上昇した。（図 9）。

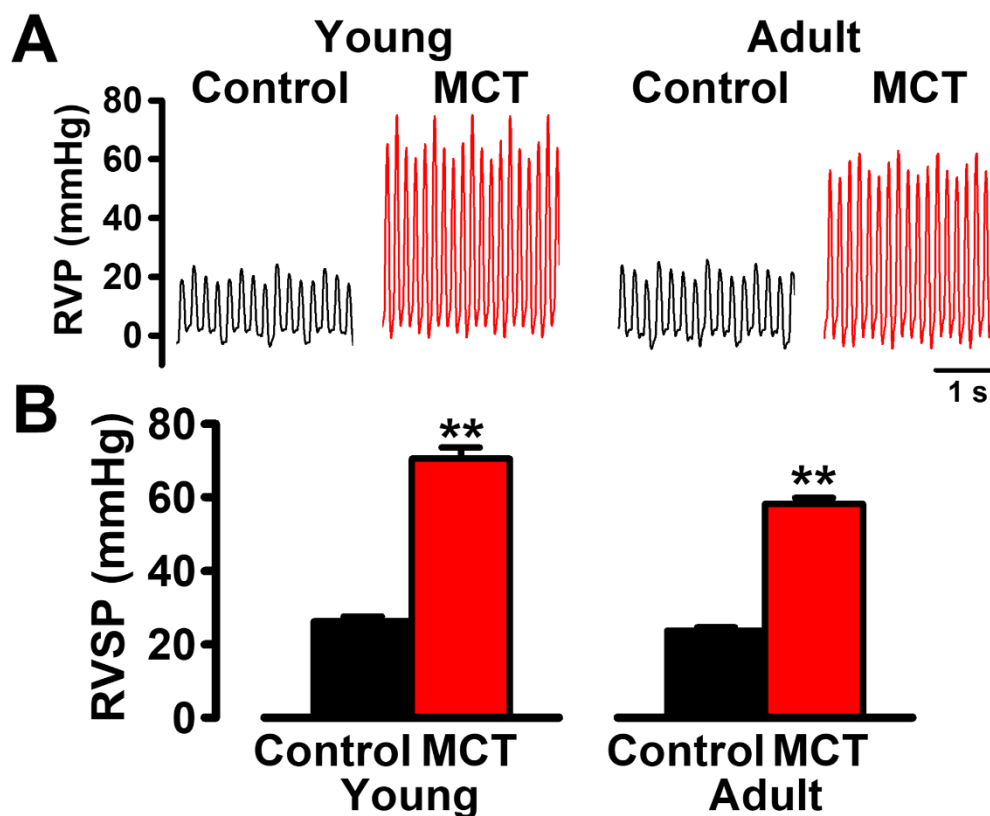


図 9. 若年モデルおよび高齢モデルにおける RVSP の比較

RVSP を若年モデル（7 週齢）と高齢モデル（20 週齢）間で比較した。ラットは生理食塩水もしくは MCT を皮下注射した後、21 日目にケタミン（100 mg/kg）およびキシラジン（26 mg/kg）の腹腔内注射により麻酔した状態で、MPVS Ultra システムを用いて RVP を測定した。RVP は、右頸静脈から RV にカテーテルを挿入して測定した。

(A) 若年モデル、高齢モデルにおける RVP の測定原図を示す。

(B) 若年モデル（n = 6）、高齢モデル（n = 5~6）の RVSP の測定結果を表す。RVSP は、30 秒間に測定された RVP のすべてのピーク値の平均値として算出した。

【** $p < 0.01$ vs. Control by Scheffe's test】

3. 若年モデルと高齢モデルにおける肺血管リモデリングの比較

H&E 染色を用いて、肺高血圧症において起こる PA の肥厚を評価した。摘出した肺組織に対して H&E 染色を行い、直径 30~90 μm の PA の中膜（肺動脈平滑筋）の厚さを測定した。その結果、Young MCT では Young Control と比較して、PA の中膜の厚さが有意に増加し、同様に Adult MCT では Adult Control と比較して、PA の中膜の厚さが有意に増加していた。若年モデルと高齢モデルの両者において、PA の血管リモデリングが進行していることが示唆された（図 10）。その一方で、肺血管の平均血管径には、4 群間で有意な差は認められず、その平均値は 58~63 μm であった。

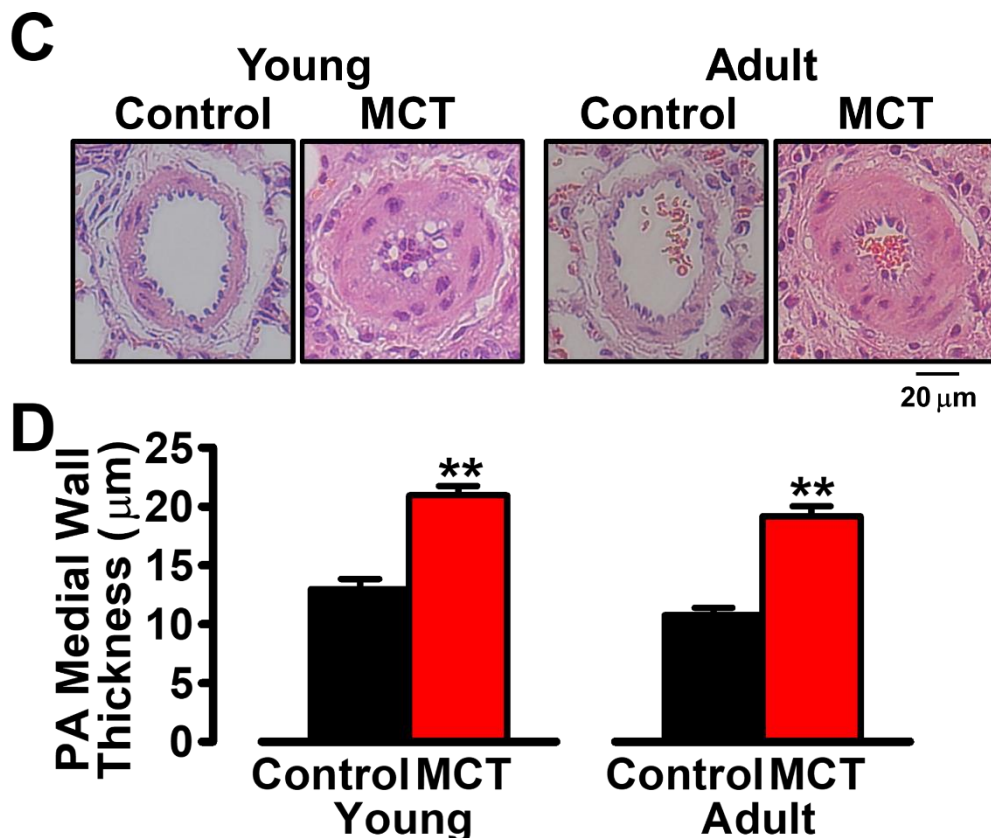


図 10. 若年モデルおよび高齢モデルにおける肺血管リモデリングの比較

PA の中膜の厚さを指標として、肺血管リモデリングを若年モデル（7 週齢）と高齢モデル（20 週齢）で比較した。生理食塩水もしくは MCT を皮下注射した後、21 日目に肺を摘出して H&E 染色を行った。

(A) 若年モデル、高齢モデルにおける PA の H&E 染色画像

(B) 若年モデル（n = 24~32）、高齢モデル（n = 24）の中膜の厚さの解析結果を表す。

【**p < 0.01 vs. Control by Scheffe's test】

4. 若年モデルと高齢モデルにおける CaSR 及び TRPC6 の発現比較

先行研究において、肺高血圧症モデル動物および PAH 患者由来の PSMCs では、CaSR および TRPC6 チャンネルが発現上昇し、細胞内 Ca^{2+} シグナルを亢進させることで、PAH の発症に寄与することが知られている^{7,21,22}。そのため、定量的リアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法により、若年モデルおよび高齢モデルにおける CaSR および TRPC6 チャンネルの発現を解析し、比較を行った。その結果、Young MCT と Adult MCT では PA において、CaSR と TRPC6 チャンネルの mRNA 発現量がコントロール (Young Control と Adult Control) と比較して有意に上昇していた (図 11A・B)。

さらに、Young MCT と Adult MCT では PA において、CaSR と TRPC6 チャンネルのタンパク質発現量がコントロール (Young Control と Adult Control) と比較して有意に上昇していた (図 11C~E)。一方で、Young MCT と Adult MCT の間では、CaSR および TRPC6 チャンネルの発現量に差は認められなかった。

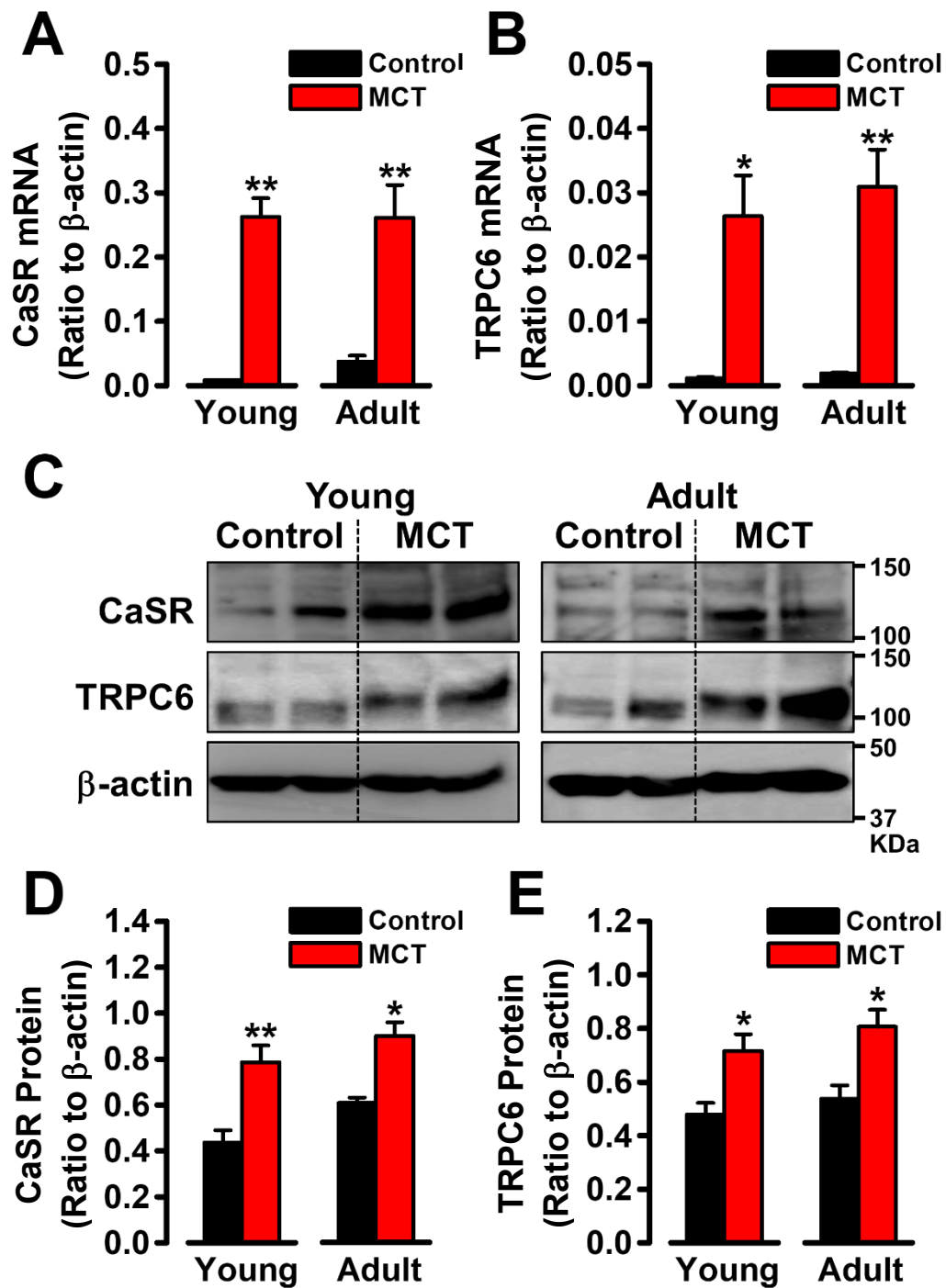


図 11. 若年モデルおよび高齢モデルにおける CaSR および TRPC6 の発現量の比較

定量的リアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法により、若年モデル (7 週齢) と高齢モデル (20 週齢) で、CaSR と TRPC6 チャンネルの発現量を比較した。各遺伝子の mRNA 発現量・各タンパク質発現量は、 β -actin の mRNA 発現量・タンパク質発現量に対して補正した。

(A, B) 若年モデル ($n = 3 \sim 4$)、高齢モデル ($n = 3 \sim 4$) の PA における CaSR、TRPC6 チャンネルの mRNA の発現量の解析結果を示す。

(C) 若年モデルと高齢モデルの PA における CaSR 及び TRPC6 チャンネルのメンブレン画像を示す。

(D, E) 若年モデル ($n = 8$)、高齢モデル ($n = 6$) の PA における CaSR タンパク質 (D) および TRPC6 チャンネルタンパク質 (E) の発現量の解析結果を示す。

【* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control by Scheffe's test】

Iの要約と考察

本研究では、Young MCT では平均 23.4 日で全ラットが 35 日目までに死亡したが、Adult MCT では 42 日以上生存するという結果を得た。これは、生存率にのみ Young MCT と Adult MCT に差が認められ、その他の肺動脈壁の肥厚、右心肥大、RVSP の上昇などの PAH 病態的所見や、CaSR および TRPC6 チャンネル発現の亢進には、Young MCT と Adult MCT での差は認められなかったことを示す。つまり、若年モデルも高齢モデルも同様に PAH を発症しているが、死亡率にのみ差が認められると言える。

従って、本研究成果は肺高血圧症モデルラットにおいて、PAH に特徴的な好発年齢を再現可能なモデル動物の確立に成功したことを示す（図 12）。

	パラメーター	Young MCTとAdult MCTの差
カプランマイヤー曲線	生存率	Young : 35日までに 死亡 Adult : 生存
肺動脈	肥厚	なし
心臓	リモデリング	なし
RVP、RVSP	肺動脈圧	なし
CaSR、TRPC6	発現変化	なし

若年モデルも高齢モデルも、同様にPAHを発症している。

図 12. PAH の好発年齢を再現可能なモデル動物の確立

生存率にのみ、Young MCT と Adult MCT の間に差が認められた。PAH の病態的所見や CaSR、TRPC6 の発現量変化には Young MCT と Adult MCT の間の差は認められなかった。これは、肺高血圧症モデルラットにおいて、PAH の好発年齢を再現可能なモデル動物を確立できたことを示す。

そこで、本研究に関し以下の様な考察を行った。

①同等に PAH を発症しているが、週齢によって生存率に差が出る理由

Young MCT と Adult MCT における生存率の差に、当初は 2 つの可能性を考えていた。1 つ目は高齢モデルでは MCT に対して抵抗性があり、肺高血圧症を発症しないことである。MCT はピロリジン系のアルカロイドで、*Crotalaria spectabilis* の茎や葉、種子、および *Crotalaria* 属の全植物に含まれる¹⁵。MCT は肝臓シトクロム P450 で代謝され、心肺系に毒性を引き起こし、肺高血圧症の病態を形成させる¹⁵。本研究では、若年モデルと高齢モデルは同様に肺血管リモデリング、心肥大、RVSP 増加など肺高血圧症の所見を呈していた。このことから、1 つ目の仮説は否定された。2 つ目は、高齢モデルにおいて、肺高血圧の発症に関与する病態促進・増悪因子の低下、もしくは保護因子の増加が考えられる。その具体例としては、年齢によって周期が変動する、性ホルモンやその代謝産物による影響が強いことが予想される¹³。セロトニン、エンドセリン、血小板由来成長因子 (PDGF)、血管内皮成長因子 (VEGF) など、血漿中の量が健常人と比べ、肺高血圧症患者で高いことが報告されている²³。また、PAH 患者の PSMCs では、いくつかの Ca^{2+} 透過性チャネルの発現が上昇することが知られていることから、肺高血圧症モデルラットや PAH 患者の年齢差に関する重要な因子や分子を明らかにするため、さらなる検討が必要である。

②高齢モデル MCT ラットでは、若年モデル MCT ラットと比べ、心肥大の程度が弱いのではないかという可能性

Adult MCT において、心肥大の程度が、Young MCT と比較し、弱くなっている可能性は確かに否定できない。しかし、本研究の心肥大のパラメータとして用いた臓器重量の解析は、臓器重量を体重で割って算出していることから、Young MCT における心重量の増加は、Day 21 の顕著な体重減少に起因していると考えられる。従って、若年モデルと高齢モデルとでは体重変化に差が認められることから、単純に心肥大の度合いが Young MCT より、Adult MCT のほうが弱いとは言い切れない。

③ヒトにおいても若年で致死率高く、高齢で死亡率が低いのかについて

ヒトにおいては、治療介入が加わるため、発症後の死亡率を直接的に判定するのは非常に困難である。しかし、治療薬の存在しなかった頃の報告では、発症後の平均生存期間は成人未治療の場合、2.8 年といわれている⁴。ことから、若年での死亡率が高いことがわかる。高齢での死亡については、様々な要因が絡み、直接的な判断はさらに難しく、あまり報告もされていないのが現状である。そこで、本研究では、「高齢における肺高血圧症」⇔「高齢期まで肺高血圧症の病態の発見・診断に至らない程度の肺高血圧症」と解釈し、高齢における肺高血圧では死亡率が低いとしている。

まとめ

肺高血圧症モデルラットにおいて、PAH に特徴的な好発年齢を再現可能なモデル動物の確立に成功した。本研究成果は PAH 病態形成機構の解明に重要な知見であり、特に好発年齢のメカニズムの解明に有用な情報である。

II. PAH に対するコロソリン酸の薬効評価

1. PASMCs の生存率および細胞増殖に対する CRA の作用

健常者由来の肺動脈平滑筋細胞 (Normal-PASMCs) と特発性肺動脈性肺高血圧症患者由来の肺動脈平滑筋細胞 (IPAH-PASMCs) の生存率に対する CRA の作用を Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。まず、Normal-PASMCs と IPAH-PASMCs の細胞生存率を比較した。その結果、二元配置分散分析について、培養細胞種に関する要因 (Normal-PASMCs, IPAH-PASMCs) について有意差が認められた ($F=6.2274, p=0.0183$, 図 13A)。培養時間に関する要因について有意差が認められた ($F=71.4695, p<0.001$)。また、それら 2 要因の交互作用について有意差が認められた ($F=11.4674, p<0.001$)。既報²⁴と同様に、細胞播種 48 h 後において、IPAH-PASMCs の生存率は、Normal-PASMCs と比較して有意に高かった (Normal: 1.98 ± 0.08 倍, IPAH: 3.00 ± 0.25 倍; $p < 0.001$)。

続いて、Normal-PASMCs および IPAH-PASMCs の細胞生存率に対する CRA48 h 処置による作用を解析した。その結果、培養細胞種に関する要因 (Normal-PASMCs, IPAH-PASMCs) について有意差が認められた ($F=32.3016, p<0.001$, 図 13B)。CRA の濃度に関する要因について有意差が認められた ($F=644.7969, p<0.001$)。また、それら 2 要因の交互作用について有意差が認められた ($F=8.1798, p<0.001$)。Normal-PASMCs では、0.1~3 μM CRA の処置により生存率への影響は認められなかったが (図 13B)、より高濃度の CRA 処置により生存率の減少が認められた (10 μM : $20.2 \pm 1.9\%$ 、20 μM : $48.7 \pm 2.0\%$ 、30 μM : $75.9 \pm 1.5\%$, $p < 0.001$ vs. Control (0 μM))。その一方で、IPAH-PASMCs では、その過剰な増殖が、低濃度の CRA 処置により有意に抑制され (3 μM : $14.8 \pm 1.4\%$ 減少, $n = 36$, $p < 0.001$)、その効果は CRA の濃度依存的に増強された (10 μM : $30.2 \pm 2.5\%$ 、20 μM : $65.2 \pm 1.0\%$ 、30 μM : $81.6 \pm 0.4\%$, $p < 0.001$, 図 13B)。このような IPAH-PASMCs の過剰増殖に対する CRA の抑制効果の IC_{50} 値は 14.1 μM で、Hill 係数は 1.68 であった。さらに、3~30 μM の濃度範囲において、CRA の阻害効果は、両群間で有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

次に、細胞生存率試験で得られた結果をより詳細に検証するため、BrdU 法を用いて細胞増殖試験を行った。その結果、培養細胞種に関する要因 (Normal-PASMCs, IPAH-PASMCs) について有意差が認められた ($F=26.5889, p<0.001$, 図 13C)。CRA の濃度に関する要因について有意差が認められた ($F=514.0499, p<0.001$)。また、それら 2 要因の交互作用について有意差が認められた ($F=9.8652, p<0.001$)。Normal-PASMCs の増殖は、10 μM および 20 μM CRA の 48 h 処置により抑制された (10 μM : $9.4 \pm 1.4\%$, 20 μM : $54.7 \pm 1.5\%$, $p < 0.05$ vs. Control (0 μM), 図 13C)。IPAH-PASMCs の過剰な増殖は、同様に、10 μM および 20 μM CRA の 48 h 処置によって抑制された (10 μM : $23.9 \pm 2.0\%$, 20 μM : $55.0 \pm 0.6\%$, $p < 0.001$)。このとき、10 μM の CRA による細胞増殖抑制は、Normal-PASMCs と比較して IPAH-PASMCs でより強く観察された ($p < 0.001$)。

したがって、CRA は、3~10 μM 程度の低濃度では、IPAH-PASMCs の過剰な増殖を優先的に抑制するが、20 μM 以上の高濃度では正常な細胞である Normal-PASMCs の増殖も抑制することが示唆された。

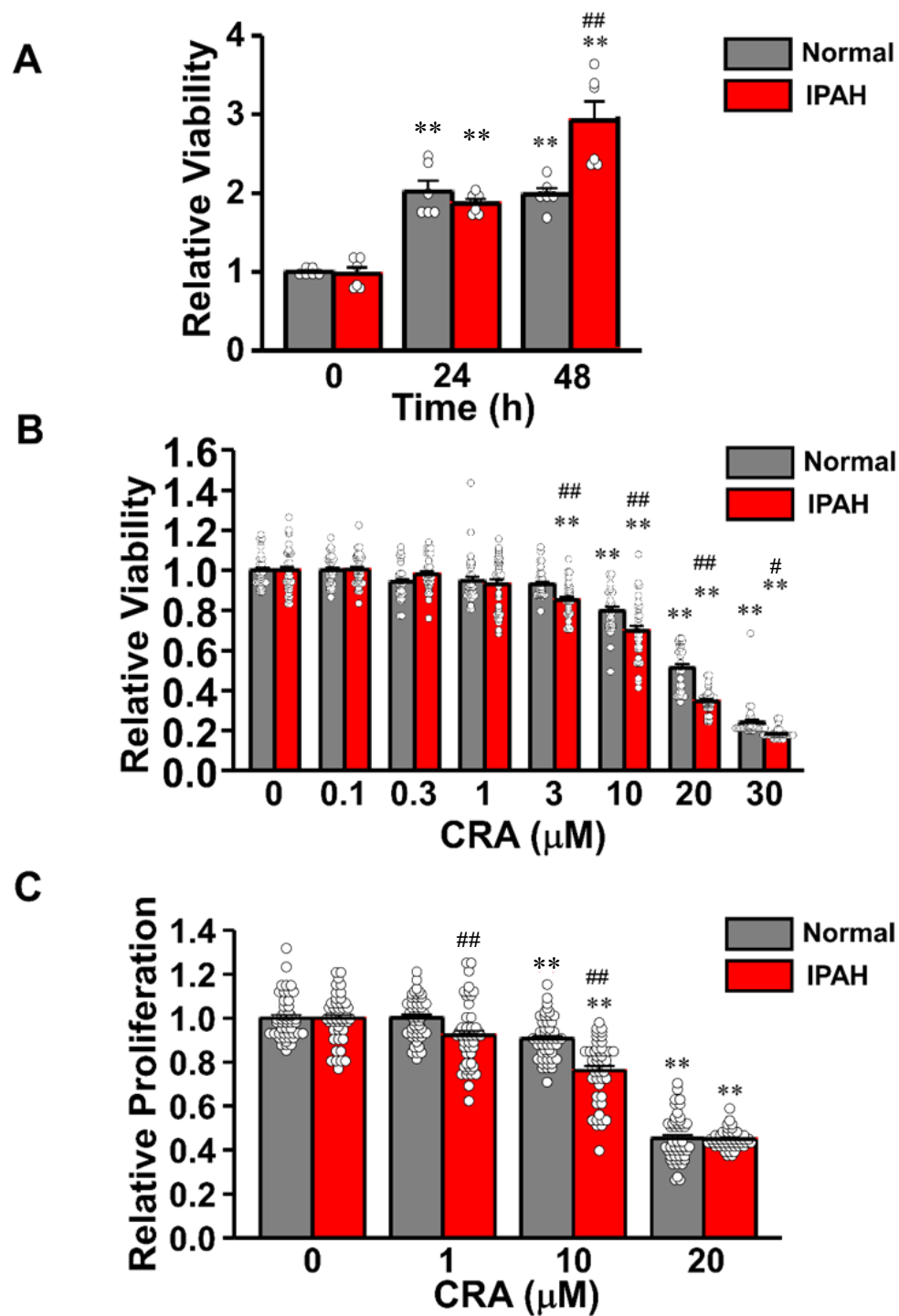


図 13. IPA-H-PASMCs の細胞生存率及び細胞増殖への CRA の効果

Normal-PASMCs と IPA-H-PASMCs の細胞生存率と細胞増殖に対する CRA の効果を、Cell Counting Kit 8 と BrdU アッセイにより評価した。

(A) Normal-PASMCs 及び IPA-H-PASMCs の増殖曲線を示す (n = 6)。

(B) Normal-PASMCs および IPA-H-PASMCs の生存率に対する 0.1~30 μ M CRA (48 h) の影響を示す (n = 32~36)。

(C) Normal-PASMCs および IPA-H-PASMCs の増殖に対する 1~20 μ M CRA (48 h) の影響を示す (n = 48)。

各群の吸光度は、0 h もしくは 0 μ M の吸光度で補正した。

【** $p < 0.01$ vs. Control (0 h or 0 μ M), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Normal-PASMCs by Scheffe's test】

2. PASMCs の遊走に対する CRA の作用

トランスウェルアッセイにより、Normal-PASMCs 及び IPAH-PASMCs の遊走に対する 20 μ M CRA の影響を解析した。その結果、先行研究¹²と同様に IPAH-PASMCs は Normal-PASMCs よりも有意に遊走細胞数が増加することが示された (Normal: 427 ± 37 cells, IPAH: 667 ± 26 cells, $p < 0.001$, 図 14)。さらに、Normal-PASMCs 及び IPAH-PASMCs の遊走は CRA の処置により有意に減少することが示された (Normal \cdot CRA: 105 ± 16 cells, $p < 0.001$ vs. Normal \cdot Vehicle, IPAH \cdot CRA: 413 ± 18 cells, $p = 0.009$ vs. IPAH \cdot Vehicle)。したがって、CRA は IPAH-PASMCs の過剰な増殖に加え、Normal-PASMCs の遊走も抑制することが示唆された。

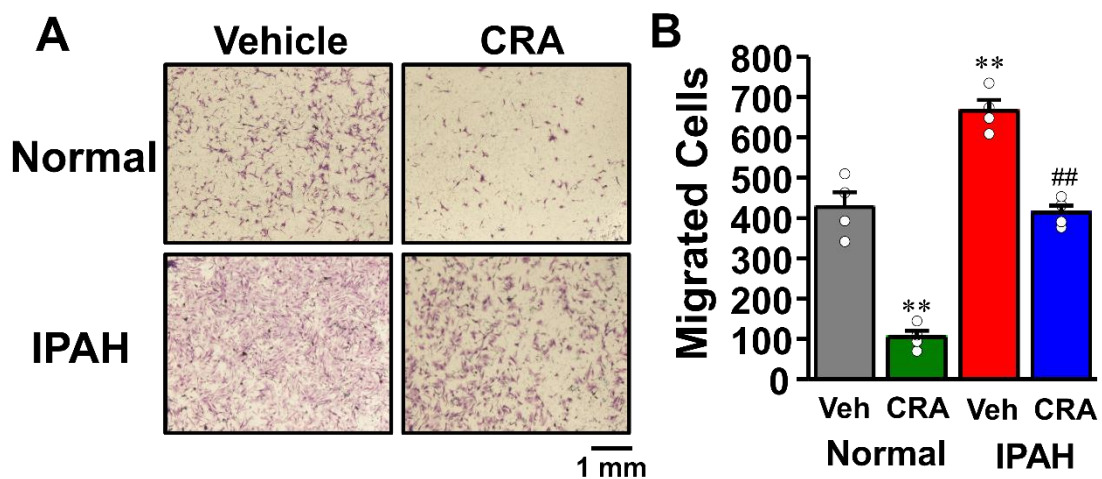


図 14. IPAH-PASMCs の遊走に対する CRA の効果

Normal-PASMCs および IPAH-PASMCs の遊走に対する CRA の効果をトランスウェルアッセイにより解析した。カルチャーインサート上面に PASMCs (5×10^4 cells/well) を播種後、24 ウェルプレートに設置し、24 時間培養した。この時、カルチャーインサート内 (上部) には、1%FBS を含む培地を、24 ウェルプレート (下部) には 10%FBS と Vehicle もしくは CRA を含む培地を添加した。

(A)Vehicle (DMSO) もしくは CRA (20 μ M, 24 h) で処置後に、遊走細胞をクリスタルバイオレットで染色した画像を示した。

(B)Normal-PASMCs 及び IPAH-PASMCs の遊走細胞数の解析結果を表す (n = 4)。

【** $p < 0.01$ vs. Normal \cdot Vehicle, ## $p < 0.01$ vs. IPAH \cdot Vehicle by Scheffe's test】

3. PSMCs の増殖シグナルに対する CRA の作用

IPAH-PSMCs の増殖および遊走に対する CRA の抑制効果のメカニズムを解明するため、PAH 病態に関連が知られている下記 3 つの経路に着目した。

- ① PI3K (phosphoinositide 3-kinase) / Akt / mTOR (mammalian target of rapamycin) (Akt: ²⁵)
- ② Janus kinase (JAK) / STAT (STAT3: ¹¹)
- ③ TGF- β (transforming growth factor β) / SMAD (SMAD2: ²⁶)

上記 3 つの経路にかかわるタンパク質のうち、①Akt ②STAT3 ③SMAD2 の 3 つタンパク質について、ウエスタンブロットによりそれらのタンパク質発現量を解析した。

その結果、IPAH-PSMCs では、Akt のタンパク質が Normal-PSMCs と比較してわずかに発現上昇していた (Normal: 1.00 ± 0.15 倍, IPAH: 1.57 ± 0.14 倍, 図 15A および B) が、その発現増加は 1 μ M CRA 処置による影響を受けなかった。

STAT3 のタンパク質は、IPAH-PSMCs では、Normal-PSMCs と比較して有意に発現増加しており (Normal: 1.00 ± 0.09 倍, IPAH: 3.03 ± 0.34 倍, $p < 0.001$, 図 15A および C)、その増加は 1 μ M CRA 処置によって有意に抑制された (69.1% 抑制, $p < 0.001$)。Normal-PSMCs では、STAT3 の発現に対する CRA 処置による影響は認められなかった。

一方、SMAD2 のタンパク質の発現量は、Normal-PSMCs と IPAH-PSMCs の間で変化は認められず、1 μ M CRA 処置による変化も認められなかった (図 14A および D)。

以上の結果より、CRA は Akt および SMAD2 を介する経路ではなく、STAT3 の発現抑制を介して、IPAH-PSMCs の増殖および遊走を抑制していることが示唆された。

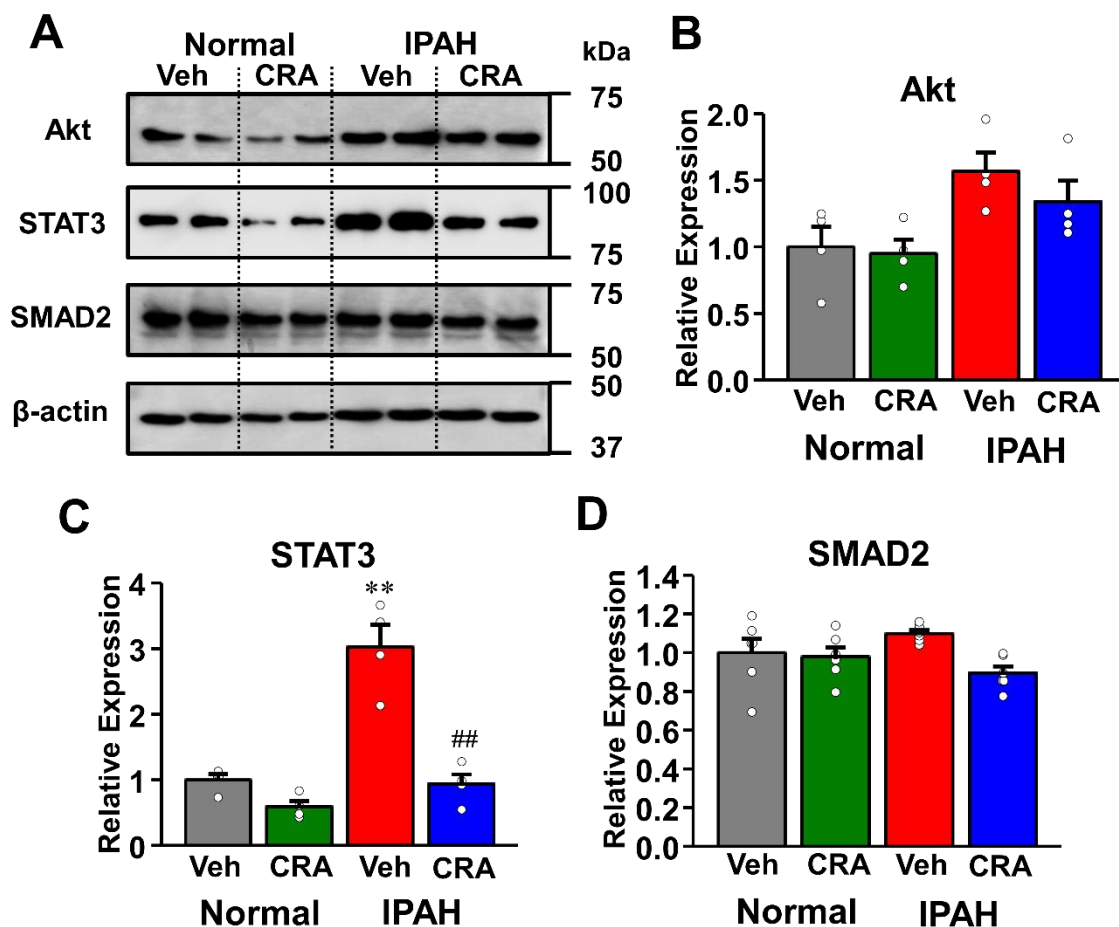


図 15. PSMCs の増殖シグナルに対する CRA の作用

Normal-PSMCs および IPAH-PSMCs において、PAH の発症に関連する増殖シグナル関連タンパク質 (Akt、STAT3、SMAD2) の発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。各タンパク質の発現量は、 β -アクチン (41.7 kDa) の発現量で補正し、CRA 非処置の Normal-PSMCs (Normal \cdot Vehicle) における発現量に対する相対的な値として示した。

(A) Vehicle (DMSO) もしくは CRA (1 μ M, 24 h) 処置した Normal-PSMCs および IPAH-PSMCs における、Akt (55.7 kDa)、STAT3 (88.1 kDa)、および SMAD2 (52.3 kDa) のウェスタンブロット画像を示した。

(B) Normal-PSMCs および IPAH-PSMCs における Akt タンパク質の発現量の解析結果を表す (n = 4)。

(C) Normal-PSMCs および IPAH-PSMCs における STAT3 タンパク質の発現量の解析結果を表す (n = 4)。

(D) Normal-PSMCs および IPAH-PSMCs における SMAD2 タンパク質の発現量の解析結果を表す (n = 4)。

【** $p < 0.01$ vs. Normal \cdot Vehicle, ## $p < 0.01$ vs. IPAH \cdot Vehicle by Scheffe's test】

4. MCT ラットの RVSP に対する CRA の薬理効果

上記の *in vitro* における解析結果から、CRA は IPAH-PASMCs の過剰な増殖と遊走を抑制することが示唆された。そこで、肺高血圧症動物モデルである MCT ラットを用いて、*in vivo* における CRA の薬理効果を検討した。Millar MPVS Ultra システムを用いて、Sham ラット (Sham・Veh, Sham・CRA) および MCT ラット (MCT・Veh, MCT・CRA) の RVP・RVSP を測定し、RVP・RVSP に対する CRA の効果を解析した。動物モデルにおいては、mPAP の指標として RVSP が測定される。解析の結果、MCT ラットの RVSP は、先行研究²¹と同様に、Sham ラットと比較して有意に上昇していた (Sham・Veh: 25.7 ± 0.9 mmHg, $n=6$, MCT・Veh: 67.0 ± 3.7 mmHg, $n=7$, $p<0.001$, 図 16)。さらに、CRA の連日腹腔内投与 (1 mg/kg/day, Day 7~20) は、Sham ラットの RVSP には影響を与えなかった (Sham・CRA: 24.8 ± 1.3 mmHg, $n=4$) が、MCT ラットにおいて認められた RVSP の上昇は、CRA の投与により有意に抑制されることが示された (MCT・CRA: 50.0 ± 3.8 mmHg, $n=7$, $p=0.007$ vs. MCT・Veh)。したがって、CRA は MCT ラットの RVSP を低下させ、PAH 病態を改善することが示唆された。

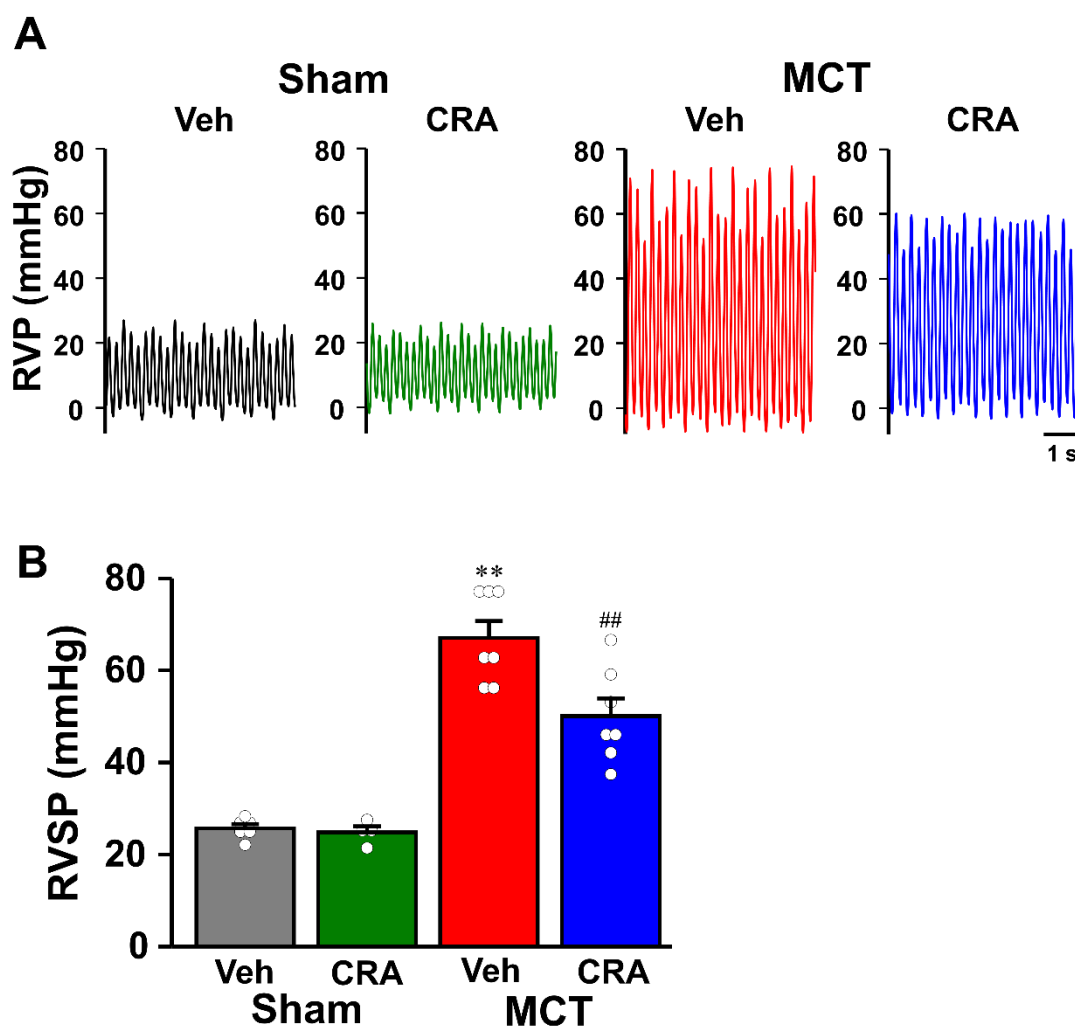


図 16. MCT ラットの RVSP に対する CRA の効果

Millar MPVS Ultra システムを用いて、Sham ラットおよび MCT ラットの RVP を測定した。Day0 にて、生理食塩水もしくは MCT を皮下注射した後、Vehicle 及び CRA (1 mg/kg/day) を、7 日目から 20 日目まで連日腹腔内投与した。

(A) Sham ラットおよび MCT ラットにおける RVP の測定原図を示した。

(B) Vehicle もしくは CRA を投与した Sham ラットおよび MCT ラットの RVSP の解析結果を表す (n = 4~7)。

【** $p < 0.01$ vs. Sham \cdot Veh, ## $p < 0.01$ vs. MCT \cdot Veh by Scheffe's test】

5. MCT ラットにおける肺血管リモデリングと右室肥大に対する CRA の薬理効果

PAH 病態では、肺血管のリモデリングが亢進することが知られていることから、H&E 染色により、肺血管リモデリングに対する CRA の効果を検討した。生理食塩水もしくは MCT を皮下注射した後、Sham ラット (Sham・Veh, Sham・CRA) および MCT ラット (MCT・Veh, MCT・CRA) から肺組織を摘出後、組織切片を作成し、H&E 染色にて、肺動脈の中膜の厚さを測定した。その結果、先行研究⁵と同様に、MCT ラットでは、Sham ラットと比較して顕著な中膜の肥厚が観察された (Sham・Veh: $6.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$, MCT・Veh: $13.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $p < 0.001$, 図 17A・B)。

Sham ラットでは、CRA (1 mg/kg/day, Day 7~20) の投与による、中膜の厚さへの影響は認められなかった (Sham・CRA: $6.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$) が、MCT ラットでは、CRA 投与により、肺血管リモデリングの進展が有意に抑制された (MCT・CRA: $8.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p < 0.001$ vs. MCT・Veh)。このとき、4 群間で肺動脈の平均血管径に有意な差は認められなかった ($55.6 \sim 58.3 \mu\text{m}$, $p > 0.05$)。

PAH 病態では、肺血管リモデリングが進展すると右室肥大が引き起こされることが知られている。そのため、Sham ラット (Sham・Veh, Sham・CRA) および MCT ラット (MCT・Veh, MCT・CRA) から心臓を摘出後、右室肥大に対する CRA の効果をフルトン比 (Fulton index) という指標を用いて評価した。フルトン比は下記の式で算出される。

$$\text{Fulton index} = (\text{RV} / (\text{LV} + \text{S}))$$

RV: 右心室重量、LV: 左心室重量、S: 中隔重量

解析の結果、MCT ラットでは、Sham ラットと比較してフルトン比は有意に高いことが示唆された (Sham・Veh: 0.152 ± 0.019 , $n = 6$; MCT・Veh: 0.336 ± 0.022 , $n = 8$, $p < 0.001$, 図 16C)。さらに、CRA 投与 (1 mg/kg/day, Day 7~20) により、Sham ラットではフルトン比に変化は認められなかった (Sham・CRA: 0.145 ± 0.021 , $n = 4$) が、MCT ラットでは、CRA 投与によりフルトン比は有意に低下した (MCT・CRA: 0.229 ± 0.036 , $n = 6$, $p = 0.046$)。

以上の結果より、CRA は MCT ラットにおける肺血管リモデリングと右室肥大の両方を改善することが示唆された。

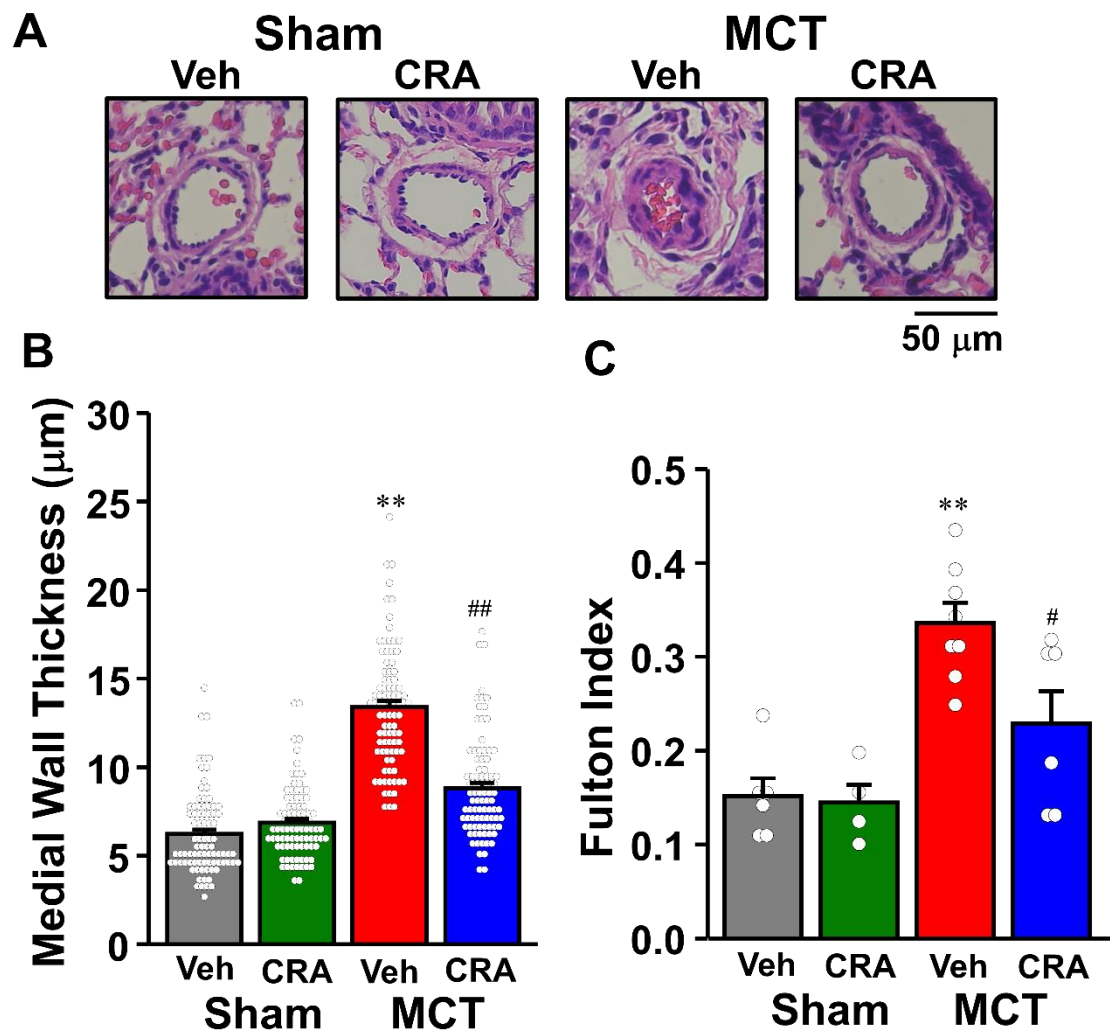


図 17. MCT ラットにおける肺血管リモデリングと右室肥大に対する CRA の効果

H&E 染色および Fulton 比の解析により、Sham ラットおよび MCT ラットにおける肺血管リモデリング及び右室肥大を評価した。Vehicle 及び CRA (1 mg/kg/day, Day 7~20) を、生理食塩水もしくは MCT を皮下注射した後、7 日目から 20 日目まで連日腹腔内投与した。

(A) Sham ラットおよび MCT ラットの PA の H&E 染色画像を示した。

(B) Sham ラットおよび MCT ラットの PA (直径 30~90 μm) の中膜の厚さの解析結果を表す (1 群あたりの PA の数 n = 88)。

(C) Sham ラットと MCT ラットにおける Fulton 比 (Fulton index = (RV / (LV + S))) の解析結果を表す (n = 4~8)。

【** $p < 0.01$ vs. Sham • Veh, ## $p < 0.01$ vs. MCT • Veh by Scheffe's test】

6. ラット PASM の STAT3 発現に対する CRA の効果

PASMCs における解析と同様、ウェスタンブロッティングにより、Sham ラットおよび MCT ラット PASM における STAT3 のタンパク質発現に対する CRA の影響を解析した。その結果、MCT ラットの PASM には、Sham ラットと比較して STAT3 のタンパク質発現が有意に高いことが示唆された (Sham・Veh: 1.00 ± 0.04 倍, MCT・Veh: 1.91 ± 0.14 倍, $p = 0.001$, 図 18)。

この MCT ラットにおける STAT3 の発現増加は、CRA の投与 (1 mg/kg/day, Day 7~20) により有意に抑制された (MCT・CRA: 40.6 %抑制, $p = 0.006$ vs. MCT・Veh)。その一方で、Sham ラットでは PASM の STAT3 発現量に対する CRA 投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、CRA は IPAH-PASMCs と同様に、MCT ラットの PASM において STAT3 の発現抑制を介し、PAH 病態に対する治療効果を示すことが示唆された。

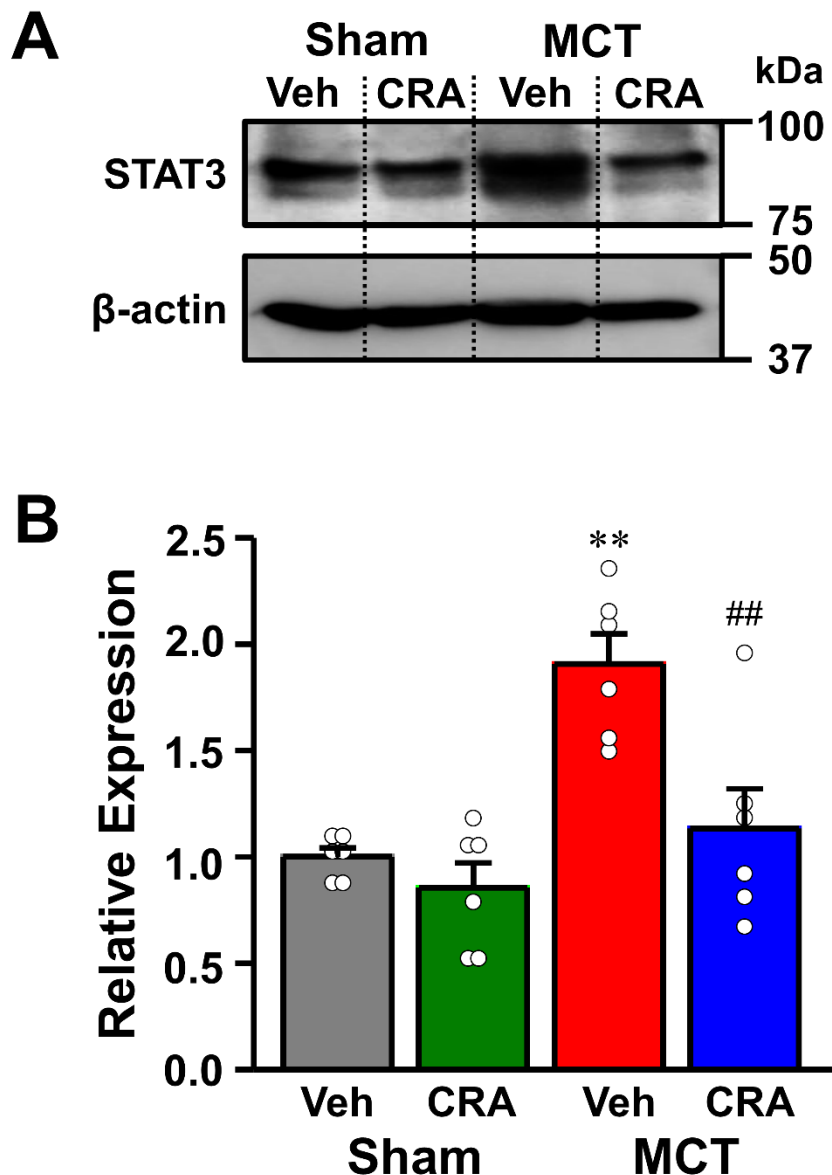


図 18. ラット PSMs の STAT3 発現に対する CRA の効果

ウェスタンブロッティングにより、Sham ラットおよび MCT ラットの PSMs における STAT3 のタンパク質発現量を解析した。生理食塩水もしくは MCT を皮下注射した後、7 日目から 20 日目まで Vehicle 及び CRA (1 mg/kg/day, Day 7~20) を連日腹腔内投与した。タンパク質発現量は、β-actin の発現量で補正し、Sham・Veh における発現量に対する相対量として示した。

(A) Sham ラットおよび MCT ラットの STAT3 (88.1 kDa) のウェスタンブロッティング画像を示した。

(B) Sham ラットおよび MCT ラットの PSMs における STAT3 タンパク質の発現量の解析結果を表す (n=6)。

【** $p < 0.01$ vs. Sham・Veh, ## $p < 0.01$ vs. MCT・Veh by Scheffe's test】

IIの要約と考察

本研究より、CRA は *in vitro* 実験において、IPAH-PASMCs の増殖と遊走を抑制し、*in vivo* 実験において、PAH モデル動物の肺血管リモデリングの抑制、RVSP の減少、右室肥大の抑制を示した。その結果、CRA によって PAH 病態の改善が認められた (図 19)。CRA は、PASMCs において、STAT3 の発現抑制を介して、細胞増殖や遊走を阻害した結果、肺血管リモデリングや右室肥大を抑制したと考えられる。

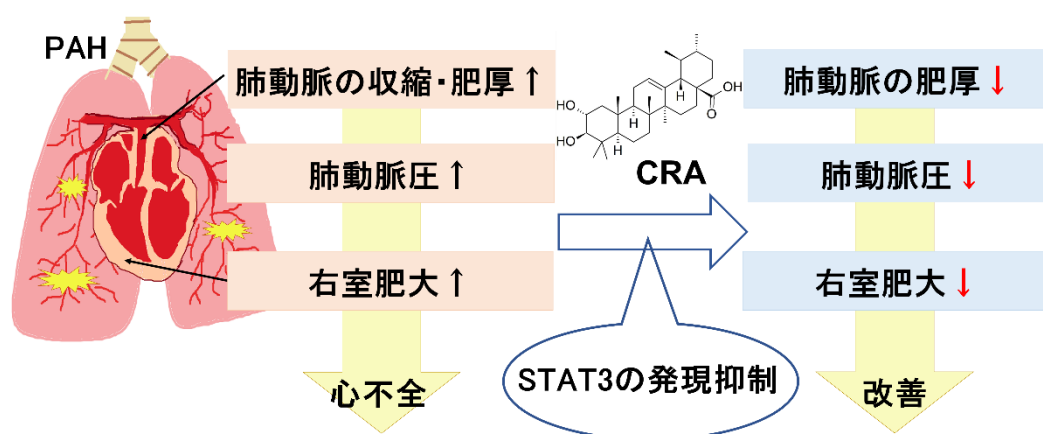


図 19. CRA による PAH 病態改善機構

CRA は、PASMCs において、STAT3 の発現抑制を介し、肺動脈の肥厚、肺動脈圧の上昇、など肺血管リモデリングと右室肥大を抑制することで、PAH 病態を改善する。

そこで、本研究に関し以下の様な考察を行った。

① *in vitro* における CRA の濃度設定と細胞に対する影響について

本研究での *in vitro* 実験では、CRA が IPAH-PASMCs の過剰な増殖と遊走を抑制することが示された。これまでの研究で、CRA はがん細胞 ($IC_{50}=3\sim30\ \mu M$)、マクロファージ ($IC_{50}=\sim40\ \mu M$)、アストロサイト ($IC_{50}=\sim25\ \mu M$) の増殖を抑制することが報告されている^{9, 27, 28}。本研究では、CRA は IPAH-PASMCs の増殖と遊走を同様の濃度範囲で阻害した (増殖に対する $IC_{50}=14.1\ \mu M$)。本研究は平滑筋細胞の増殖および遊走に対して CRA の阻害効果を示した最初の研究である。その結果、より高濃度 ($>20\ \mu M$) の CRA は Normal-PASMCs の増殖および遊走を阻害することがわかった。その一方で、他の研究では、CRA はマクロファージ ($30\sim100\ \mu M$)²⁹、メサングウム細胞 ($2.5\sim10\ \mu M$)³⁰、網膜色素上皮細胞 ($2\sim20\ \mu M$)³¹ の生存率に影響を与えないことが示されており、本研究結果とは反する報告である。この違いは、細胞種により、正常細胞における CRA の標的タンパク質の発現レベルが異なるためではないかと考えている。

また、20 μM の CRA の細胞生存率に対する阻害効果は、IPAH-PASMCs では Normal-PASMCs よりも強かったが (図 13B)、細胞増殖に対する効果は Normal-PASMCs においても IPAH-PASMCs においても同様であった (図 13C)。Cell Counting Kit-8 アッセイにおける細胞生存率は、細胞増殖とアポトーシスの合計であるが、BrdU 取り込みアッセイは、細胞増殖を特異的に検出する。CRA はアポトーシスを誘導し、抗増殖作用を示すことから、より強い阻害作用には CRA によるアポトーシス作用が含まれている可能性がある。IPAH-PASMCs における、CRA によるアポトーシス作用の、より詳細な分子メカニズムを解明するためには、さらなる研究が必要である。

本研究では、低濃度 (3~10 μM) の CRA の細胞増殖抑制作用は、IPAH-PASMCs では Normal-PASMCs よりも強く表れたということが重要である。

② in vivo における CRA の投与量と血中濃度について

CRA の投与量は、動物モデルにおいて様々な報告がある。CRA の投与により糖尿病、高脂血症 (10 mg/kg/day)、腫瘍発生 (2.5~25 mg/kg/day)⁹、糖尿病性腎障害 (5~20 mg/kg/day)³²、心肥大 (10 および 20 mg/kg/day)³³、心筋梗塞後の心筋壊死 (10 および 20 mg/kg/day) などが改善されることが示されている。本研究では、これらの報告より低用量の CRA (1 mg/kg/day) を投与したところ、MCT ラットの肺血管リモデリングおよび右心室肥大に対して有効であった。一方、CRA は、Sham ラットの RVSP、血管および心臓の形態に影響を与えなかった。以前の研究では、SD ラットに CRA を 2 mg/kg の用量で静脈内注射した後、CRA の最高血漿濃度は 8.63 mg/mL (18.3 μM に相当)、半減期は 66.4 分であったと報告されている³⁴。したがって、今回の実験条件 (腹腔内注射、SD ラット、CRA 1 mg/kg/day) では、CRA の血漿中濃度は 9.13 μM 以下と推定され、*in vitro* 実験での低濃度に相当することが確認された。これより、CRA は生体内で副作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

現在までのところ、ヒトにおける臨床試験では、糖尿病・糖尿病予備軍の患者において、CRA (0.32 mg~10 mg) を含有するカプセルを 1 カプセル/day、2 週間の摂取により、血糖値が低下したことが報告されている。また、低血糖や肝機能・腎機能低下などの副作用報告もされていない³⁵。

③ CRA の PAH 治療薬としての有用性

心臓血管系では、CRA 投与は高血圧自然発症ラットにおいて心拍数を変えずに収縮期血圧を低下させ³⁶、大動脈絞扼誘発心肥大マウスでは心拍数に影響を与えなかった³³。このことから、CRA は心臓に負荷をかけることなく、PAH 病態を改善させることが期待される。また、当研究室ではこれまでに NPS2143 とイマチニブの併用は、MCT ラッ

トの PAH 発症を相加的に改善することを示してきた¹²。このことから、CRA と既存の治療薬を用いた併用療法は、PAH の新規治療アプローチとして有用であると考えられる。

④ CRA の PAH におけるシグナル経路

本研究では、PAH における CRA の *in vitro* および *in vivo* での効果を示したが、標的シグナルは依然として不明である。CRA は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK)、PI3K/Akt/mTOR、JAK/STAT、TGF- β /SMAD、NF- κ B (nuclear factor-kappa B)、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK)、Wnt/ β -カテニン、Nrf2 (NF-E2-related factor2) といった複数のシグナル経路を調節することが知られている^{9,37}。これらのシグナル伝達経路のうち、PAH に関連する主要な増殖因子として同定されている Akt²⁵、STAT3¹¹、SMAD2²⁶に着目した。本研究において、CRA は、IPAH 患者および MCT ラットの PSMCs において、Akt および SMAD2 に影響することなく、STAT3 の発現を低下させた。CRA による STAT3 の発現およびリン酸化の発現低下は、卵巣癌¹⁰、骨肉腫³⁸ および膠芽腫²⁹ の細胞においても報告されている。さらに、CRA は、胃がん細胞ではヒト上皮成長因子受容体 2 (EGFR2/HER2)、肝細胞がん³⁹ および肺腺がん細胞では血管内皮成長因子受容体 (VEGFR)⁴⁰、大腸がん細胞では EGFR2/HER2 およびヒト上皮成長因子受容体 3 (EGFR3) を低下させた⁴¹。しかし、これらの細胞における CRA による STAT3 および成長因子受容体の発現低下に関する分子メカニズムは、不明である。したがって、PSMCs における CRA の薬理的メカニズムを解明するためには、上流シグナル (成長因子受容体など)、STAT3 のリン酸化、および他のシグナル伝達経路に焦点を当てたさらなる研究が必要である。

まとめ

CRA は、*in vitro* 実験において、IPAH-PSMCs の増殖・遊走を抑制した。*in vivo* 実験において、CRA は、肺高血圧症モデル動物の PAH 病態 (RVSP の上昇、肺血管リモデリング、右室肥大) を改善させた。また、その作用メカニズムは、STAT3 の発現抑制を介することが明らかになった。

第4章 結論

I. PAHの好発年齢を再現するモデル動物の確立

Young MCT は平均 23.4 日で死亡したが、Adult MCT は 42 日以上生存した。一方で、Adult MCT の *in vivo* パラメーター（肺血管リモデリング・右心肥大）は Young MCT と同等であり、PAH を発症していた。さらに、CaSR および TRPC6 チャネル発現は、Young MCT および Adult MCT の両群で発現が上昇していた。PAH の好発年齢を解明するには、さらなる解析が必要であるが、本研究は、PAH に特徴的な好発年齢の基礎となるメカニズムを解明するための新規情報を提供するものである。

II. PAH に対するコロソリン酸の薬効評価

CRA は、*in vitro* において、IPAH 患者の PSMCs の過剰増殖と遊走を抑制することが示された。また、*in vivo* において、CRA が肺高血圧症モデル動物（MCT ラット）における RVSP の上昇、肺血管のリモデリング、右室肥大を抑制することを明らかにした。さらに、CRA は、IPAH 患者および MCT ラットの PSMCs における STAT3 の発現抑制を介して、肺血管リモデリングや右室肥大などの PAH 病態を改善させることが示唆された。

以上のことから、CRA は、現在承認されている PAH 治療薬とは異なる作用機序を有する新規 PAH 治療薬の候補としてあげられ、PAH 治療薬の開発において重要な知見となり得る。

本研究成果は、難病である PAH の病態形成機構の解明に重要な知見であり、既存の治療薬とは異なる作用機序を有する新規 PAH 治療薬の開発に繋がると考えられる。

第5章 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤な御指導を賜った名古屋市立大学大学院薬学研究科 山村寿男教授に深甚な謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤な御指導を賜った愛知医科大学医学部 山村彩講師に深甚な謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言及び御校閲を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 鈴木良明講師、近藤るびい助教に深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言及び御校閲を賜りました金城学院大学薬学部 大原直樹名誉教授、塚本喜久雄教授に深謝いたします。

本論文の作成にあたり、有益な御助言及び御校閲を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 牧野利明教授、伊藤佐生智准教授、岩尾岳洋准教授に深謝致します。

本研究にあたり、御協力を頂いた名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野の卒業生及び教室員諸氏に心から感謝致します。

本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2130 の支援を受けたものです。

本研究に供せられた多くの実験動物のご冥福を心よりお祈り申し上げます。

第 6 章 引用文献

1. Fukuda K, Date H, Doi S, et al. Guidelines for the treatment of pulmonary hypertension (JCS 2017/JPCPHS 2017). *Circulation Journal*. 2019;83(4): 842-945.
2. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *European Respiratory Journal*. 2009;34(4): 888-894.
3. Yamamura H, Suzuki Y, Yamamura A. Pathophysiological roles of TRPC6 channels in pulmonary arterial hypertension. *Folia Pharmacologica Japonica Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2020;155(4): 230-235.
4. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. *Annals of Internal Medicine*. 1991;115(5): 343-349.
5. Kawade A, Yamamura A, Fujiwara M, et al. Comparative analysis of age in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2021;147(1): 81-85.
6. Frost AE, Badesch DB, Barst RJ, et al. The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the United States: How REVEAL differs from historic and non-US Contemporary Registries. *Chest*. 2011;139(1): 128-137.
7. Tang H, Yamamura A, Yamamura H, et al. Pathogenic role of calcium-sensing receptors in the development and progression of pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2016;310(9): L846-859.
8. Yamamura A. Calcium-sensing receptor. *Folia Pharmacologica Japonica Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2016;148(5): 278-280.
9. Zhao J, Zhou H, An Y, Shen K, Yu L. Biological effects of corosolic acid as an anti-inflammatory, anti-metabolic syndrome and anti-neoplastic natural compound. *Oncology Letters*. 2021;21(2): 84.
10. Fujiwara Y, Takaishi K, Nakao J, et al. Corosolic acid enhances the antitumor effects of chemotherapy on epithelial ovarian cancer by inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Oncology Letters*. 2013;6(6): 1619-1623.
11. Paulin R, Meloche J, Bonnet S. STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *JAKSTAT*. 2012;1(4): 223-233.
12. Yamamura A, Nayeem MJ, Mamun AA, Takahashi R, Hayashi H, Sato M. Platelet-derived growth factor up-regulates Ca^{2+} -sensing receptors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The FASEB Journal*. 2019;33(6): 7363-7374.
13. Lahm T, Tudor RM, Petrache I. Progress in solving the sex hormone paradox in pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular*

Physiology. 2014;307(1): L7-26.

14. 喜屋武 邦, 角坂 育, 笠原 靖, et al. モノクロタリン投与ラットにおける肝ミクロゾームと肺高血圧の関係. *日本胸部疾患学会雑誌*. 1994;32(2): 125-129.
15. Nogueira-Ferreira R, Vitorino R, Ferreira R, Henriques-Coelho T. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2015;35: 8-16.
16. 角坂 育, 金子 昇, 喜屋武 邦, et al. 各種モノクロタリン投与量によるラット肺高血圧の成立とその消退に関する研究. *日本胸部疾患学会雑誌*. 1989;27(1): 51-56.
17. Yuan JX-J, Aldinger AM, Juhaszova M, et al. Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1998;98(14): 1400-1406.
18. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, et al. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(38): 13861-13866.
19. Nagaya N, Yokoyama C, Kyotani S, et al. Gene transfer of human prostacyclin synthase ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation*. 2000;102(16): 2005-2010.
20. Hilliker KS, Bell TG, Roth RA. Pneumotoxicity and thrombocytopenia after single injection of monocrotaline. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1982;242(4): H573-H579.
21. Yamamura A, Guo Q, Yamamura H, et al. Enhanced Ca²⁺-sensing receptor function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*. 2012;111(4): 469-481.
22. Smith KA, Voiriot G, Tang H, et al. Notch activation of Ca²⁺ signaling in the development of hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2015;53(3): 355-367.
23. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(1 Suppl): S20-S31.
24. Amano T, Yamamura A, Fujiwara M, et al. Upregulated ClC3 channels/transporters elicit swelling-activated Cl⁻ currents and induce excessive cell proliferation in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2022;45(11): 1684-1691.
25. Tu L, Guignabert C. Emerging molecular targets for anti-proliferative strategies in pulmonary arterial hypertension. In: Humbert M, Evgenov OV, Stasch J-P, eds. *Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013:409-436.

26. Guignabert C, Humbert M. Targeting transforming growth factor-beta receptors in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*. 2021;57(2): 2002341.
27. Peng M, Qiang L, Xu Y, Li C, Li T, Wang J. Inhibition of JNK and activation of the AMPK-Nrf2 axis by corosolic acid suppress osteolysis and oxidative stress. *Nitric Oxide*. 2019;82: 12-24.
28. Sun LW, Kao SH, Yang SF, et al. Corosolic acid attenuates the invasiveness of glioblastoma cells by promoting CHIP-mediated AXL degradation and inhibiting GAS6/AXL/JAK axis. *Cells*. 2021;10(11): 2919.
29. Fujiwara Y, Takeya M, Komohara Y. A novel strategy for inducing the antitumor effects of triterpenoid compounds: blocking the protumoral functions of tumor-associated macrophages via STAT3 inhibition. *BioMed Research International*. 2014;2014: 348539.
30. Woo SM, Seo SU, Min KJ, et al. Corosolic acid induces non-apoptotic cell death through generation of lipid reactive oxygen species production in human renal carcinoma caki cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(5): 1309.
31. Wang K, Zhu X, Yao Y, Yang M, Zhou F, Zhu L. Corosolic acid induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human retinoblastoma Y-79 cells via disruption of MELK-FoxM1 signaling. *Oncology Reports*. 2018;39(6): 2777-2786.
32. Li XQ, Tian W, Liu XX, et al. Corosolic acid inhibits the proliferation of glomerular mesangial cells and protects against diabetic renal damage. *Scientific Reports*. 2016;6: 26854.
33. Wang Z-P, Shen D, Che Y, et al. Corosolic acid ameliorates cardiac hypertrophy via regulating autophagy. *Bioscience Reports*. 2019;39(12): BSR20191860.
34. Liu Q, Zhao D, Chen X, et al. Determination of corosolic acid, a natural potential anti-diabetes compound, in rat plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application to pharmacokinetic and bioavailability studies. *Planta Medica*. 2011;77(15): 1707-1711.
35. Stohs SJ, Miller H, Kaats GR. A review of the efficacy and safety of banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and corosolic acid. *Phytotherapy Research*. 2012;26(3): 317-324.
36. Yamaguchi Y, Yamada K, Yoshikawa N, Nakamura K, Haginaka J, Kunitomo M. Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sciences*. 2006;79(26): 2474-2479.
37. Qian X-P, Zhang X-H, Sun L-N, et al. Corosolic acid and its structural analogs: A systematic review of their biological activities and underlying mechanism of action. *Phytomedicine*. 2021;91: 153696.
38. Horlad H, Fujiwara Y, Takemura K, et al. Corosolic acid impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013;57(6): 1046-1054.

39. Ku CY, Wang YR, Lin HY, Lu SC, Lin JY. Corosolic acid inhibits hepatocellular carcinoma cell migration by targeting the VEGFR2/Src/FAK pathway. *PLoS One*. 2015;10(5): e0126725.
40. Li B, Li Y, Wang Q, Li F, Li F. Corosolic acid impairs human lung adenocarcinoma A549 cells proliferation by inhibiting cell migration. *Oncology Letters*. 2019;17(6): 5747-5753.
41. Zhang BY, Zhang L, Chen YM, et al. Corosolic acid inhibits colorectal cancer cells growth as a novel HER2/HER3 heterodimerization inhibitor. *British Journal of Pharmacology*. 2021;178(6): 1475-1491.