

原 著

肺高血圧ラットにおけるホスホジエステラーゼ5

阻害薬の選択的肺動脈圧低下作用

山口 芳 岡 正彦 西野 真由
花里 紀尚 吉良 枝郎 福地義之助

要旨：強力な cGMP 特異的ホスホジエステラーゼ (PDE 5) 阻害薬である E 4021 が選択的肺動脈圧低下作用をもつかどうかを、慢性低酸素性肺高血圧ラットモデルを用いて検討した。低圧チャンバー内で3週間飼育することにより作製した肺高血圧ラットにカテーテルを留置した後、無麻酔・覚醒下で E 4021 (3, 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を静脈内投与し、急性の血行動態の変化を観察した。E 4021 は 100, 300, 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で有意にそれぞれ $11 \pm 5\%$, $12 \pm 6\%$, $18 \pm 5\%$ の平均肺動脈圧低下作用を示したのに対し、体動脈圧に対しては 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でのみ有意な降圧作用 ($9 \pm 2\%$) を示した。一方、心拍数および心拍出量は変化させなかった。組織中 PDE 5 活性は、肺において大動脈に比べ著明な高値を示した。以上より、肺組織中に豊富に存在する PDE 5 活性を阻害することにより、選択的肺動脈圧低下作用が得られることが示され、E 4021 の肺高血圧治療薬としての有用性が示唆された。

キーワード：ホスホジエステラーゼ, 肺高血圧, cGMP, E 4021

Phosphodiesterase, Pulmonary hypertension, cGMP, E 4021

緒 言

肺高血圧は種々の原因で発生し、進行すれば右心不全をひきおこし生命にもかかわる病態である。肺高血圧の成因に、血管の再構築とともに血管収縮という要素が大きく関与しているという考え方から、あらゆる種類の薬物による降圧療法が試みられてきた¹⁾。しかし常に、肺血管への選択性の欠如が問題となり、臨床的に十分な効果は得られていない。

近年、一酸化窒素吸入によって、肺血管選択的拡張が得られることが示され²⁾、臨床応用がすすめられている³⁾。しかし、慢性疾患に対する長期投与となると、吸入方法や毒性等まだ多くの解決すべき問題を含んでいる⁴⁾。

ホスホジエステラーゼ (PDE) は生体内にひろく分布し、サイクリックヌクレオチド (cAMP・cGMP) を加水分解する非常に重要な酵素であり、これを阻害することにより平滑筋の弛緩がおこることが知られていた。PDE は現在少なくとも7種類のアイソザイム (PDE 1-7) に分類されるが、それぞれの局在・機能には組織特異性があることが報告されている^{5,6)}。これらの PDE アイソザイムに対する選択的阻害剤が多く開発されてお

り、組織特異的な治療薬となりえる可能性が期待されている⁷⁾。最近、cGMP を特異的に分解し、肺や血小板に優位に分布することが知られている PDE 5 に対する選択性の高い阻害薬である E 4021 が開発された^{8,9)}。本研究では、E 4021 が選択的肺血管拡張薬となりえるかどうかを、肺高血圧ラットモデルを用いて、無麻酔・覚醒下という条件でその急性効果を検討した。

方 法

1) 動物モデル：雄 Sprague-Dawley ラット (250~300 g) を、低圧チャンバー内で3週間飼育することにより、慢性低酸素性肺高血圧ラット (慢性低酸素群) を作成した。チャンバー内圧は、ポンプを用いて持続的に空気を吸引することにより約 380 Torr に保たれるように設定した。同一期間大気圧・室内気下で飼育したラットを正常対照 (対照群) とした。3週間飼育後にラットをケタラール (100 mg/kg, 筋注) およびペントバルビタール (10 mg/body, 筋注) で麻酔を行い、McMurtry と Morris の方法に従って¹⁰⁾ 肺動脈、右頸動・静脈内にカテーテルを挿入した。肺動脈カテーテルの先端を圧波形により確認した後すべてのカテーテルは、内腔をヘパリン生理食塩水で満たして固定し、皮下トンネルを通して頸部後方で、皮膚に固定された小さなプラスチック容器内にまとめて収納した。48時間大気圧・室内気下で麻酔から回復させた後、ラットを室内気で換気されているプラ

スチック容器内に移して、覚醒下で以下のプロトコールに従って血行動態の測定を行った。

2) 測定項目: 平均体動脈圧 (MSAP)・平均肺動脈圧 (MPAP) は圧トランスデューサー (MODEL TNF-R, Ohmeda, Singapore) を用いて測定し, オシロスコープ上に圧波形を描出した。心拍数 (HR) は心拍計 (AT-601 G, 日本光電) により, また心拍出量 (CO) は標準的色素希釈法¹⁰⁾により測定した。全体血管抵抗 (TSR)・全肺血管抵抗 (TPR) はそれぞれの平均圧を CO で除して算出した。カテーテル挿入時に, ヘマトクリット値測定のための血液サンプル (0.2 ml) を採取した。血行動態測定終了後ラットを過量のペントバルビタール投与により屠殺し, 右室肥大の指標である右室/左室+中隔 (RV/LV+S) 重量比測定のため心臓を摘出した。

3) 血行動態測定プロトコール: すべてのラットにおいてベースラインでの MPAP, MSAP および HR の測定を行った。慢性低酸素群のラットに対しては 10 分間隔で 3, 10, 30, 100, 300, 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の E 4021 (n=8, ただし CO 測定は 5 例) または同量の溶媒 (n=5) を静脈内に投与し, MPAP, MSAP および HR を経時的に記録した。E 4021 静脈内投与による降圧は比較的急速で, 投与後 20~30 秒より効果が出現し 4~5 分で最大となり, その後プラトーとなった事より各用量投与 5 分後の値を測定値とした。この群ではさらに, E 4021 または溶媒の投与前および最終用量投与後 5 分後に CO を測定した。

4) 組織中 PDE 5 活性の測定: 血行動態測定に用いたのは別の慢性低酸素群ラットから肺 (左全肺) および胸部大動脈を摘出し, 組織中 PDE 5 活性を測定し比較した。酵素の調整および PDE 活性測定法は Saeki と Saito¹¹⁾の方法に従って行った。凍結保存した肺 (約 100 mg, n=4) または大動脈 (約 20 mg, n=4) に緩衝液 (20 mM Tris-KCl, 2 mM Mg acetate, 5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.02 mM leupeptin, 1.3 mM benzamide, 0.2 mM PMSF, 50 mg/l aprotinin, 10 mg/l trypsin inhibitor, pH 7.4) を 1 ml 加え続いて PMSF を適量添加した後, 氷上でホモジナイズした。4, 105,000 g で 60 分間遠心し, その上清を酵素源として使用した。E 4021 (100 nM) を含むあるいは含まない測定用緩衝液 (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.126 mg/ml BSA, 0.6 ml/l 2-mercaptoethanol, pH 8.0) 80 ml に, 20 mM EGTA および酵素源をそれぞれ 10 ml づつ加え, 合計 100 ml とした。30 分で 5 分間ブレインキュベーションした後, 基質溶液 (1 mM cGMP, 1,000 dpm/ml [³H]cGMP) 100 ml を加え反応を開始した。10 分後, 95 度で 2 分間加熱し, 反応を停止させた。続いて 30 分でブレインキュベーションした後, 50 ml の 5'-nucleotidase (10 units/ml H₂O,

) を加え 30 分でインキュベーションした。10 分後, イオン交換樹脂懸濁液 (AG 1-X 2: H₂O=1:1) を 550 ml 加え, 遠心 (10,000 rpm, 2.5 min) した後, 上清の放射活性を測定した。全 PDE 活性から E 4021 存在下における PDE 活性を引いた値を PDE 5 活性として算出した。

5) 試薬: E 4021 はエーザイ化学 (鹿島) で合成されたものを用い, in vitro の実験では dimethyl sulfoxide を, in vivo の実験では 0.01 N NaOH を溶媒として用いた。

6) 統計学的検討: 測定値は平均値 \pm 標準誤差で示し, 各群間の検定には paired または unpaired t-test を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成績

1) 慢性低酸素性肺高血圧の指標: Table 1 に示すようにベースラインでの MSAP は対照群と慢性低酸素群間で有意差を認めなかった。一方, MPAP, および RV/LV+S 値においては慢性低酸素群で有意に高値となっており, 慢性の肺高血圧状態にあることが示された。さらに同群ではヘマトクリット値も著明に上昇しており, 慢性低酸素状態にあったことが示唆された。

2) 慢性低酸素性肺高血圧ラットにおける E 4021 の急性循環効果: 肺高血圧ラットのベースラインでの MPAP, MSAP はそれぞれ $29 \pm 2, 108 \pm 2$ mmHg であった (Table 1)。E 4021 の静脈内投与により 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で, 用量依存性の有意な MPAP 低下作用 [100, 300, 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でそれぞれ $11 \pm 5, 12 \pm 6, 18 \pm 5\%$, ($3 \pm 1, 4 \pm 2, 6 \pm 1$ mmHg) Fig. 1-A] が認められた。一方, MSAP に対しては E 4021 の最大用量 (1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) でのみ有意な降圧作用 [$9 \pm 2\%$ (10 ± 2 mmHg)] が認められた (Fig. 1-B)。また E 4021 による降圧作用には HR, CO の明らかな変化は伴わなかった (Fig. 2)。E 4021 投与前後 (全用量投与後) の計算で求めた総血管抵抗では, TPR は有意な低下を認めたが

Table 1 Evidence of chronically hypoxic pulmonary hypertension

Group	MPAP (mmHg)	MSAP (mmHg)	RV/LV+S (%)	Ht (%)
CON (n = 4)	13 \pm 2	95 \pm 6	30 \pm 1	46 \pm 1
CH-PH (n = 8)	29 \pm 2*	102 \pm 3	58 \pm 3*	70 \pm 1*

Values are means \pm SE. CON, control rats. CH-PH, chronically hypoxic pulmonary hypertensive rats. MPAP, mean pulmonary arterial pressure. MSAP, mean systemic arterial pressure. RV/LV+S, weight ratio of right ventricle to left ventricle + septum. Ht, hematocrit. * $p < 0.05$ vs CON by student's t-test.

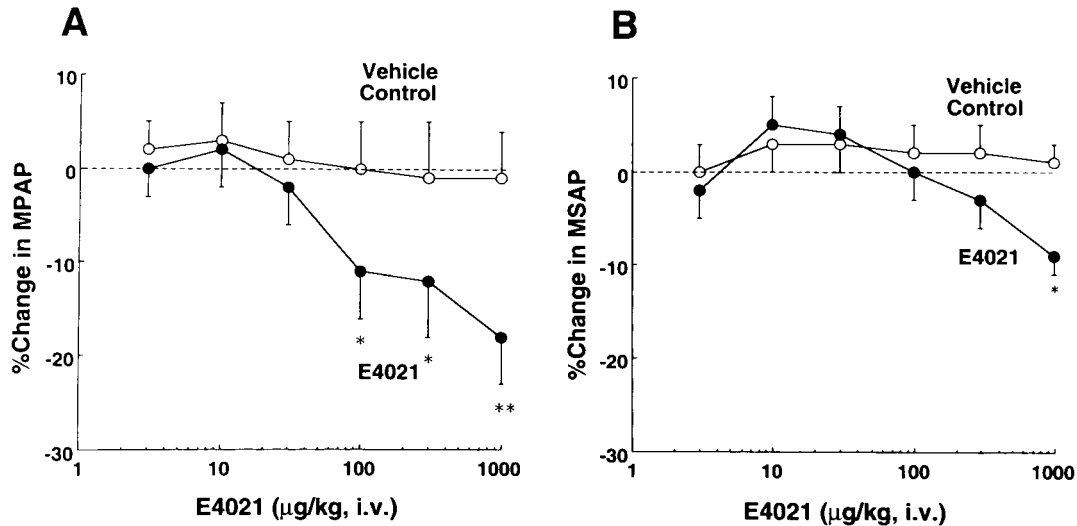


Fig. 1 Cumulative dose-response effects of E 4021 (dots) or its vehicle (circles) on % change of mean pulmonary (MPAP : A) and systemic (MSAP : B) arterial pressures in conscious chronically hypoxic pulmonary hypertensive rats. Values are means \pm SE. $p < 0.05$ and $p < 0.01$ vs. vehicle control by student's t-test.

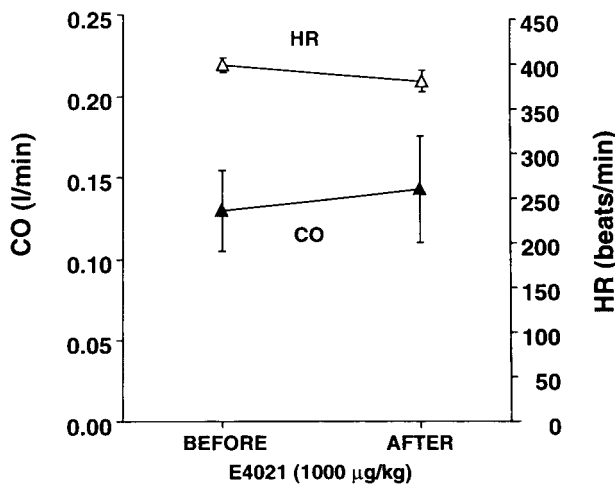


Fig. 2 Effects of E 4021 on heart rate (HR ; open triangle) and cardiac output (CO ; closed triangle) in conscious chronically hypoxic pulmonary hypertensive rats. Values are means \pm SE.

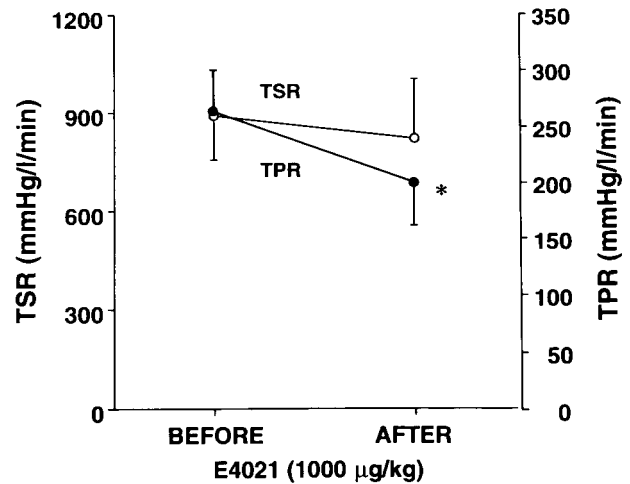


Fig. 3 Effects of E 4021 on total pulmonary (TPR : dots) and systemic (TSR : circles) resistance in conscious chronically hypoxic pulmonary hypertensive rats. Values are means \pm SE. $p < 0.05$ vs. before by student's t-test.

TSR には有意差を認めなかった (Fig. 3). なお, 对照群ラットではベースラインで E 4021 を投与しても, 肺動脈圧に明らかな変化は認めなかった.

3) 慢性低酸素性肺高血圧ラット組織中 PDE 5 活性: 肺および大動脈組織中の PDE 5 活性の絶対値は, Fig. 4 に示すように 53 ± 5.4 対 2.4 ± 1.2 fmol/mg protein/min と肺において著明に高かった. 全 PDE 活性に対する PDE 5 活性の比でも, 肺で約 53% であるのに対し大動脈では約 22% と肺における PDE 5 活性の優位性が認め

られた.

考 案

本研究は無麻酔・覚醒下の慢性低酸素性肺高血圧ラットモデルにおいて, cGMP 特異的 PDE (PDE 5) 阻害薬である E 4021 が肺動脈圧低下作用を有し, さらに E 4021 のある用量までは体動脈圧には影響を及ぼさず, 肺動脈圧のみに作用するという肺血管選択性をもつこと

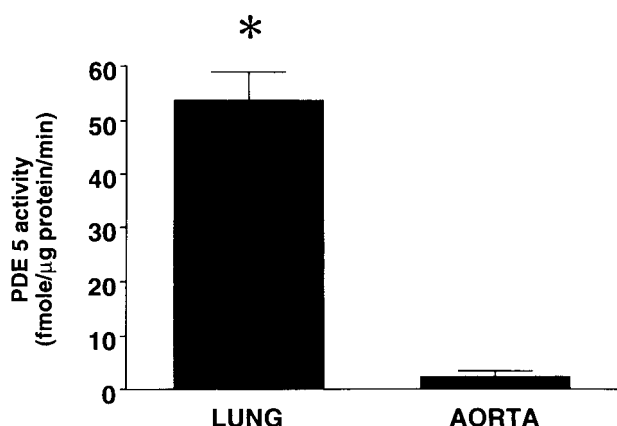


Fig. 4 Measurements of PDE 5 activity from homogenized lung and aortic tissues of chronically hypoxic pulmonary hypertensive rats. Values are means \pm SE. * $p < 0.05$ vs. aorta values by student's t-test.

を示したものである。さらに、この肺動脈圧低下作用は心拍出量の低下を伴わないことから、肺血管抵抗の低下を反映しているものと考えられた。また、慢性低酸素性肺高血圧ラット肺組織中のPDE 5活性が大動脈組織中よりも著明に高いという結果は、このモデルにおけるE 4021の降圧効果の肺血管選択性がPDE 5の分布の組織特異性による、という考え方に矛盾しないものであった。

cGMPはcAMPとともに生体内のセカンドメッセンジャーとして非常に重要な物質である。血管平滑筋において、内皮細胞由来一酸化窒素や心房性ナトリウム利尿ペプチド等の内因性血管拡張物質の作用はcGMPを介していることが知られ、cGMPは血管平滑筋のトーンの制御に大きな役割を果たしていると考えられている。細胞内でcGMPは、グアニル酸シクラーゼ(GC)が活性化されることによりGTPより産生されるが、細胞内に存在するPDEによって速やかに加水分解され不活化されていく。即ち、細胞内cGMP濃度はGCとPDE活性のバランスによって規定される、ということができる。いいかえれば、GC活性を上げるかまたはPDE活性を低下させれば、細胞内cGMP濃度は上昇し平滑筋の弛緩反応を増強させることができると考えられる。

PDEには現在少なくとも7種類のアイソザイムが存在し、それぞれの局在・機能には特異性があることが報告されている^{5,6)}。これらのうちPDE 5はcGMPを特異的に分解するアイソザイムで、肺、特に血管系を含む平滑筋に優位に分布することが知られている^{5,12)}。これらのことより我々は、PDE 5を選択的に阻害することができれば肺組織中cGMP濃度を特異的に上昇させ、肺血管選択的な拡張効果が得られる可能性があると考えた。

ザプリナストおよびジピリダモールはPDE 5の選択的阻害剤として従来より知られ、これらの薬剤によって肺血管の拡張がおこることが報告されている¹³⁾⁻¹⁵⁾。しかしザプリナストのPDE 5に対する選択性は比較的 low、またジピリダモールにはPDE 5以外に対する作用があり、薬理学的な道具としては理想的なものではない。本研究で用いたE 4021は、非常に強力な選択性の高いPDE 5阻害剤として最近開発された物質で、ブタ大動脈血管平滑筋細胞のPDE 5に対する IC_{50} が3.5 nMとザプリナスト(PDE 5に対する $IC_{50}=450$ nM)よりも100倍以上強い阻害活性を持つことが報告されている⁹⁾。

本研究において我々は、覚醒下の慢性低酸素性肺高血圧ラットにおいて、E 4021を静脈内に投与することにより選択的な肺動脈圧の急性降圧効果が得られることを示した。この結果は、低用量(300 μ g/kg iv+0.01 mg/min infusion)のE 4021が肺高血圧ラットモデルにおいて選択的肺動脈圧低下作用を示したというCohenらの報告¹⁶⁾に一致している。さらに我々は、詳細な用量作用曲線を作成して急性循環効果を検討し、E 4021は肺動脈圧に対し100 μ g/kg以上で用量依存性の降圧作用をもつ一方、体動脈圧に対しては今回投与した最大用量である1,000 μ g/kgまでは有意な降圧効果をもたないことを示した。つまり、100 μ g/kg以上1,000 μ g/kg未満という比較的狭い範囲に限られるものの、E 4021はこの肺高血圧動物モデルにおいて選択的肺血管拡張薬となりえることが確認された。

E 4021が肺血管選択性をもつ理由として我々は、PDE 5の分布の臓器特異性、つまりPDE 5が肺に多く存在するためという可能性を想定した。これを今回用いた肺高血圧ラットで確認する目的で、肺および大動脈組織中のPDE 5活性を測定し比較した。結果は組織単位蛋白重量あたりのPDE 5活性が、大動脈にくらべ肺において非常に高いというもので、我々の仮説を支持するものであった。

現在、肺血管選択性をもつ肺高血圧の治療法としてはNO吸入療法が、唯一臨床に応用されている。吸入されたNOは、血中で主にヘモグロビンにより速やかに不活化されるため、体循環系にほとんど影響を及ぼさず、NO吸入療法は高い肺血管選択性をもっている¹⁷⁾。しかし慢性疾患に対する長期投与に関しては、NO自体の毒性等の副作用や、吸入方法等多くの解決しなければならない問題が残されている⁴⁾。E 4021の肺血管選択性は比較的狭い投与量の範囲に限られるが、この薬剤は経口投与可能であり、また現時点では大きな副作用も予想されず、慢性の肺高血圧の有効な治療薬となりえる可能性が期待される。

謝辞：PDE 5活性測定に協力して頂いたエーザイの児玉耕

太郎博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Rubin, LJ: Vasodilator therapy. (General aspects) In: Fishman AP, ed, The Pulmonary Circulation: Normal and Abnormal, Univ. of Pennsylvania Press, Philadelphia, 1990; 479-483.
- 2) Pepke-Zaba, J, Higenbottam, TW, Dinh-Xuan, AT, et al: Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338: 1173-1174.
- 3) Kinsella, JP, Neish, SR, Shaffer, E, et al: Low-dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992; 340: 819-820.
- 4) Zapol, WM, Rimar, S, Gillis, N, et al: Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1375-1380.
- 5) Beavo, JA: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; 75 (4): 725-748.
- 6) Polson, JB: Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 403-427.
- 7) Murray, KJ: Phosphodiesterase VA inhibitors. *Drug News Persp* 1993; 6 (3): 150-156.
- 8) Kodama, K, Adachi, H, Mori, N, et al: Effects of a novel, selective and potent phosphodiesterase type V inhibitor, E 4021, on myocardial ischemia in guinea pigs. *Eur J Pharmacol*, 1994; 263: 93-99.
- 9) Saeki, T, Adachi, H, Takase, Y, et al: A selective type V phosphodiesterase inhibitor, E 4021, dilates porcine large coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 825-831.
- 10) McMurtry, IF and Morris, KG: Platelet activating factor causes pulmonary vasodilation in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 757-762.
- 11) Saeki, T and Saito, I: Isolation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes from pig aorta. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 833-839.
- 12) Ahn, SH, Crim, W, Pitts, B, et al: Calcium-calmodulin-stimulated and cyclic-GMP-specific phosphodiesterases: tissue distribution, drug sensitivity and regulation of cyclic GMP levels. In Stradz, S.J. & Hidaka, H. eds. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. Raven Press Ltd., New York 1992; 25: 271-288.
- 13) Braner, DA, Fineman, JR, Chang, R, et al: M&B 22948, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, is a pulmonary vasodilator in lambs. *Am J Physiol* 1993; 264: H 252-H 258.
- 14) McMahan, TJ, Ignarro, LJ, Kadowitz, PJ, et al: Influence of Zaprinas on vascular tone and vasodilator responses in the cat pulmonary vascular bed. *J Appl Physiol* 1993; 74 (4): 1704-1711.
- 15) Ziegler, JW, Ivy, DD, Fox, JJ, et al: Dipyridamole, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, causes pulmonary vasodilation in the bovine ovine fetus. *Am J Physiol* 1995; 269: H 473-H 479.
- 16) Cohen, AH, Hanson, K, Morris, K, et al: Inhibition of cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase selectively vasodilates the pulmonary circulation in chronically hypoxic rats. *J Clin Invest* 1996; 97 (1): 172-179.
- 17) Pearl, RG: Inhaled nitric oxide: The past, the present, and the future. *Anesthesiology* 1993; 78 (3): 413-416.

Abstract

E 4021, a cGMP Phosphodiesterase Inhibitor, is a Selective Pulmonary Vasodilator in Chronically hypoxic Pulmonary Hypertensive Rats.

**Kaoru Yamaguchi, Masahiko Oka, Mayu Nishino, Norihisa Hanasato,
Shiro Kira and Yoshinosuke Fukuchi**

Department of Respiratory Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113 0033, Japan

To test whether a potent cGMP-specific phosphodiesterase inhibitor, E 4021, is a selective pulmonary vasodilator in pulmonary hypertension, we studied its acute hemodynamic effects in conscious, chronically hypoxic pulmonary hypertensive rats. Chronically hypoxic pulmonary hypertension was induced by keeping adult Sprague-Dawley rats in a hypobaric chamber for 3 weeks. Two days after catheterization, E 4021 was injected intravenously at doses of 3, 10, 30, 100, 300, and 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at 10-min intervals. E 4021 caused significant decreases in mean pulmonary arterial pressure of 11 ± 5 , 12 ± 6 , and $18 \pm 5\%$ at doses of 100, 300, and 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. In contrast to its depressor effect on mean pulmonary arterial pressure, E 4021 decreased mean systemic arterial pressure significantly (by $9 \pm 2\%$) at a dose of 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ only. Heart rate and cardiac output were unchanged after the administration of E 4021. Tissue cGMP-specific phosphodiesterase activity was markedly higher in lung than in aorta. These results indicate that E 4021 is a relatively selective pulmonary vasodilator in chronically hypoxic pulmonary hypertensive rats. We conclude E 4021 may be useful for the treatment of pulmonary hypertension.