

藍葉による右室肥大を伴わない肺血管中膜肥厚
形成機序の解明

2024

常松 保乃加

目次

第一章 緒言	6
第二章 藍葉含有成分による肺血管肥厚形成作用およびその作用機序の検討	10
第一節 序論	10
第二節 実験方法	14
2.2.1. 試薬	14
2.2.2. 動物実験	14
2.2.3. 組織学的分析	15
2.2.4. 蛍光免疫染色	16
2.2.5. HPLC 分析	18
2.2.6. 血清中 indican と IS の測定	19
2.2.7. AST-120 に対する Indican/IS 結合アッセイ	19
2.2.8. Gene Expression Omnibus (GEO) データベース分析	20
2.2.9. 細胞培養	20
2.2.10. qRT-PCR 分析	21
2.2.11. MTT アッセイ	24
2.2.12. 細胞内 ROS レベルの測定	24
2.2.13. ウェスタンブロッティング	25

2.2.14. IL における indican の検出.....	26
2.2.15. 統計処理.....	27
第三節 実験結果.....	28
2.3.1. ラットへの IL 長期慢性高用量投与が肺血管に与える影響.....	28
2.3.2. IL 投与ラットの血清中 indican および IS 濃度測定.....	31
2.3.3. SMC における indican、IS による細胞増殖作用の検討.....	33
2.3.4. GEO データベース分析.....	35
2.3.5. IL 投与ラットの肺組織における EC 由来 ET-1 発現レベルの検討.....	38
2.3.6. EC における indican、IS による ET-1 mRNA 発現作用の機序の検討.....	42
2.3.7. SMC における indican、IS によるエンドセリン受容体発現への影響.....	47
第四節 考察.....	49
第三章 総括.....	53
第四章 参考文献.....	55
謝辞.....	65

本論文では、以下の略語を用いた。

UC	ulcerative colitis (潰瘍性大腸炎)
PAH	pulmonary arterial hypertension (肺動脈性肺高血圧症)
IL	indigo leaves (藍葉)
ET-1	endothelin-1 (エンドセリン-1)
EC	endothelial cell (内皮細胞)
SMC	smooth muscle cell (平滑筋細胞)
Indican	indoxyl- β -D-glucoside (インドキシル- β -D-グルコシド)
IS	indoxyl sulfate (インドキシル硫酸)
VSMC	vascular smooth muscle cell (血管平滑筋細胞)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell (ヒト臍帯静脈内皮細胞)
RASMC	rat aortic smooth muscle cell (ラット大動脈平滑筋細胞)
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine (<i>N</i> -アセチル-Lシステイン)
TFA	2,2,2-trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
AhR	aryl hydrocarbon receptor (芳香族炭化水素受容体)
DCFH-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate (2',7'-ジクロロフルオレセインジアセタート)
ROS	reactive oxygen species (活性酸素種)

RV	right ventricle (右心室)
LV + S	left ventricle plus septum (左心室 + 中隔)
FBS	fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
DMSO	dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (3- (4, 5-ジメチル-チアゾール-2-イル) -2, 5-ジフェニルテトラゾリ ウムブロマイド)
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフ)
HE 染色	hematoxilin-eosin 染色 (ヘマトキシリン-エオシン染色)
PBS	phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)

第一章 緒言

徳島県をはじめ、日本で栽培されている「藍」は古くから藍染といった染料や塗料として利用されており、藍から生み出される藍色はジャパンプルーとして現在も親しまれ、日本の伝統的な色とされている。一方で、藍は生薬としても利用されている。藍の葉を原料とする生薬「青黛（セイタイ、英語名: Indigo Naturalis）」は、紀元 900 年頃の書物「開宝本草」に、青黛は消化器症状に対しても使用されていることが記されており、以後中国では抗炎症効果を目的として潰瘍性大腸炎（UC）の民間治療薬として普及していた¹⁾²⁾。実際に、2018 年に発表された日本の臨床研究でも UC 患者のランダム化比較試験において青黛の有効性が報告され³⁾、また、ステロイド、抗 TNF- α 治療薬抵抗性の難治性の UC 患者に対しても青黛の有効性が示されている⁴⁾。青黛による UC の改善は青黛中に含まれるインドール化合物の indigo によるもので、indigo が aryl hydrocarbon receptor (AhR) のアゴニストとして作用し、抗炎症効果を示すことが報告されている¹⁾。しかし、青黛の臨床効果の正確な機序は十分解明されていないことから保険収載には到っておらず、日本では患者の自己購入で使用されており、2017~2018 年の日本の全国調査によると UC 患者の 1.8%が青黛を使用していることが報告されている⁵⁾。その一方で青黛を長期服用した UC 患者において、青黛の服用と因果関係の否定できない肺動脈性

肺高血圧症（PAH）を発症した症例が複数報告されていることから⁵⁾⁶⁾、日本ではその使用に関して厚生労働省から注意喚起がなされた⁷⁾。これらの報告結果に基づいて、青黛は2018年の第6回肺高血圧症に関する世界シンポジウムで肺高血圧症に関連する可能性のある薬物および毒素のリストに追加された⁸⁾。しかし青黛がPAHを引き起こす明確な原因成分および発症機序は未だ不明のままである。

PAHは進行性で複雑かつ予後不良の難治性呼吸器疾患である⁹⁾。PAHは過度の血管収縮と異常な血管リモデリングによって生じる肺血管肥厚を原因とする肺動脈圧の上昇を特徴とし、進行すると右心不全に進展する¹⁰⁾¹¹⁾。PAHの病態形成には血管内皮傷害、血管平滑筋細胞増殖による肺血管壁肥厚が中心的な役割を果たす。

青黛の原料である藍葉（Indigo leaves; IL）の液胞には無色の配糖体でインドール骨格をもつ indoxyl- β -D-glucoside（indican）が含まれる¹²⁾。採取直後のIL中のindican含量は約0.5%（生葉重量に対する割合）との報告がある¹³⁾。IL中のindicanは糖が加水分解されると非常に不安定な indoxyl となり、さらに酸化され indigo やその構造異性体 indirubin などに変化する¹⁴⁾。青黛には indican の他、indigo、indirubin、isatin などの indican 誘導体が含まれていることが報告されており（図1）、これらインドール骨格化合物は AhR のリガンドである¹⁵⁾¹⁶⁾。このうち、indirubin は AhR 活性化を介して PAH を引き起こす可能性が報告されているが¹⁶⁾、他の化合

物に関する報告はない。また、IL および青黛に含まれる *indican* は生体内において腸管の β -*glucosidase* により加水分解されたのち、腸管から吸収され、肝臓で硫酸抱合を受け *indoxyl sulfate* (IS) に代謝されることが報告されている¹⁷⁾ (図2)。

そこで、本研究では青黛の原料である IL に着目し、IL 含有成分のうち IL 中に多く含まれ、様々なインドール骨格化合物の出発原料となる *indican* とその代謝物 IS の肺血管肥厚を誘導する成分およびその作用機序を検討することとした。

具体的には、ラットへの IL 長期投与による肺血管肥厚形成作用、IL 含有成分 *indican* と代謝物 IS が血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に与える影響を検討し、IL が PAH を惹起する機序について研究を行った。

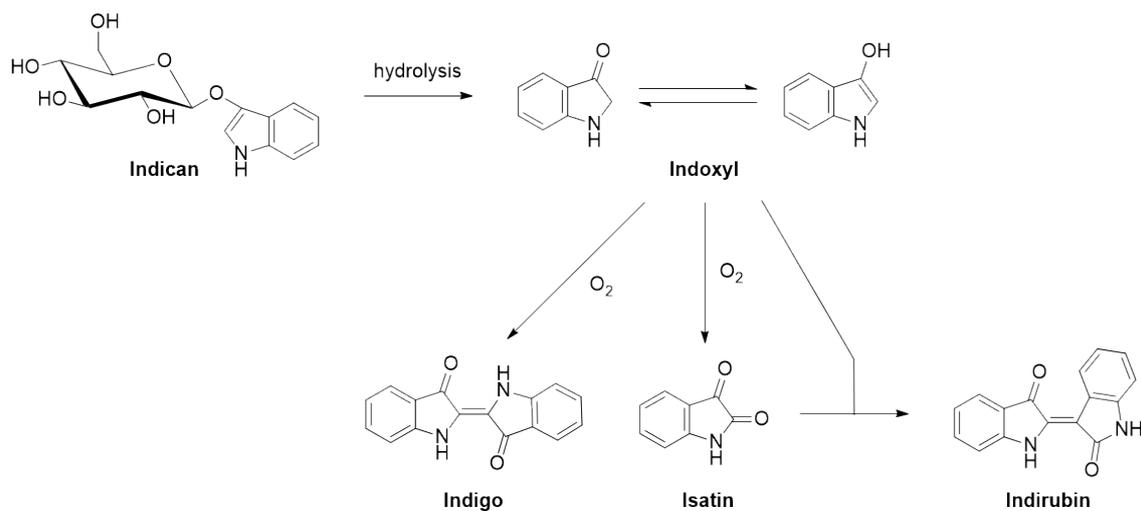


図 1. Indican を出発原料とする青黛含有成分の生成過程¹⁴⁾

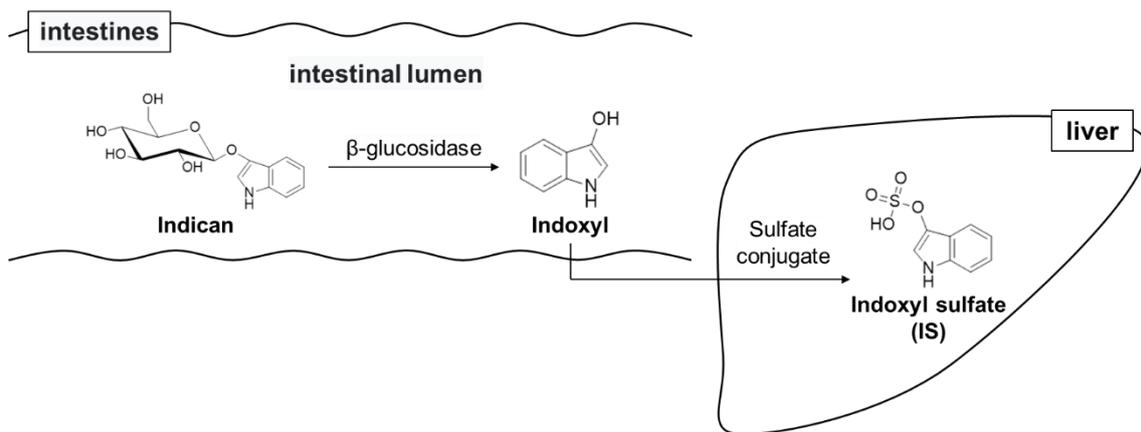


図 2. 生体内で indican が IS に代謝される過程¹⁷⁾

第二章

藍葉含有成分による肺血管肥厚形成作用および その作用機序の検討

第一節 序論

肺高血圧症（PH）は病因、病態生理に基づいて5つに分類されている⁸⁾。すなわち、第1群: PAH、第2群: 左心性心疾患に伴う肺高血圧症、第3群: 肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症、第4群: 慢性血栓塞栓性肺高血圧症、第5群: 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。第1群のPAHはさらに特発性PAH（idiopathic PAH; IPAH）、遺伝性PAH（heritable PAH; HPAH）、薬剤・毒物誘発性PAH、各種疾患に伴うPAH（associated PAH; APAH）に再分類されている。青黛によるPAHは薬剤・毒物誘発性PAHに分類される。その他にPAH発症に関連する薬物として、食欲抑制薬フェンフルラミンやメタンフェタミン、慢性骨髄性白血病治療薬ダサチニブなどが報告されているが、いずれも明確な機序は不明である¹⁸⁾。PAHは肺微小血管のリモデリングによる肺血管内腔の狭小化を特徴とし、これにより肺動脈圧が上昇する疾患である。PAHは病理学的に、中膜肥厚、線維性内膜増殖、血管周囲の炎症性浸潤を特徴とするが、その病態生理学的メカニズ

ムは完全には明らかではない。成人における PAH の推定有病率は 100 万人あたり約 15～55 例、年間発症率は 100 万人あたり 2.4～6 例である¹⁹⁾。症状としては息切れや動悸、進行すると呼吸困難を生じる。治療しないと、後負荷の増大により右心不全に進展し、死亡につながる。現在使用が推奨される PAH 治療用医薬品は肺血管を拡張する機序をもつ、① ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬、② エンドセリン受容体拮抗薬、③ プロスタサイクリン系薬、④ 可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬の 4 系統である。これらの治療選択肢により、平均生存期間が 2.8 年から 7 年まで延長した²⁰⁾。特に PAH の治療において③ エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタン、アンブリセンタン、マシテンタンは非常に有効である²¹⁾。エンドセリンは 1988 年に発見されたペプチドホルモンで、血管収縮作用をもち血圧上昇に寄与する。エンドセリンには主に endothelin-1 (ET-1)、endothelin-2 (ET-2)、endothelin-3 (ET-3) の 3 つの異なるアイソフォームが存在するが、その中でも ET-1 は特に強力な血管収縮作用を有し、主に血管内皮細胞から産生される。PAH 患者では、血漿中の ET-1 濃度が上昇し、肺組織における ET-1 の発現が増加していることが報告されている^{22) 23)}。血管内皮から放出された ET-1 は、血管収縮を引き起こし、血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖を促進することで中膜肥厚に関与している^{24) 25)}。PAH の重症度と血中 ET-1 濃度には正の相関があることが報告されている²³⁾。エンドセリン受容体拮抗薬が開発されたことで、PAH の予後は大きく改善され、ET-1 が

PAHの病態に重要な役割を果たしていることが示唆されている²⁶⁾。

本研究で着目したIL含有成分indicanの代謝物ISは、慢性腎不全時の尿毒症物質の一つとしても知られている。ISは食事由来のトリプトファン代謝物として健常人においても血中にわずかに存在する。健常人ではISは尿中に排泄されるが、腎不全により排泄機能が低下すると血中濃度が上昇する。ISは腎機能や心血管系に影響を及ぼすことが報告されており、酸化ストレス増加、炎症性サイトカインの産生を誘導し、腎障害を促進する^{27) 28)}。また、血管平滑筋細胞の増殖、遊走、石灰化、血管内皮細胞の老化など、血管平滑筋細胞および血管内皮細胞に対してさまざまな悪影響を及ぼすことが報告されている^{29) 30)}。さらに、ラット大動脈においてET-1誘発性血管収縮を増強するという報告はあるが³¹⁾、ISまたはその前駆体がET-1発現に直接影響を及ぼすことを示唆する報告はない。

ところで、ILは青黛の原料であるだけでなく、ILを利用したお茶や青汁といった健康食品が販売されている。辻らは、1%IL含有高脂肪食をラットに6週間投与し安全性について評価しており、臓器重量に変化がないことを報告しているが³²⁾、ILの肺血管に対する影響は報告がない。したがって、ILを長期投与することにより安全性を評価することはILの安全な利用にも繋がる。

そこで本論文において、ILの肺血管に対する影響とindicanおよび代謝物ISによるET-1発現の調節について検討した。これらの評価は、動物モデル、ヒト臍帯静

脈内皮細胞（HUVEC）、およびラット大動脈血管平滑筋細胞（RASMC）を使用し
て実施した。

第二節 実験方法

2.2.1. 試薬

Indican (EI03317) は Biosynth Chemistry & Biology (シュタート、スイス) から、IS カリウム塩 (I3875) は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から、経口吸着炭 AST-120 (Kremezin®) は 呉羽化学 (東京、日本) から購入した。AhR 阻害剤 CH223191 (16154) は Cayman Chemical Co. (アナーバー、ミシガン州) から、抗酸化剤 *N*-アセチル-L-システイン (NAC) (A0905) は 東京化成工業 (東京、日本) から購入した。乾燥した IL (*Persicaria tinctoria*) は Bon-Arm. Co., INC (徳島、日本) から入手し、粉碎機 (HC-700; CGOLDENWALL, 広東省、中国) で粉碎後、ふるい (mesh size: 710 μm) で篩分けし IL 粉末として実験に供した。

2.2.2. 動物実験

すべての実験手順は、徳島大学動物実験ガイドライン (徳島大学動物実験委員会) に従って実施し、実験プロトコールは「徳島大学動物管理利用委員会」によって承認された (許可番号: T2020-80)。4 週齢の雄性 Wistar ラットは、日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) から購入した。動物は、25°C の温度制御された部屋で 12 時間の明暗サイクルの下で飼育された。動物を、通常餌 (Control) 群 ($n = 9$)、IL 群 ($n = 9$)、および IL+AST 群 ($n = 5$) の 3 群にランダムに分けた。Control 群には、

通常餌 (CLEA Rodent Diet CE-2; 日本クレア、東京、日本) を与え、IL 群には 5% IL 粉末を含む通常餌を与えた。IL+AST 群には、IL 群に使用した餌に 5% AST-120 を添加したものを与えた。水および餌は自由に摂餌させた。摂餌 1 ヶ月または 6 ヶ月後、抱水クロラール (300 mg/kg) を腹腔内投与 (10 mL/kg) することにより麻酔下、下大静脈から採血を行い室温で静置した後、血液サンプルを $10,000 \times g$ で 15 分間遠心分離して血清を回収し、後の分析のために -80°C で凍結した。大量の抱水クロラールを用いて安楽死させた後、室温の生理食塩水を左室から注入して還流し、臓器 (肺、心臓) を摘出し、10% 中性ホルマリンに浸し、組織学的分析に供した。また、各臓器の一部、臓器を qT-PCR のサンプル用に取り、 -80°C で保存した。

2.2.3 組織学的分析

肺組織は 10% 中性ホルマリンで 4°C 下、72 時間固定し、パラフィンに包埋し、ミクロトームで 3~4 μm に薄切した。パラフィン包埋肺切片をヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色し、顕微鏡 (BZ-9000; Keyence、大阪、日本) を用い 200 倍の倍率で撮影し、肺動脈 (内径: $<100 \mu\text{m}$) の形態学的分析を実施した。肺動脈の内壁の厚さは、次の式を使用して計算した:

$$\text{内壁の厚さ } (\mu\text{m}) = (\text{外径} - \text{内径}) / 2 \text{ または } \text{内壁の厚さ} / \text{外径}$$

肺血管内壁の定量分析では、各サンプルからランダムに選択した 20~35 の血管を

分析し、各サンプルの平均値を計算した。右心室肥大を評価するために、右心室 (RV)、左心室と中隔 (LV+S) を解剖して重量を測定し、フルトン指数 (RV / (LV+S)) を次の式を使用して計算した:

$$\text{フルトン指数} = \text{RV の重量} / \text{RV 以外の心臓 (LV+S) の重量}$$

肺血管厚の測定は、ImageJ ソフトウェア (version 1.52a; 国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州) を使用して実施した。

2.2.4. 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色は Adams らの方法を一部変更して実施した³³⁾。すなわち、肺組織サンプルを 10% 中性ホルマリンで 16 時間固定し、その後 30% スクロースで置換し、OTC compound (4583; Sakura Finetek、東京、日本) に包埋した。凍結切片 (厚さ 8 μm) をクライオスタットで切断し、免疫組織化学用にガラススライド上に置き、-80°C で保存した。切片をアセトンで固定し、0.1% Triton X-100 / PBS を用いて 4°C で 5 分間透過処理した。サンプルを 10% Goat serum でブロッキングした後、抗 ET-1 抗体 (1:500、PA3-067; Invitrogen、カールスバット、カルフォルニア州)、抗 CD31 抗体 (1:200、550274 または 550300; BD Biosciences、サンノゼ、カルフォルニア州)、および Hoechst 33342 溶液 (1:2000; DOJINDO、熊本、日本) を使用して 4°C で一晩インキュベートした。各一次抗体検出は、Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス

(1:2000、ab150113; Abcam、ケンブリッジ、英国)、Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ (1:2000、ab175471; Abcam)、Alexa Fluor 488 ヤギ抗ラット (1:2000、ab150157; Abcam)、Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ (1:2000、A11036; Invitrogen)、または Alexa Fluor 568 ヤギ抗マウス二次抗体 (1:2000、ab175473; Abcam) を使用して実施した。染色された切片は、共焦点レーザー顕微鏡 (A1R; Nikon、東京、日本) で観察した。本研究において内皮確認用の CD31 抗体は 2 種類用いた。1 ヶ月 IL 投与ラットの肺血管内皮細胞 (EC) の検出には抗 CD31 抗体 (550274; BD Biosciences) を使用し、6 ヶ月 IL 投与ラットの肺血管 EC の検出には抗 CD31 抗体 (550300; BD Biosciences) を使用したが、図 3 に示すように、これら 2 つの抗体を使用した場合の染色パターンはほぼ同じで共に内皮を認識することを確認した。EC 層 (CD31 陽性領域) 内の ET-1 染色の平均強度は、ImageJ ソフトウェア (version 1.52a; 国立衛生研究所) を使用して測定した。

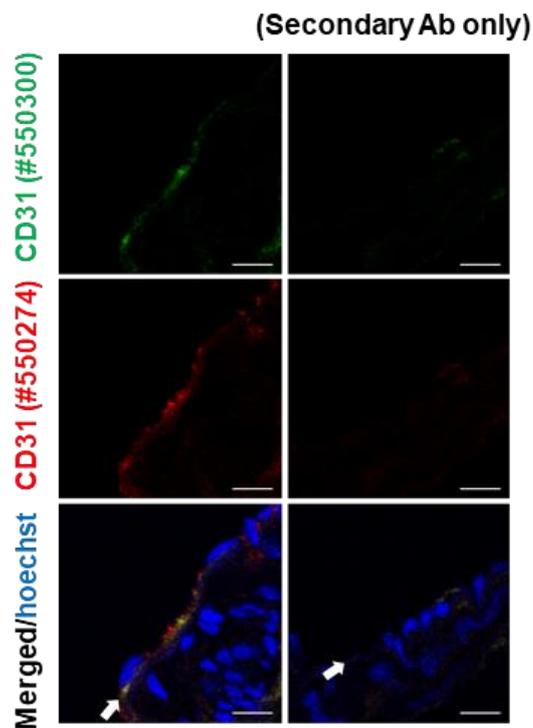


図 3. ラット肺組織切片における抗 CD31 抗体による EC 層染色パターン

白い矢印は EC 層を示す。scale bar = 10 μ m

(緑) 励起 / 蛍光波長: 495 / 519 nm、(赤) 励起 / 蛍光波長: 578 / 603 nm、

(青) 励起 / 蛍光波長: 352 / 461 nm

2.2.5. HPLC 分析

HPLC は、LC-10AD インテリジェント HPLC ポンプ (島津製作所、京都、日本)、RF-10A 蛍光検出器 (島津製作所)、および CTO-10AC カラムオーブン (島津製作所) を用いて実施した。分離は TSKgel ODS-80Ts カラム (C18、4.6×15 cm、5 μ m; 東ソー、東京、日本) を 40°C に保持して実施した。移動相は水:アセトニトリル = 95:5 (v/v) に 0.2% TFA を加えたものを流速 1 mL/min で適用した。カラムに試料を

20 μL 注入し、蛍光検出は励起波長 290 nm、蛍光波長 400 nm で行った。測定機器から得られたデータは、PicoLog ADC-20 データロガー (Pico Technology Ltd.、イングランド、英国) を用いてデジタル形式に変換し、さらなる分析と評価のために Microsoft Excel にインポートされた。

2.2.6. 血清中 indican と IS の測定

Indican および IS の血清濃度は、以前に報告された方法³⁴⁾に基づいて HPLC を用いて測定した。標準溶液は indican と IS を秤量し、メタノールに溶解して作成した (0.5~10 μM)。血清 60 μL に 180 μL のメタノールを加え、15,000 rpm で 15 分間遠心分離して除蛋白し、上清を得た。上清を 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過し、HPLC を使用して分析した。Indican と IS の保持時間の位置に出現するピーク面積と標準溶液で作成したピーク面積による検量線から、血清中 indican および IS 濃度を求めた。

2.2.7. AST-120 に対する Indican/IS 結合アッセイ

Indican または IS と AST-120 間の吸着能を HPLC を使用して測定した。Indican と IS をそれぞれ 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解して、濃度 10 mg/dL のサンプル溶液を調製した。AST-120 (500 mg) を 50 mL のサンプル溶液に加え、混合溶液

を 37°C で 3 時間、振とう機 (MMS-3010; EYELA、東京、日本) を用いて 200 rpm で振とうした。溶液を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過した後、溶液中に残存する indican または IS を HPLC で分析した。

2.2.8 Gene Expression Omnibus (GEO) データベース分析

Genevestigator ソフトウェア (<https://genevestigator.com/>、バージョン: 9.5.0、リリース日: 2022-10-06) を使用して、GEO データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) から取得したデータセット GSE117261 と GSE16624 を分析した。各データセットの遺伝子発現の変化は、「Differential Expression」分析を使用して計算され、各遺伝子の偽発見率 (FDR)、p 値、および $\log_2\text{FC}$ が得られた。遺伝子は、 $\text{FDR} < 0.1$ 、 $p < 0.05$ 、および $\log_2\text{FC} > 0.6$ に基づいて、有意にアップレギュレーションされていると定義された。公式のヒト遺伝子シンボルは、GeneCardsSuite (<https://www.genecards.org>) Web サイトを使用して公式のラット遺伝子シンボルに変換された。

2.2.9. 細胞培養

HUVEC (C2517A) は、Lonza (バーゼル、スイス) から購入し、EGM™-2e 内皮細胞増殖培地-2 singleQuots™ サプリメントおよび増殖因子 (CC-4176; Lonza) を添

加した EBM™-2 内皮細胞基礎培地 (CC-3156; Lonza) で培養した。RASMC は Lonza (バーゼル、スイス) から購入し、10% ウシ胎児血清 (S1810-500; BioWest、ヌアイユ、フランス)、30 µg/mL ゲンタマイシン硫酸塩 (071-06453: 和光、大阪、日本)、および 15 ng/mL アムホテリシン B (017-27971; 和光、大阪、日本) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 / F12 (048-29785; 和光、東京、日本) で培養した。すべての細胞は、5% CO₂ および 95% 室内空気 (21% O₂) 下、37°C で培養された。

2.2.10. qRT-PCR 分析

細胞は、刺激の 3 日前に 0.6×10^5 cells/well の濃度で 6 well プレートに播種した。刺激の 28 時間前に培地を交換し、AhR 阻害剤 CH223191 (10µM) または NAC (10µM) を、indican または IS による 12 時間の刺激の 1 時間前に添加した。

細胞または肺組織からの全 RNA を、RNAiso Plus (9109; TaKaRa Bio、滋賀、日本) を使用し、メーカーの指示に従って、改良酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム法に従って抽出した。全 RNA (1000 ng) は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (FSQ-301; TOYOBO、大阪、日本) を使用してメーカーの指示に従って cDNA 合成に使用した。PCR 混合物には、cDNA (33 ng の全 RNA に相当)、フォワードプライマーとリバースプライマー、および THUNDERBIRD SYBER qPCR

Mix (QPS-201; TOYOBO) が含まれた。定量 PCR は、Applied Biosystems 7500

(Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州) で、次の条件下で実施した: 95°C で 1 分、95°C で 10 秒、60°C で 40 秒の 45 サイクル。β-アクチン遺伝子発現を使用して、サンプルの増幅を正規化した。この研究で使用したヒトおよびラット特異的プライマーは、表 1 および 2 に列挙する。

表 1. ヒトオリゴヌクレオチドプライマー

(Human)	Forward	Reverse
ET-1	5'-CAGGGCTGAAGACATTATGGAGA -3'	5'-CATGGTCTCCGACCTGGTTT-3'
ET _B	5'-GCTTGCTTCATCCCGTTCAGA-3'	5'-CTTCCCGTCTCTGCTTTAGGTG-3'
<i>CYP11A1</i>	5'-TCGGCCACGGAGTTTCTTC-3'	5'-GGTCAGCATGTGCCCAATCA-3'
β-actin	5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATTA -3'	5'-ATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG -3'

表 2. ラットオリゴヌクレオチドプライマー

(Rat)	Forward	Reverse
ET-1	5'-GTTTTGCATTGAGTTCCATTTGC -3'	5'- GAAAGCCACAAACAGCAGAGAGA -3'
ET _A	5'-ATCGGGATCCCCTTGATTAC-3'	5'-CCAGTCCTTCACGTCTTGGT-3'
ET _B	5'-CGATTGTATCATGCCTCGT-3'	5'-GGGACCATTTCTCATGCACT-3'
<i>Cyp1a1</i>	5'-ATGAGTTTGGGGAGGTTACTGGT -3'	5'- ACTTCTTATTCAAGTCCTTGAAGGC A-3'
<i>Nt5e</i>	5'-GGCTATCTGAAGGTTGAGT-3'	5'-CCGAGTTCCTGTGTAGAATA-3'
<i>Rgs1</i>	5'-AACTCCTTGCCAACCAGATG-3'	5'-TGTGGGAGTTGGTGTTTTGA-3'
<i>Thy1</i>	5'-AGCTATTGGCACCATGAACC-3'	5'-GCTGATCACCCCTCTGTCCTC-3'
<i>Aspn</i>	5'-TGTCCAACAGTGCCAAAGATG-3'	5'-CCAACAACGCAGCGAAAC-3'
<i>Cpa3</i>	5'-TGCACCAGAGTCCGAGAAAG-3'	5'-TCGGTGGCAGTTTGATTGTG-3'
<i>Cpe</i>	5'-CTCCTGGTCATCGAGCTGTCT-3'	5'-TCGTGTGCTGTGGATCAGGTT-3'
<i>Frzb</i>	5'-ATTTGGCTCGCTGTATTGAC-3'	5'-GTGCACATTTCACTGTCCTG-3'
<i>Gem</i>	5'-TAGTGCGGTGTGAGAAGTG -3'	5'-GACAGGTCATGGCAGGATTT-3'
<i>Ltbp2</i>	5'-GCTACACTTGTGACTGCTT-3'	5'-GCGATAGGAACCCTCTGT-3'
β -actin	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA -3'	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG -3'

2.2.11. MTT アッセイ

RASMC は、刺激の 2 日前に 1×10^4 cells/well の濃度で 24 well プレートに播種した。刺激の 1 日前に、培地を 1% FBS 含有培地に変更し、細胞を indican または IS (25、100、250 μM) で刺激した。24 時間刺激した後、PBS に溶解した MTT 試薬 (349-01824; DOJINDO) を添加し (最終濃度 0.5 mg/mL)、細胞を 3 時間インキュベートした。インキュベーション後、培地を除去し、DMSO を加えて生成したホルマザン結晶を溶解し、538 nm の吸光度を測定した。Indican または IS を添加していない検体を Control、また細胞を含まない検体を blank として同様に操作した。細胞増殖率は以下の計算式により算出し、Control の細胞増殖率を 1 として評価した。

$$\text{細胞増殖率} = \frac{\text{検体の吸光度} - \text{blank の吸光度}}{\text{Control の吸光度} - \text{blank の吸光度}}$$

2.2.12. 細胞内 ROS レベルの測定

細胞内 ROS は、dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA、D6883; Sigma-Aldrich) を使用して検出した。HUVEC を DCFH-DA (10 μM) とともに 37°C で 30 分間インキュベートし、Hank's 平衡塩溶液 (14185052; Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州) で 1 回洗浄後、indican (100 μM)、IS (100 μM)、または H_2O_2 (400 μM) で 30 分間刺激した。ROS 消去剤としては、刺激の 1 時間前に NAC

(10 μ M) を加えた。ROS 生成は、マイクロプレートリーダー (Infinite F200; Tecan Austria GmbH、グレーディヒ、オーストリア) を使用して、励起 / 蛍光波長: 488 / 532 nm で、ROS により生成した DCF を定量化した。

2.2.13. ウェスタンブロッティング

HUVEC は刺激の 1 日前に 6 well プレートに播種された。通常酸素状態 (Nx; 21% O₂) で indican (100 μ M) または IS (100 μ M) を用いて 4 時間刺激、または低酸素状態 (Hx; 1% O₂) で 4 時間処理した。細胞溶解液は、20 mM HEPES-Na、5 mM EDTA-Na、5 mM EGTA-Na、50 mM NaF、50 mM β -グリセロリン酸、5 mM Na₄P₂O₇、250 mM スクロース、1.5% Triton-X100、1 mM Na₃VO₄、50 mg/L 大豆トリプシン阻害剤、25 mg/L アプロチニン、0.15 mM ベンズアミジン、0.5 mM フェニルメチルスルホニルフルオリドおよび 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む溶解緩衝液で調製された。総タンパク質 25 μ g に相当する細胞溶解液を SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、既報のようにポリフッ化ビニリデン膜に電気転写した³⁵⁾。メンブレンを、5% スキムミルクを含む 0.1% Tween-20 を含むリン酸緩衝生理食塩液 (PBS-T) で室温にて 90 分間ブロッキングし、その後、1:200 に希釈した抗 HIF-1 α 抗体 (10006421; Cayman chemical) とともに 4°C で一晩インキュベートした。続いて、メンブレンを西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG (#7074; Cell

signaling Technology、ダンバース、マサチューセッツ州) とともに室温で 1 時間インキュベートし、シグナルを Pierce ECL Western Blotting Substrate (32106; Thermo Fisher Scientific) を使用して発色させた。免疫反応性バンドは、ImageQuant LAS 4000 発光画像分析装置 (GE Healthcare、シカゴ、イリノイ州) を使用して検出し、ImageJ ソフトウェア (version 1.52a; 国立衛生研究所) で定量化した。抗体を除去した後、すべての膜をマウス抗 β -アクチン抗体 (sc-47778; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.、サンタクルーズ、カルフォルニア州) で再プローブした。 β -アクチンバンドの濃度測定を使用して、サンプルの発現レベルを標準化した。

2.2.14. IL における indican の検出

粉末 IL (2 g) をデシケーターで一晩乾燥させ、20 mL のメタノール:クロロホルム:水 = 12:5:3 (v:v:v) で抽出を行った。5,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を 17 mL のクロロホルム:水 = 7:10 (v:v) とよく混合し、遠心分離を行って上清を回収した。さらに 17 mL のクロロホルム:水 = 7:10 (v:v) を沈殿画分に加え、この抽出操作を 2 回繰り返し、水溶性画分を得た。次いで、Millex®-FG (SLFGR04NL; Merck、ケニルワース、ニュー・ジャージー州) を用いて濾過を行い HPLC で分析を行った。

2.2.15. 統計処理

得られたデータから平均 ± 標準誤差 (SE) を求め、2 つの群間の比較には、student t 検定を使用した。複数の群の比較では、統計的有意性を評価するために、一元配置分散分析に続いて Dunnett 検定または Tukey 検定を使用した。p 値<0.05 を統計的有意であると判定した。

第三節 実験結果

2.3.1. ラットへの IL 長期慢性高用量投与が肺血管に与える影響

5% IL 含有餌を 6 ヶ月間与えたラットでは、通常餌と比較して肺動脈の有意な内膜肥厚が誘発された。AST-120 は IS のような尿毒素の腸管内吸着剤として臨床で用いられており、また芳香族炭化水素も吸着する³⁶⁾。今回の検討で、AST-120 投与は IL による内膜肥厚を完全に抑制した (図 4-1)。投与期間を通じ、IL および AST-120 投与は体重に影響を与えなかった (図 4-2)。PAH 患者において肺動脈の内膜肥厚は主要な形態学的変化であり、病態の進行に伴い肺動脈圧上昇による右室負荷増大により、右室重量の増加が引き起こされるが、今回の実験では IL 投与による右室重量には影響を与えなかった (図 4-3)。5% IL 含有餌を 1 ヶ月間与えたラットでは、肺動脈の内膜肥厚は観察されなかった (図 4-4)。これらの結果より、IL の長期慢性高用量投与がラットの PAH の初期段階としての、肺動脈内側肥厚を誘発することが示された。

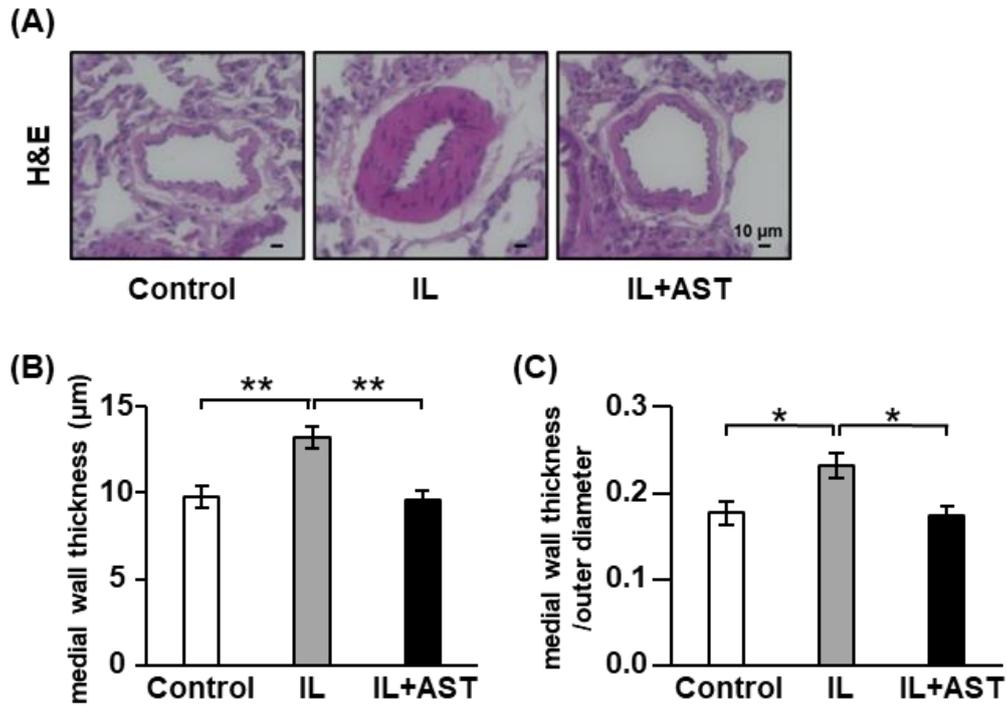


図 4-1. 6 ヶ月 IL 投与ラットにおける肺血管の形態学的変化

(A) 肺動脈の H&E 染色標本 scale bar = 10 μm (B) 肺動脈の内膜厚 (μm)
 (C) 肺動脈の外径に対する内膜厚の比、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、
 Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群は $n = 9$ 、
 IL+AST (5% 藍葉かつ 5% AST-120 含有餌摂餌) 群は $n = 5$

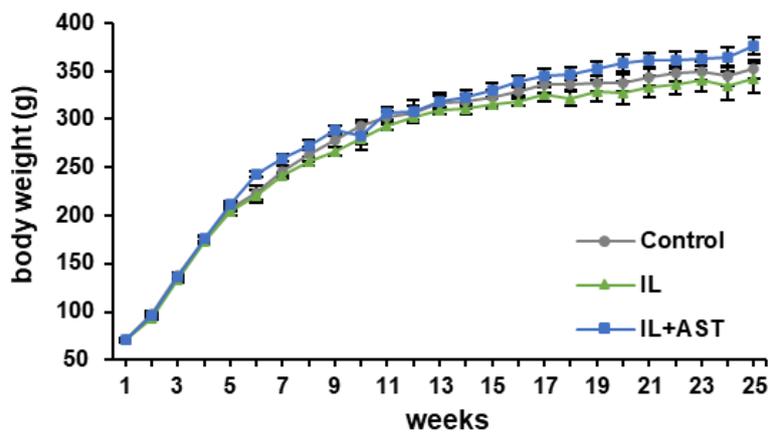


図 4-2. 6 ヶ月 IL 投与ラットの体重変化

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群は $n = 9$ 、
 IL+AST (5% 藍葉かつ 5% AST-120 含有餌摂餌) 群は $n = 5$

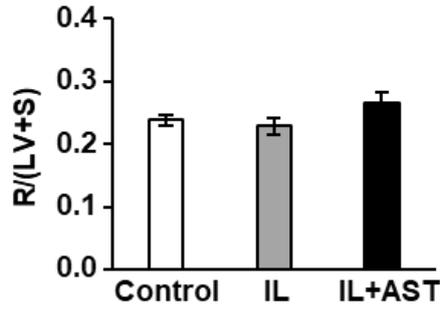


図 4-3.6 ヲ月 IL 投与ラットにおける右心室重量と左心室+中隔重量の比 (RV / (LV+S))

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群は n = 9、
IL+AST (5% 藍葉かつ 5% AST-120 含有餌摂餌) 群は n = 5

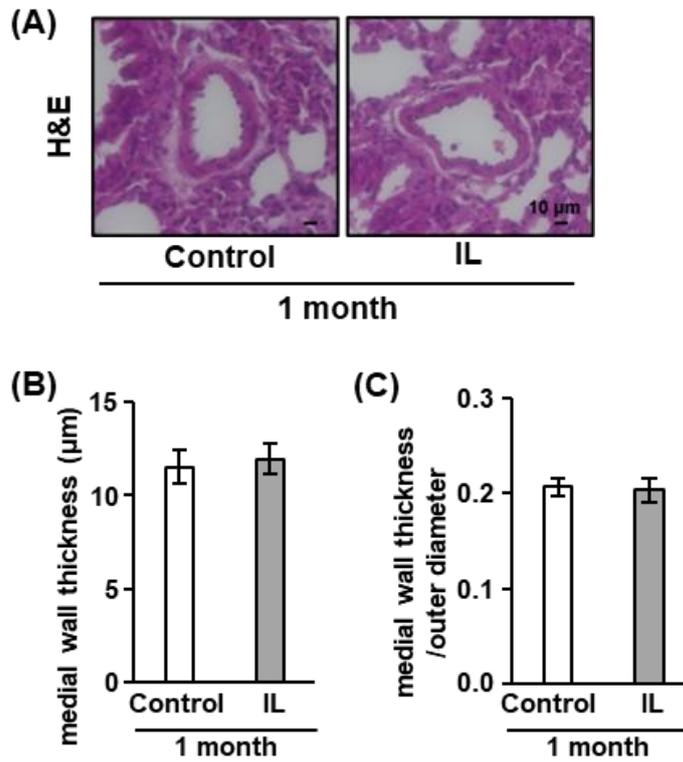


図 4-4.1 ヲ月 IL 投与ラットにおける肺血管の形態学的変化

(A) 肺動脈の H&E 染色標本 scale bar = 10 μm (B) 肺動脈の内膜厚 (μm)

(C) 肺動脈の外径に対する内膜厚の比

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群はそれぞれ n = 3

2.3.2. IL 投与ラットの血清中 indican および IS 濃度測定

投与された IL 含有成分が血中へと吸収されているか確認するため、6 ヶ月間 IL を投与したラットについて解剖時血清中 indican と IS 濃度を HPLC 法を用いて測定した。そうしたところ、IS は腸内細菌の働きにより餌由来のトリプトファンから産生されるため、対照群でも少量観察された。IL 投与ラットでは対照ラットよりも血清 IS 濃度が上昇しており、AST-120 投与によって抑制された（図 5-1）。IL にはさまざまな IS 前駆体（インドール類似体）が含まれており、その主成分は indican である¹²⁾。我々の検討では IL を 6 ヶ月投与したラットの血清 indican 濃度は HPLC 法の検出限界以下であったが、IL 中の indican を検出することには成功した（図 5-2）。これは Hou らによると、ラットに indican を経口投与すると indican は腸管上皮表面から循環血液中に吸収され、血清 indican 濃度が上昇するが、肝臓で急速に IS に代謝され、投与 30 分以内にほとんど IS に変化するためであると考えられる¹⁷⁾。我々の *in vitro* 実験では、リン酸緩衝液に溶解した indican と IS は、AST-120 と 3 時間インキュベートした後に消失した（図 5-3）。AST-120 は活性炭製剤であり、経口投与された AST-120 は循環血液中に吸収されないため、これらの結果と報告は、IL 由来の IS 前駆体である indican が、IL 群のラットの体内に吸収されたという考えを支持し、IL+AST 群では、indican が腸管内で AST-120 に吸着される可能性があることを示唆している。

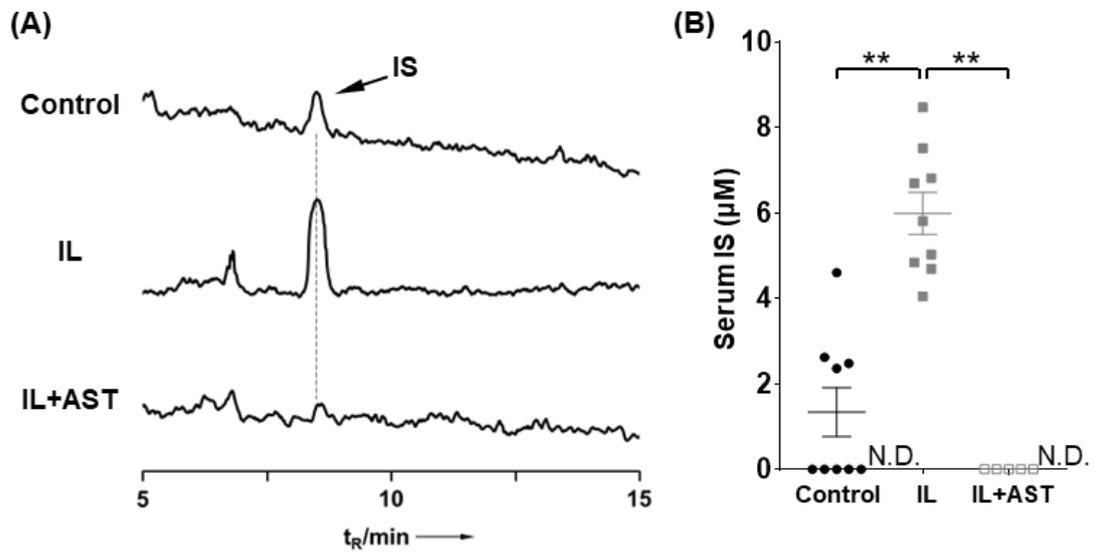


図 5-1.6 カ月 IL 投与ラットの血清中 IS 濃度

(A) HPLC クロマトグラム 黒い矢印は IS のピークを示す。 (B) 血清 IS 濃度 (μM)

2 μM 未満の濃度は未検出 (N.D.) と定義した。** $p < 0.01$

Indican は $t_R = 13 \text{ min}$ の所に出現するがラット血清からは検出されなかった。

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群は $n = 9$ 、

IL+AST (5% 藍葉かつ 5% AST-120 含有餌摂餌) 群は $n = 5$

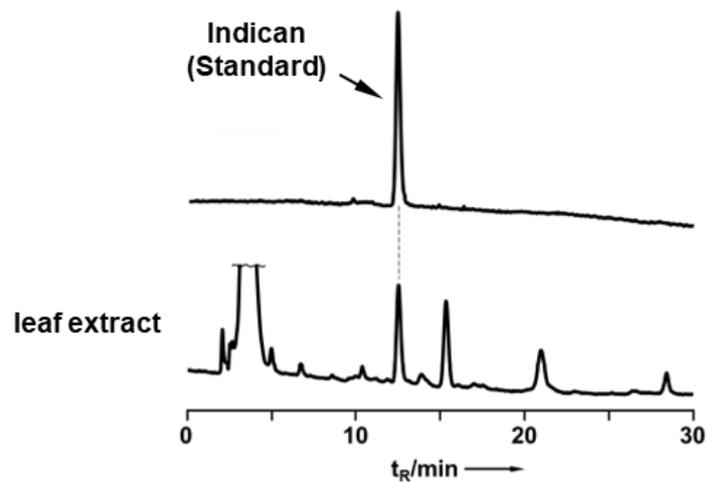


図 5-2. Indican (標準品) と IL 抽出物の HPLC クロマトグラム

黒い矢印は indican のピークを示す。

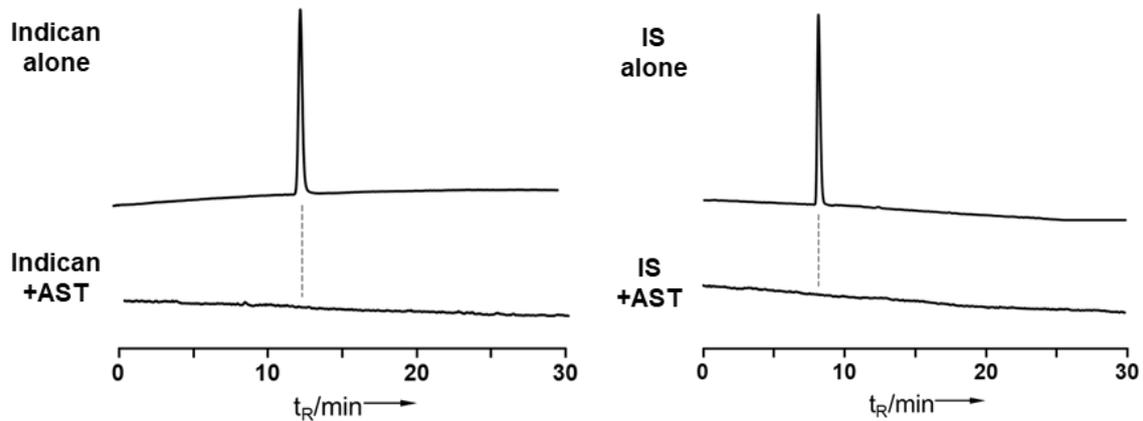


図 5-3. AST-120 に対する Indican および IS の結合性評価

上段は indican および IS のみを添加した溶液のクロマトグラム、下段は上段で測定した溶液に AST-120 を添加後、3 時間後のクロマトグラムを示す。

2.3.3. SMC における indican、IS による細胞増殖作用の検討

中膜肥厚につながる SMC 増殖に対する indican または IS の直接的な影響を MTT アッセイにより検討した。RASMC において、indican は SMC 増殖を誘導せず、高濃度では細胞障害性を示したが、IS は濃度依存的な RASMC 増殖を誘導した (図 6-1)。Indirubin は AhR を介して PAH を引き起こすことが報告されていることから¹⁶⁾、AhR を阻害するのに十分な濃度の AhR 阻害剤である CH223191 を用いて IS による RASMC 増殖に対する AhR の関与を調べた。そうしたところ、IS において AhR 阻害剤の共存による増殖抑制は見られなかったことから、IS は AhR 活性化経路を介さない経路によって平滑筋細胞の増殖を引き起こした可能性が示唆された。AhR

の標的遺伝子である *Cyplal* の mRNA 発現は *indican* によって誘導され、この誘導は AhR 阻害剤である CH223191 によって抑制されたことから CH223191 は細胞に働いていることは確認できた (図 6-2)。AhR アゴニストである IS は *Cyplal* mRNA 発現を僅かに誘導したが、Control に比べて統計的に有意ではなかった (図 6-2)。

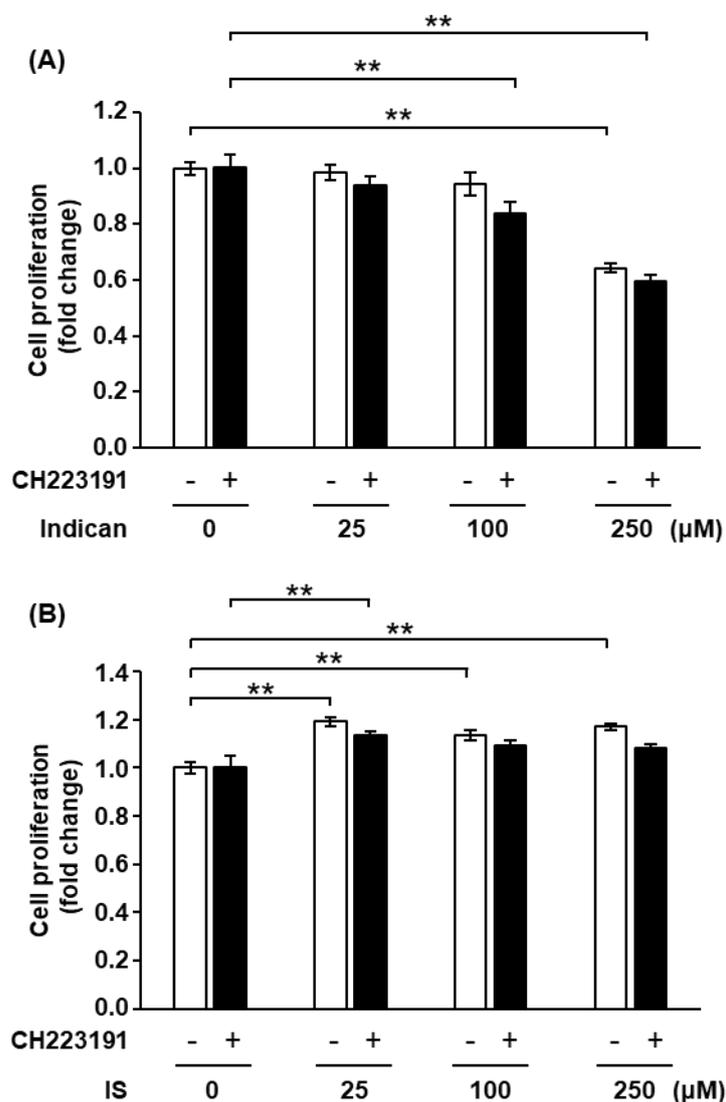


図 6-1. Indican、IS の SMC 増殖に対する影響

(A) Indican による細胞増殖活性評価 (B) IS による細胞増殖活性評価

CH223191: AhR 阻害剤 (10 μM)、**p<0.01、n = 10

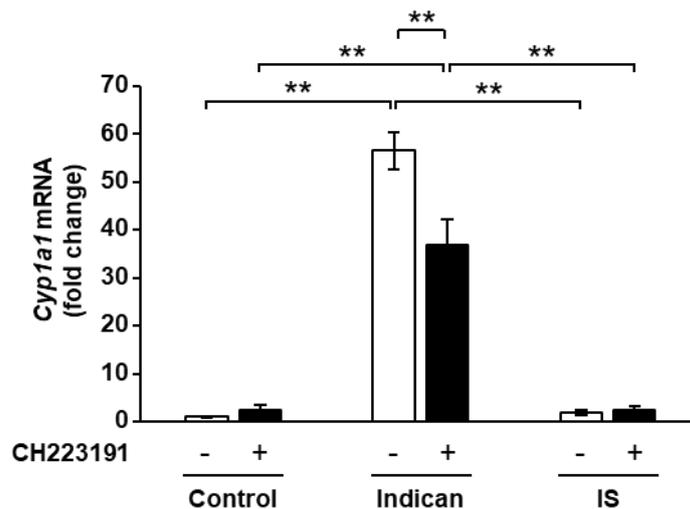


図 6-2. RASMC における *Cyp1a1* mRNA 発現

CH223191: AhR 阻害剤 (10 μ M)、** p <0.01、 n = 10

2.3.4. GEO データベース分析

IL を投与したラットの肺で PAH の病態形成に関わる主要な遺伝子が増減しているか検討するために、まず PAH 患者サンプルまたはラット PAH モデルの肺サンプルの GEO データセットを解析したところ、APAH および IPAH 患者では、それぞれ 163 および 131 の遺伝子が肺組織でアップレギュレーションされていた (#GSE117261)³⁷⁾。またラット PAH モデル (#GSE16624) の肺では、444 の遺伝子がアップレギュレーションされていた³⁸⁾。そして全てに共通する遺伝子として、10 個の遺伝子が抽出された (図 7-1、表 3)。したがって、GEO 解析により、これらの 10 個の遺伝子が患者とラットの両方で PAH の重要な調節因子であることが示

された。そこで対照群および IL 投与群のラットの肺において、これら 10 遺伝子の mRNA 発現レベルを調べたところ、CD31 mRNA 発現により正規化された ET-1 (*Edn1*) mRNA 発現レベルのみが上昇することを確認した (図 7-2)。これらの結果は、EC 由来の ET-1 mRNA 発現が PAH の重要な調節因子であり、6 ヶ月間の IL 投与ラットの肺においても EC における ET-1 mRNA 発現が誘導されたことを示唆している。

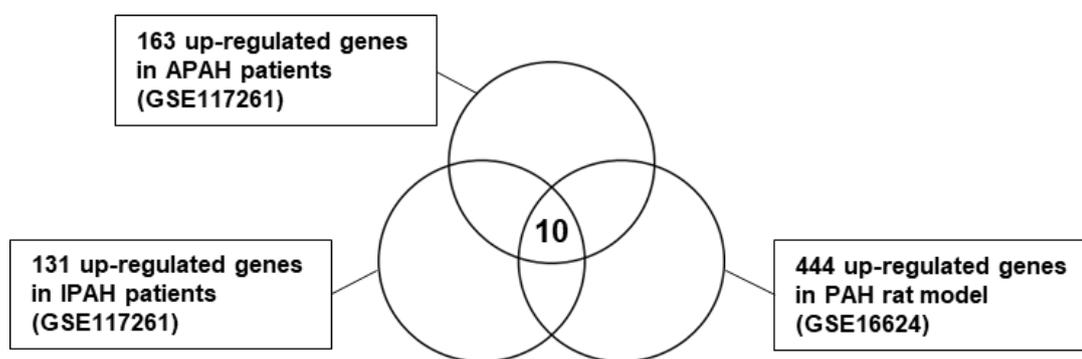


図 7-1. GEO 解析結果

false discovery rate (FDR) <0.1、 $p < 0.05$ 、 $\log_2FC > 0.6$

表 3. GEO 解析で共通して上昇した 10 個の遺伝子の詳細

Gene Symbol (Rat)	Description
<i>Edn1</i>	endothelin 1
<i>Nt5e</i>	5' nucleotidase, ecto
<i>Rgs1</i>	regulator of G-protein signaling 1
<i>Thy1</i>	Thy-1 cell surface antigen
<i>Aspn</i>	asporin
<i>Cpa3</i>	carboxypeptidase A3
<i>Cpe</i>	carboxypeptidase E
<i>Frzb</i>	frizzled-related protein
<i>Gem</i>	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
<i>Ltbp2</i>	latent transforming growth factor beta binding protein 2

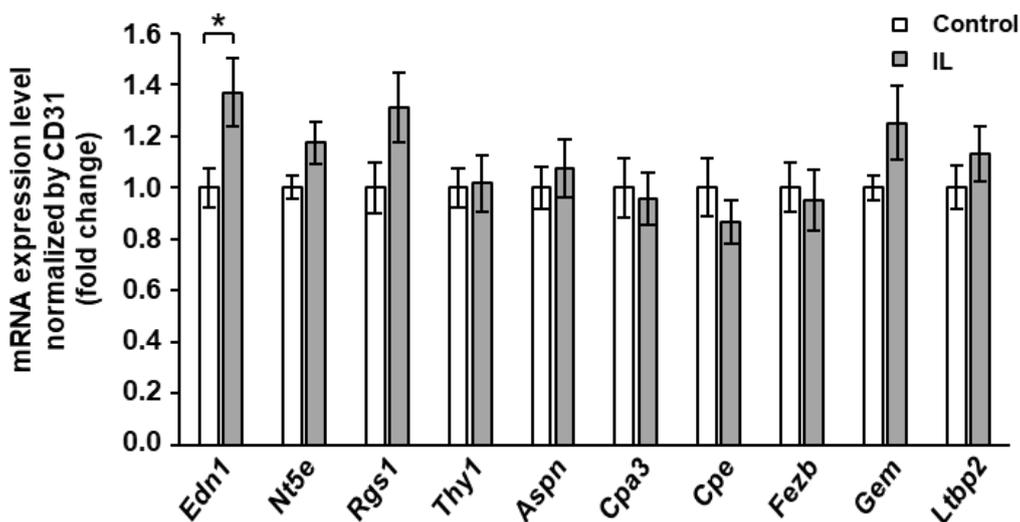


図 7-2. IL 投与 6 ヶ月ラット肺血管内皮における抽出された 10 遺伝子の mRNA 発現

各 mRNA 発現レベルは、CD31 mRNA 発現レベルで正規化した。

* $p < 0.05$, $n = 9$

2.3.5. IL 投与ラットの肺組織における EC 由来 ET-1 発現レベルの検討

図 7-1 および表 3 に示すように、EC 由来の ET-1 は PAH の発症と進行に重要な調節因子であり、実際に臨床上でもエンドセリン受容体拮抗薬は PAH 治療において広く使用されている。蛍光免疫染色により、肺動脈の CD31 陽性領域 (EC 層) における ET-1 タンパク質発現レベルは、IL を 1 ヶ月間投与したラットで有意に誘導されたが (図 8-1)、中膜肥厚は観察されなかった (図 4-4)。一方 IL を 6 ヶ月間投与したラットでは、有意な中膜肥厚が観察され (図 4-1)、CD31 mRNA 発現で正規化した ET-1 mRNA 発現レベル (ET-1 / CD31) は、2 群比較の Student-t 検定によると、対照群と比較して IL 群で有意に誘導された (図 7-2)。図 7-2 の 2 群間での評価では有意差が認められたが、IL+AST 群を含めた 3 群間で比較するため、一元配置分散分析とそれに続く多重比較の Tukey 検定を行うと、6 ヶ月間の IL 投与は ET-1 / CD31 mRNA 発現を誘導する傾向がある ($p = 0.0726$) という結果となった (図 8-2)。これは、Tukey 検定では多重比較の補正を行っているために、2 群間の検定に比べて p 値が上昇したと考えた。通常、mRNA 発現レベルは β -actin mRNA レベルで正規化するが、肺組織における EC 由来の mRNA 発現レベルを調べるために、ET-1 mRNA レベルを CD31 mRNA レベルで正規化した。ラットモデルの 3 群間で肺サンプルの CD31 mRNA 発現レベルに有意差はなかった (図 8-4(A))。さらに 2 つの ET-1 受容体である ET_A と ET_B の mRNA 発現レベルは、6 ヶ月間の IL 投与によ

て変化しなかった (図 8-4(B)、(C))。同様に ET-1 タンパク質発現レベルを蛍光免疫分析で評価したところ、Control に比べて IL で上昇する傾向が見られるが、3 群間に統計的な有意差は見られなかった (図 8-3)。1 ヶ月 IL 投与で肺 EC における ET-1 のタンパク質発現が上昇し、6 ヶ月投与で上昇傾向という結果は、初期段階での IL 由来成分による EC 由来 ET-1 誘導が中膜肥厚に重要な役割を果たしていることを示唆している。

IL 投与により肺における *Cyp11a1* mRNA 発現が誘導されたことから (図 8-4(D))、indican や IS などの IL 由来のインドール骨格化合物が循環血液中に吸収され、肺動脈に影響を与えたことが示唆された。しかし、AST-120 はこの効果を抑制しなかったことから、AST-120 は中膜肥厚に影響を与えない IL 由来の AhR 活性化因子 (indican や IS を除く) を捕捉できなかった可能性が示唆された。

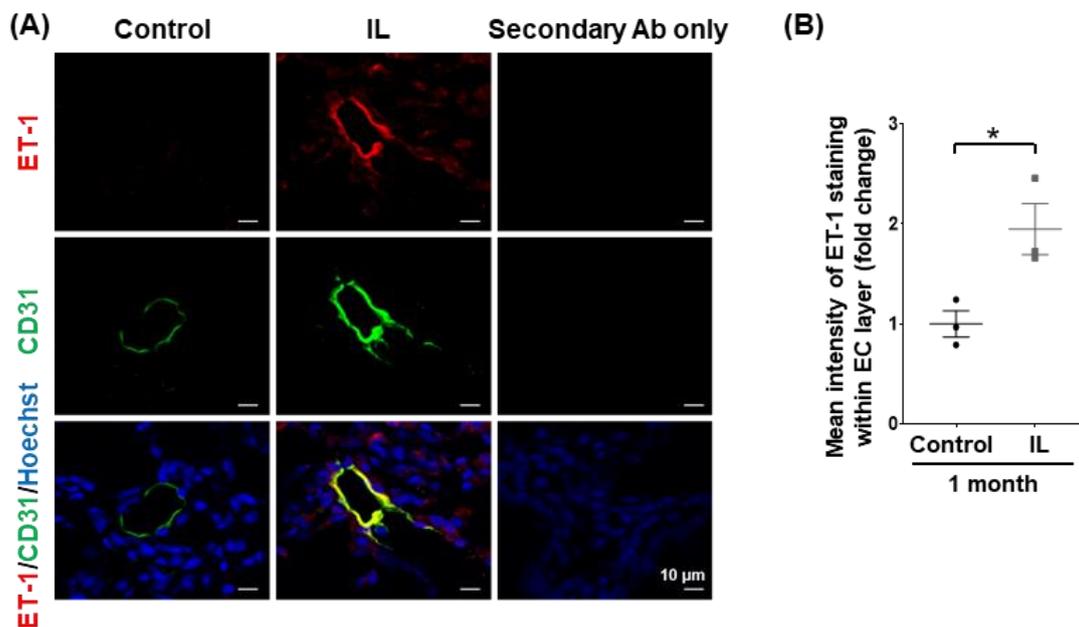


図 8-1.1 カ月 IL 投与ラット肺組織における EC 由来 ET-1 発現

(A) 1 カ月 IL 投与ラット肺組織切片の ET-1/CD31 二重免疫染色 scale bar = 10 μm

(B) CD31 陽性領域 (EC 層) 内の ET-1 染色の平均強度、* $p < 0.05$

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群はそれぞれ $n = 3$

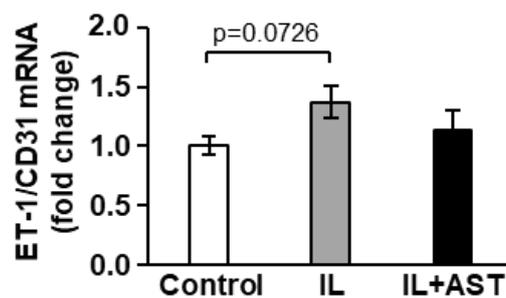


図 8-2.6 カ月 IL 投与ラット肺組織における ET-1 mRNA 発現

mRNA 発現レベルは、CD31 mRNA 発現レベルで正規化した。

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群は $n = 9$ 、

IL+AST (5% 藍葉かつ 5% AST-120 含有餌摂餌) 群は $n = 5$

図 6-2 では対照群と IL 群の 2 群間での比較を行い、図 7-2 では IL+AST 群を加えた 3 群間での比較を行った。

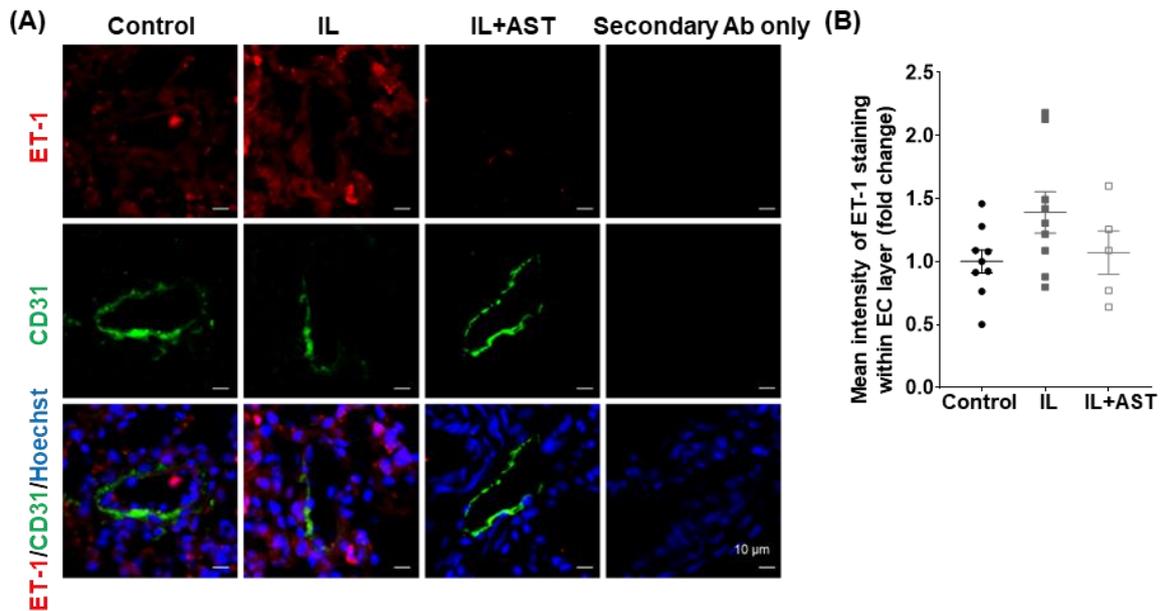


図 8-3.6 ヲ月 IL 投与ラツト肺組織における EC 由来 ET-1 発現

(A) 6 ヲ月 IL 投与ラツト肺組織切片の ET-1/CD31 二重免疫染色 scale bar = 10 μm

(B) CD31 陽性領域 (EC 層) 内の ET-1 染色の平均強度

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群は n = 9、

IL+AST (5% 藍葉かつ 5% AST-120 含有餌摂餌) 群は n = 5

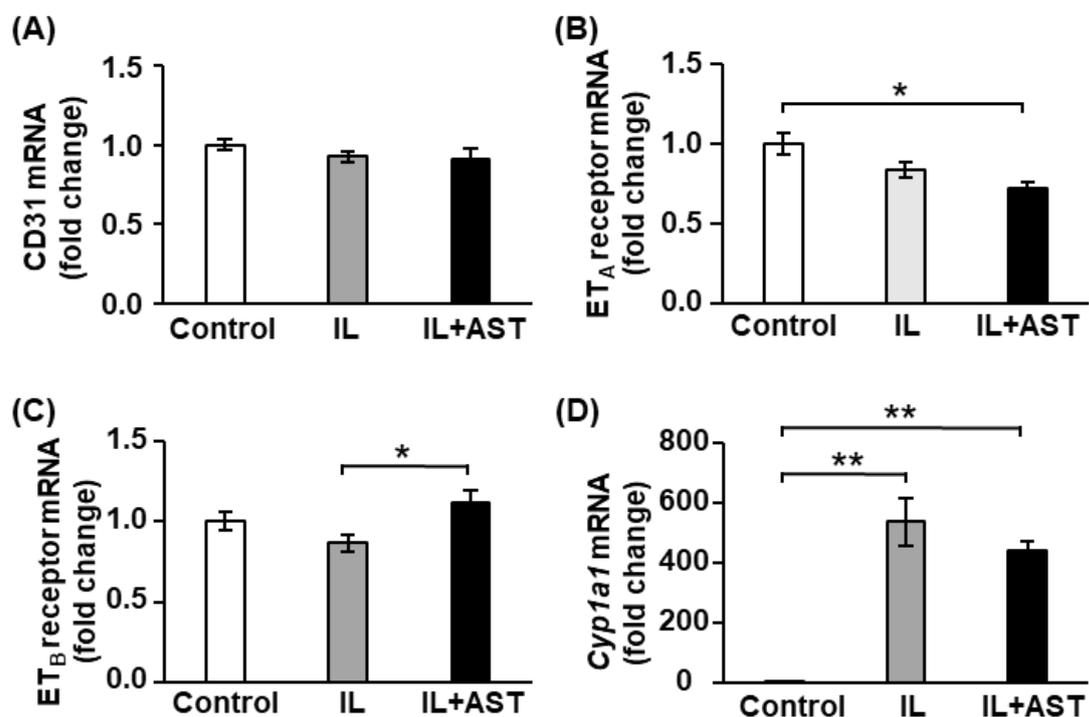


図 8-4.6 カ月 IL 投与ラット肺組織における遺伝子発現

- (A) CD31 mRNA 発現 (B) ET_A 受容体 mRNA 発現
 (C) ET_B 受容体 mRNA 発現 (D) *CYP1a1* mRNA 発現

*p<0.05、**p<0.01

Control (通常餌摂餌) 群と IL (5% 藍葉含有餌摂餌) 群は n = 9、
 IL+AST (5% 藍葉かつ 5% AST-120 含有餌摂餌) 群は n = 5

2.3.6. EC における indican、IS による ET-1 mRNA 発現作用の機序の検討

IL 由来の indican または代謝物 IS が EC における ET-1 誘導に寄与するか培養細胞を用いて検討した。Indican と IS はともに HUVEC において ET-1 mRNA 発現を誘導したが、AhR 阻害剤 CH223191 はこの効果を抑制しなかった (図 9-1(A))。ET_A 受容体は EC ではほとんど発現しなかったが (data not shown)、ET_B 受容体 mRNA 発現

は indican と IS により誘導され、CH223191 はこの効果を抑制しなかった (図 9-1(B))。CYP1A1 mRNA 発現は indican によって誘導され、その効果は CH223191 によって明らかに抑制された (図 9-1(C))。同様に IS は CYP1A1 mRNA 発現を誘導し、CH223191 はこの効果を抑制した (図 9-1(C))。これらの結果は、indican と IS が AhR 非依存経路を介して ET-1 mRNA 発現を誘導したことを示唆している。いくつかの報告では、低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α) が ET-1 の発現を制御することが報告されているが³⁹⁾、indican と IS は HIF-1 α タンパク質の発現を誘導しないことが示された (図 9-2)。この結果は、IS が HIF-1 α の発現を誘導しないという、別の報告と一致している⁴⁰⁾。次に、ET-1 は ROS によって発現が上昇することが報告されていることから⁴¹⁾⁴²⁾、indican、IS による活性酸素種 (ROS) 産生の影響を検討した。DCFH-DA を用いた HUVEC において indican、IS、および過酸化水素 (陽性対照) は ROS 産生を誘導し、ROS 阻害剤である NAC はそれらの影響を完全に抑制した (図 9-3)。さらに NAC は indican および IS 誘導性の ET-1 mRNA 発現を抑制した (図 9-4)。これらの結果から、indican と IS 共に EC で ROS 産生を介して ET-1 発現を誘導することが示唆された。我々の知る限り、これは indican が EC における ROS 産生を介して ET-1 発現を誘導し、肺動脈リモデリングに寄与することを示した最初の研究である。

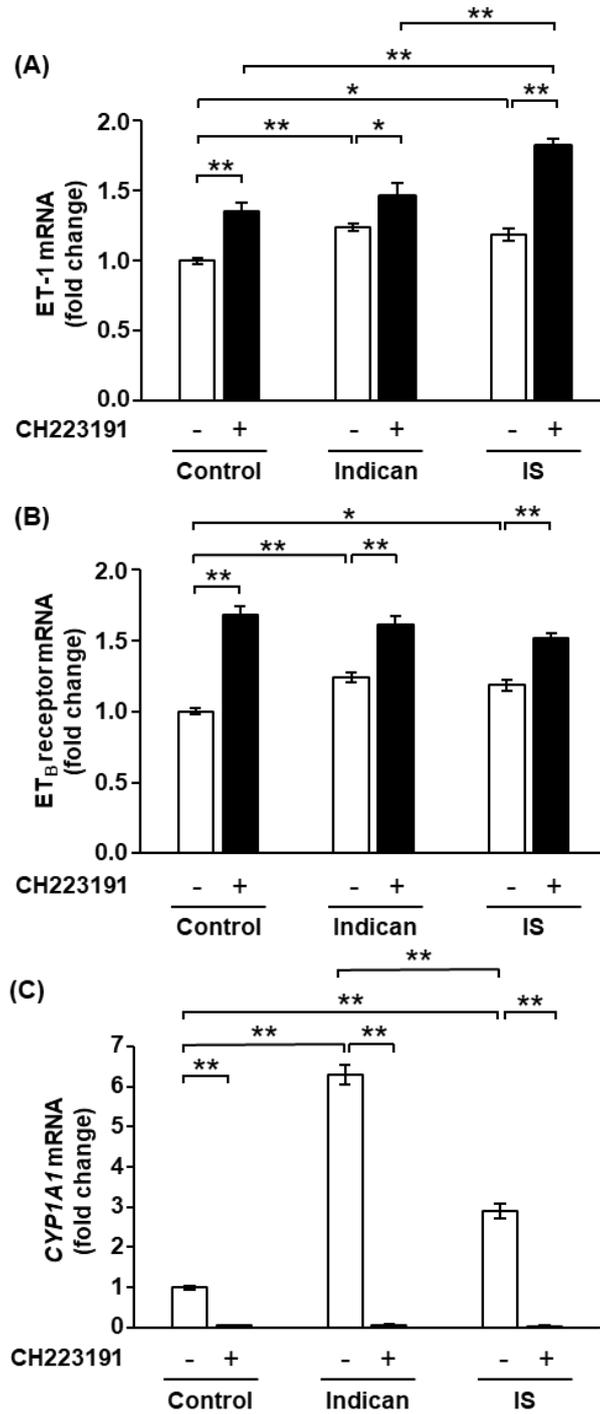


図 9-1. Indican、IS による各遺伝子発現変化に対する AhR の影響

(A) ET-1 mRNA 発現 (B) ET_B 受容体 mRNA 発現 (C) CYP1A1 mRNA 発現

CH223191: AhR 阻害剤 (10 μM)、*p<0.05、**p<0.01

CH223191 非添加の 3 群は n = 15、CH223191 添加の 3 群は n = 10

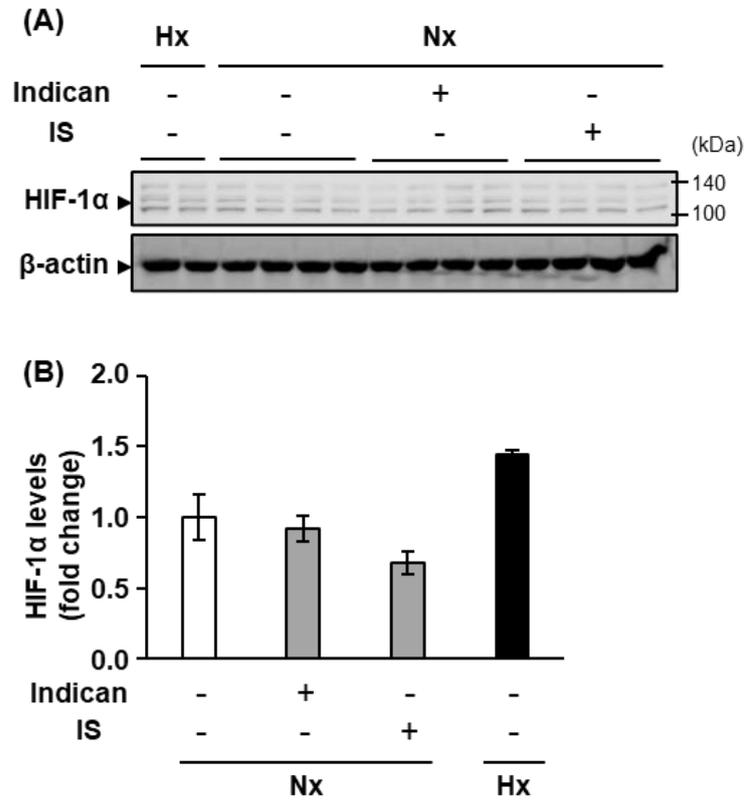


図 9-2. Indican、IS による HIF-1 α タンパク質発現変化

(A) ウェスタンブロッティング画像 (B) 定量解析

Nx: normoxia (21% O₂)、Hx: hypoxia (1% O₂)

4 時間の Hx 刺激を HIF-1 α 誘導の陽性対照として使用した (n = 2)

Nx 条件で行った 3 群間で比較検定を行った (n = 4)。

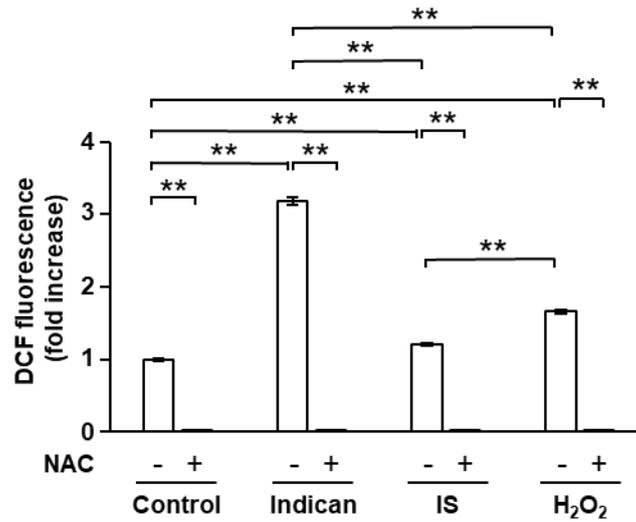


図 9-3. Indican、IS の ROS 生成に対する影響

NAC: *N*-acetyl-L-cysteine (10 μ M)、** $p < 0.01$ 、 $n = 8$

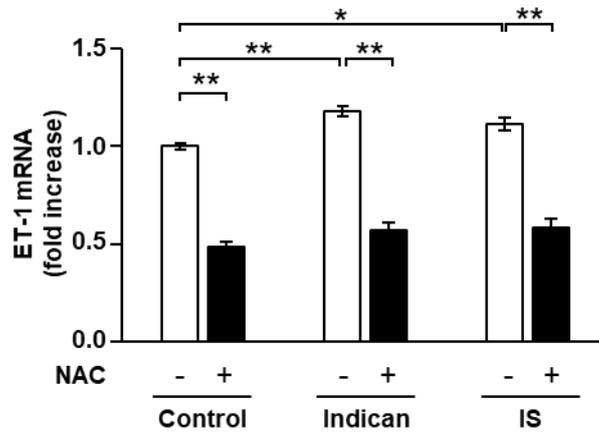


図 9-4. Indican、IS による ET-1 mRNA 発現変化に対する ROS の影響

NAC: *N*-acetyl-L-cysteine (10 μ M)、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

NAC 非添加の 3 群は $n = 25$ 、NAC 添加の 3 群は $n = 10$

2.3.7. SMC における indican、IS によるエンドセリン受容体発現への影響

EC から産生される ET-1 は VSMC に作用し、細胞増殖や血管収縮を引き起こす。そこで、SMC に発現している ET-1 受容体である ET_A 受容体および ET_B 受容体の発現に対する indican、IS の作用を RASMC を用いて確認したところ、indican および IS 刺激によりいずれの受容体の mRNA 発現も変化はなかった (図 10)。これは、6 ヶ月間 IL 投与ラットの肺組織において、エンドセリン受容体の mRNA 発現が変化しなかったことと一致する結果であった (図 8-4(B)、(C))。

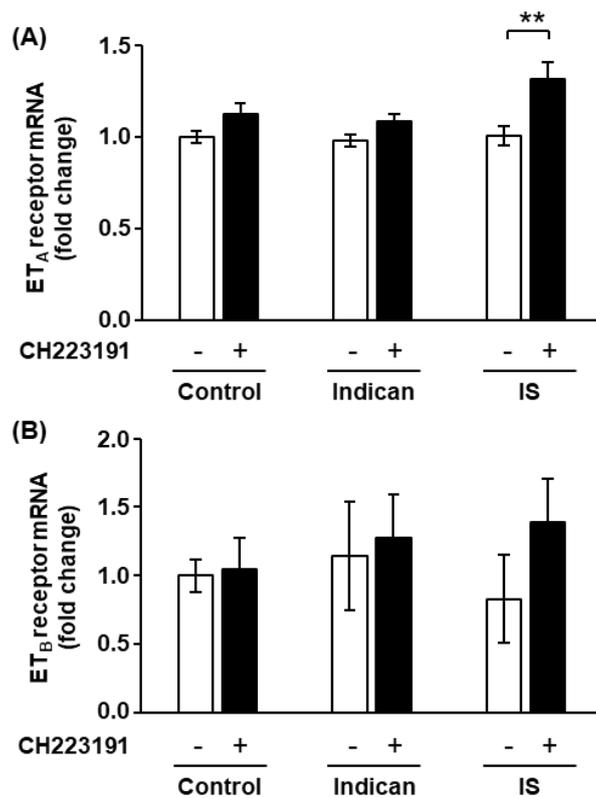


図 10. RASMC における indican、IS によるエンドセリン受容体 mRNA 発現

(A) ET_A 受容体 mRNA

CH223191 添加の Control 群、Indican 群は n = 9、それ以外の群は全て n = 10

(B) ET_B 受容体 mRNA

CH223191 添加の Indican 群は n = 9、それ以外の群は全て n = 10

CH223191: AhR 阻害剤 (10 μM)、**p < 0.01

第四節 考察

本研究では、青黛の原料である IL に焦点を当て、青黛誘発性 PAH の発症機序を検討した。しかし、本研究ではラットにおける IL の高用量（通常餌に 5% IL 含有）かつ慢性的（6 ヶ月）な投与が、EC 由来の ET-1 誘導後に右室肥大を伴わない肺血管中膜肥厚を誘発すること、そして ET-1 が IL による PAH 発症の鍵分子であることを見出した（図 4-1、表 3）。さらに IL 中の主要成分である indican の代謝物である IS は AhR を介することなく、細胞増殖を引き起こすことも明らかにした。EC 由来の ET-1 誘導は、中膜肥厚につながる SMC の移動と増殖を引き起こすことが知られている⁴³⁾。今回の検討では、IL 含有成分は PAH を緩やかに誘導する可能性が示唆されたが、これは ET-1 による血管リモデリングの形成には時間がかかるため、早期段階での ET-1 誘導が非常に重要であると考えた。実際に青黛で PAH を発症した UC 患者は、寛解期を持続させるために、青黛を 1 回 3 g、1 日 2 回、約 13 ヶ月間連日、高用量服用していることが報告されている⁷⁾。

ET-1 は PAH の重要な制御因子であり、バイオインフォマティクス解析において患者とラットの両方で ET-1 が PAH の重要な制御因子であることを確認した（図 7）。したがって、IL 投与が EC で ET-1 発現を誘発し、それに続いて肺動脈の内膜肥厚が起こったことが、肺動脈リモデリングの合理的な原因であると考えられる。ま

た、IL の主要成分である indican とその最終代謝物 IS は、EC で ROS 産生を介して ET-1 の発現を誘導し、その発現誘導は AhR 非依存的および HIF-1 α 非依存的経路であることを明らかにした (図 9)。いくつかの報告では、ROS の増加が ET-1 誘導に寄与することを示しており⁴⁴⁾、これは我々の結果と一致している。さらに、いくつかの論文では、IS が NADPH オキシダーゼ (NOX) の活性化を介して ROS 産生を誘導することがすでに示されている⁴⁵⁾⁴⁶⁾。Indican においても類似の機序で ROS 産生を促進したと推定しているが、indican がどのようにして ROS 産生を高めるかは分かっていないため、今後詳細な解明が必要と考えている。

さらに、PAH ラットモデルの肺動脈において NOX4 の発現が上昇していることが報告されており、NOX と PAH の関連性が示唆されている⁴⁷⁾。したがって、indican と IS による NOX の活性化が ET-1 発現上昇作用に関与しているという可能性を考えている。一方、HUVEC を用いた検討では、AhR 阻害剤である CH223191 は ET-1 および ET_B 受容体の mRNA 発現レベルを増加させた (図 9-1)。用いた CH223191 濃度は in vitro 研究において多くの論文⁴⁸⁾⁴⁹⁾で用いられている 10 μ M であり、この用量は高すぎるものではない。図 9-1(C)に示すように、10 μ M の CH223191 は確かに in vitro 研究で AhR 阻害に伴う CYP1A1 mRNA 発現抑制効果を示したが、CH223191 が ET-1 および ET_B 受容体の mRNA 発現を AhR 依存的に誘導したのか、それとも非依存的に誘導したのか今回の検討では結論づけることがで

きなかった。

ECから産生される ET-1 は VSMC の ET_A 受容体および ET_B 受容体に作用して SMC 増殖および血管収縮を引き起こす。IL 投与ラットの肺組織全体において、ET_A 受容体および ET_B 受容体の mRNA 発現レベルは変化しなかった (図 8-4)。RASMC を用いた検討においても indican および IS 刺激によりいずれの受容体も変化はなかった (図 10)。このことから IL 含有成分は VSMC のエンドセリン受容体の発現には影響を与えず、リガンドである ET-1 の産生レベルの上昇により、肺血管肥厚を惹起していると考えられる。IL を投与したラットの血清中 indican 濃度は使用した HPLC 法の検出限界以下であったが、IL 中に存在する indican は検出することに成功した (図 5-2)。以前の報告では、indicin のラットへの単回経口投与により血清 indicin 濃度が上昇し、投与後 4 時間程度で indicin が IS に変換され、検出限界を下回ることで報告されている¹⁷⁾。今回の実験でも IL を投与したラット血清中の IS 濃度が Control 群より上昇していたことから、indicin は IL 摂餌直後において血中に取り込まれて IS に代謝されていると推測される。そして、IS が肺動脈に到達して生理作用を発揮していることが示唆される。一方で Indican は HUVEC において刺激時間 30 分という短時間刺激において陽性対照として用いた過酸化水素より高い ROS 産生能を有する点から (図 9-3)、短時間でも血中に存在することで ROS 生成などの作用を介して ET-1 生成促進に関与していると思われる。Indican と IS は AST-120 に

捕捉され、ラットへの IL 投与によって誘発された血清 IS レベルと肺動脈の内膜肥厚が AST-120 投与により抑制されることを発見した (図 4-1、5-1)。さらに、特異的 AhR 阻害剤^{50) 51)}を使用した *in vitro* 研究において、indican には SMC 増殖作用はないが、IS は AhR 非依存メカニズムを通じて SMC 増殖を直接誘発する能力があることが示された (図 6)。本研究では IL 中に肺血管肥厚形成作用を示す成分が含まれていることを明らかにし、その成分の 1 つとして indican とその代謝物である IS を見出した最初の報告である。しかし、この効果は我々の実験では軽度であったこと、また AST-120 を IL と同時に摂取させることでは血管肥厚が抑制されたことから、IL 含有成分は PAH を惹起するが、青黛に含まれる他の成分も PAH 発症に寄与していることが予想される。また Masaki らは、青黛に存在する indirubin が AhR 活性化を介して PAH を誘発することを報告している¹⁶⁾。平出らは、マウスモデルにおいて、青黛が AhR 依存性経路を介して右室肥大を伴う PAH を誘発することを報告しており⁵²⁾、青黛に起因する PAH の発症機序は多成分、多経路が関与している可能性があり、さらなる検討が必要と考える。

第三章 総括

本研究を通して、IL の長期慢性投与および高用量投与が、右室肥大を伴わない肺血管中膜肥厚を誘導することを明らかにした。その機序に IL 含有成分 indican および代謝物 IS による EC における ROS 産生を介した ET-1 発現制御が関与しており、また indican の代謝物である IS は SMC を直接増殖させることが示された (図 11)。Indican、IS が ROS を産生する機序は解明できておらず、今後さらなる検討を進める必要がある。また、青黛服用による PAH の発症の原因成分として indigo の構造異性体である indirubin の関与が注目されているが、今回新たに indican とその代謝物 IS が関与している可能性が示唆された。

青黛服用による有害事象を調査した日本の全国調査において、青黛を服用している UC 患者 877 人中、PAH を発症した例は 11 例である⁵⁾。別の青黛服用に関する研究では、青黛を 2 g/日、1 年間服用した UC 患者 33 人における有害事象を調査したところ、PAH を発症した患者は確認されなかったが⁵³⁾、この調査では

(1) 妊娠中または授乳中の女性、(2) 心身症、肝臓病または腎臓病の患者、および (3) 血小板減少症または抗血栓療法を受けている患者は除外されていた。IS は慢性腎不全時の尿毒症物質の一つであり、慢性腎臓病 (CKD) 患者において PAH の有病率が高く、CKD 患者では ET-1 や Ang II などのレベルが上昇していることが

報告されている⁵⁴⁾。しかし、PAHと尿毒症毒素ISとの関係は報告がない。PAHを
発症したUC患者の背景を調査し、青黛の服用と腎機能の低下などの患者背景が
PAHを引き起こす要因となる可能性などを今後検討する必要がある。

本研究はILの長期慢性投与による肺血管への影響を確認した初めての報告であ
り、ILの高用量かつ長期慢性投与は軽度のPAHを誘導する可能性がある。

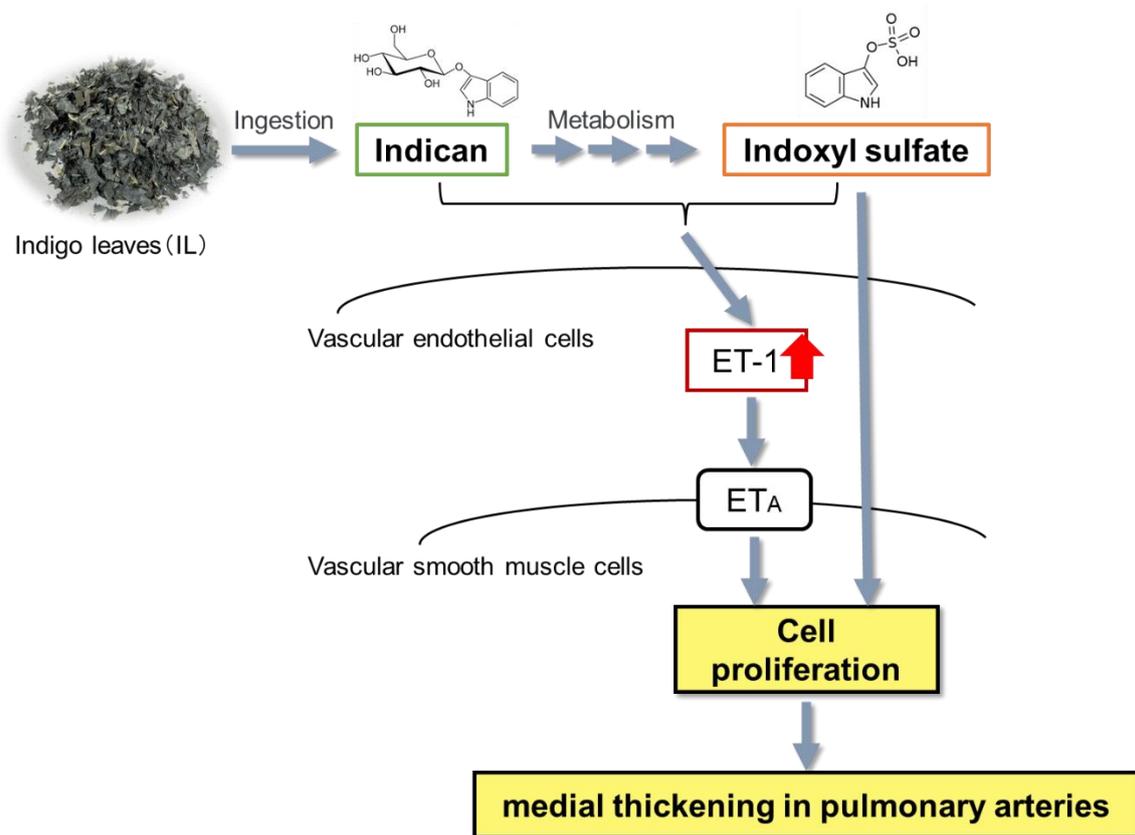


図 11. 本研究で解明した IL 含有成分による肺血管肥厚形成作用機序

第四章 参考文献

- 1) Kawai S, Iijima H, Shinzaki S, Hiyama S, Yamaguchi T, Araki M, Iwatani S, Shiraishi E, Mukai A, Inoue T, Hayashi Y, Tsujii M, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Takehara T. Indigo Naturalis ameliorates murine dextran sodium sulfate-induced colitis via aryl hydrocarbon receptor activation. *J Gastroenterol.* **2017**, 52: 904-919.
- 2) Zhang Q, Xie J, Li G, Wang F, Lin J, Yang M, Du A, Zhang D, Han L. Psoriasis treatment using Indigo Naturalis: Progress and strategy. *J Ethnopharmacol.* **2022**; 297: 115522.
- 3) Naganuma M, Sugimoto S, Mitsuyama K, Kobayashi T, Yoshimura N, Ohi H, Tanaka S, Andoh A, Ohmiya N, Saigusa K, Yamamoto T, Morohoshi Y, Ichikawa H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe K, Mizuno S, Suda W, Hattori M, Fukuda S, Hirayama A, Abe T, Watanabe M, Hibi T, Suzuki Y, Kanai T; INDIGO Study Group. Efficacy of Indigo Naturalis in a Multicenter Randomized Controlled Trial of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology.* **2018**, 154: 935-947.
- 4) Naganuma M, Sugimoto S, Fukuda T, Mitsuyama K, Kobayashi T, Yoshimura N, Ohi H, Tanaka S, Andoh A, Ohmiya N, Saigusa K, Yamamoto T, Morohoshi Y, Ichikawa H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe K, Mizuno S, Abe T, Suzuki Y, Kanai T; INDIGO

- Study Group. Indigo naturalis is effective even in treatment-refractory patients with ulcerative colitis: a post hoc analysis from the INDIGO study. *J Gastroenterol.* **2020**, 55: 169-180.
- 5) Naganuma M, Sugimoto S, Suzuki H, Matsuno Y, Araki T, Shimizu H, Hayashi R, Fukuda T, Nakamoto N, Iijima H, Nakamura S, Kataoka M, Tamura Y, Tatsumi K, Hibi T, Suzuki Y, Kanai T; INDIGO survey Group. Adverse events in patients with ulcerative colitis treated with indigo naturalis: a Japanese nationwide survey. *J Gastroenterol.* **2019**, 54: 891-896.
- 6) Nishio M, Hirooka K, Doi Y. Chinese herbal drug natural indigo may cause pulmonary artery hypertension. *Eur Heart J.* **2016**, 37: 1992.
- 7) 厚生労働省 平成 28 年 12 月 27 日 薬生監麻発 1227 第 9 号 生食監発 1227 第 8 号.
- 8) Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* **2019**, 53: 1801913.
- 9) Montani D, Günther S, Dorfmueller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, Jaïs X, Savale L, Artaud-Macari E, Price LC, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis.* **2013**, 8: 97.

- 10) Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* **2004**, 43: 13S-24S.
- 11) Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* **2004**, 351: 1655-65.
- 12) Minami Y, Nishimura O, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Matsubara H. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. *Plant Cell Physiol.* **2000**, 41: 218-25.
- 13) 牛田智、川崎充代「インジカンを保持した状態での藍の葉の保存とその染色への利用」日本家政学会誌, **2001**, 52: 75-79.
- 14) 牛田智, 谷上由香, 太田真祈「藍の生葉染めの過程におけるインジルビン生成の条件」日本家政学会誌, **1998**, 49: 389-395.
- 15) Xiao HT, Peng J, Hu DD, Lin CY, Du B, Tsang SW, Lin ZS, Zhang XJ, Lueng FP, Han QB, Bian ZX. Qing-dai powder promotes recovery of colitis by inhibiting inflammatory responses of colonic macrophages in dextran sulfate sodium-treated mice. *Chin Med.* **2015**, 10: 29.
- 16) Masaki T, Okazawa M, Asano R, Inagaki T, Ishibashi T, Yamagishi A, Umeki-Mizushima S, Nishimura M, Manabe Y, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Tsuchimochi H, Pearson JT,

- Kumanogoh A, Sakata Y, Ogo T, Kishimoto T, Nakaoka Y. Aryl hydrocarbon receptor is essential for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2021**, 118: e2023899118.
- 17) Hou YC, Tsai SY, Chan SL, Yang SY, Chao PD. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, is biotransformed from indoxyl-beta-D-glucoside (indican) in rats. *Toxicon*. **2008**, 52: 440-4.
- 18) Garg L, Akbar G, Agrawal S, Agarwal M, Khaddour L, Handa R, Garg A, Shah M, Patel B, Dalal BD. Drug-induced pulmonary arterial hypertension: a review. *Heart Fail Rev*. **2017**, 22: 289-297.
- 19) Humbert M, Sitbon O, Guignabert C, Savale L, Boucly A, Gallant-Dewavrin M, McLaughlin V, Hoeper MM, Weatherald J. Treatment of pulmonary arterial hypertension: recent progress and a look to the future. *Lancet Respir Med*. **2023**, 11: 804-819.
- 20) Ruopp NF, Cockrill BA. Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: A Review. *JAMA*. **2022**, 327: 1379-1391.
- 21) Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists for the treatment of pulmonary artery hypertension. *Life Sci*. **2012**, 91: 517-21.
- 22) Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki

- T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* **1993**, 328: 1732-1739.
- 23) Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest.* **2001**, 120: 1562-1569.
- 24) Jankowich M, Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events. *Trends Cardiovasc Med.* **2020**, 30: 1-8.
- 25) Yang Z, Krasnici N, Lüscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ET_A and ET_B receptor blockade. *Circulation.* **1999**, 100: 5-8.
- 26) McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, Barst RJ, Black C, Galiè N, Rainisio M, Simonneau G, Rubin LJ. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* **2005**, 25: 244-9.
- 27) Lano G, Burtey S, Sallée M. Indoxyl Sulfate, a Uremic Endotheliotoxin. *Toxins (Basel).* **2020**, 12: 229.
- 28) Shimizu H, Bolati D, Higashiyama Y, Nishijima F, Shimizu K, Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of MCP-1 via production of ROS and activation of NF- κ B, p53, ERK, and JNK in proximal tubular cells. *Life Sci.* **2012**, 90: 525-30.

- 29) Shimizu H, Hirose Y, Nishijima F, Tsubakihara Y, Miyazaki H. ROS and PDGF-beta [corrected] receptors are critically involved in indoxyl sulfate actions that promote vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2009**, 297: C389-96.
- 30) Koizumi M, Tatebe J, Watanabe I, Yamazaki J, Ikeda T, Morita T. Aryl hydrocarbon receptor mediates indoxyl sulfate-induced cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.* **2014**, 21: 904-16.
- 31) Matsumoto T, Takayanagi K, Kojima M, Taguchi K, Kobayashi T. Indoxyl sulfate enhances endothelin-1-induced contraction via impairment of NO/cGMP signaling in rat aorta. *Pflugers Arch.* **2021**, 473: 1247-1259.
- 32) Tsuji H, Kondo M, Odani W, Takino T, Takeda R, Sakai T. Treatment with indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour) improves serum lipid profiles in Wistar rats fed a high-fat diet. *J Med Invest.* **2020**, 67: 158-162.
- 33) Adams KL, Riparini G, Banerjee P, Breur M, Bugiani M, Gallo V. Endothelin-1 signaling maintains glial progenitor proliferation in the postnatal subventricular zone. *Nat Commun.* **2020**, 11: 2138.
- 34) Al Za'abi M, Ali B, Al Toubi M. HPLC-fluorescence method for measurement of the uremic toxin indoxyl sulfate in plasma. *J Chromatogr Sci.* **2013**, 51: 40-43.

- 35) Imanishi M, Inoue T, Fukushima K, Yamashita R, Nakayama R, Nojima M, Kondo K, Gomi Y, Tsunematsu H, Goto K, Miyamoto L, Funamoto M, Denda M, Ishizawa K, Otaka A, Fujino H, Ikeda Y, Tsuchiya K. CA9 and PRELID2; hypoxia-responsive potential therapeutic targets for pancreatic ductal adenocarcinoma as per bioinformatics analyses. *J Pharmacol Sci.* **2023**, 153: 232-242.
- 36) Schulman G, Agarwal R, Acharya M, Berl T, Blumenthal S, Kopyt N. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of AST-120 (Kremezin) in patients with moderate to severe CKD. *Am J Kidney Dis.* **2006**, 4: 565-77.
- 37) Stearman RS, Bui QM, Speyer G, Handen A, Cornelius AR, Graham BB, Kim S, Mickler EA, Tudor RM, Chan SY, Geraci MW. Systems Analysis of the Human Pulmonary Arterial Hypertension Lung Transcriptome. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2019**, 60: 637-649.
- 38) Hoffmann J, Yin J, Kukucka M, Yin N, Saarikko I, Sterner-Kock A, Fujii H, Leong-Poi H, Kuppe H, Schermuly RT, Kuebler WM. Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* **2011**, 37: 1400-1410.
- 39) Wang CC, Ying L, Barnes EA, Adams ES, Kim FY, Engel KW, Alvira CM, Cornfield DN. Pulmonary artery smooth muscle cell HIF-1 α regulates endothelin expression via microRNA-543. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2018**, 315: L422-L431.

- 40) Hung SC, Kuo KL, Huang HL, Lin CC, Tsai TH, Wang CH, Chen JW, Lin SJ, Huang PH, Tarng DC. Indoxyl sulfate suppresses endothelial progenitor cell-mediated neovascularization. *Kidney Int.* **2016**, 89, 574-585.
- 41) Zhang D, Chang S, Jing B, Li X, Shi H, Zheng Y, Lin Y, Chen Z, Qian G, Pan Y, Zhao G. Reactive Oxygen Species Are Essential for Vasoconstriction upon Cold Exposure. *Oxid Med Cell Longev.* **2021**, 2021: 8578452.
- 42) Cheng TH, Cheng PY, Shih NL, Chen IB, Wang DL, Chen JJ. Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. *J Am Coll Cardiol.* **2003**, 42: 1845-54.
- 43) Shao D, Park JE, Wort SJ. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Res.* **2011**, 63: 504-511.
- 44) Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Loh SH, Cheng PY, Tsai CS, Liu SH, Wang DL, Chen JJ. Reactive oxygen species mediate cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression via Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* **2001**, 33: 1805-1814.
- 45) Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, Brunet P. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost.* **2007**, 5: 1302-8.

- 46) Nakano T, Watanabe H, Imafuku T, Tokumaru K, Fujita I, Arimura N, Maeda H, Tanaka M, Matsushita K, Fukagawa M, Maruyama T. Indoxyl Sulfate Contributes to mTORC1-Induced Renal Fibrosis via The OAT/NADPH Oxidase/ROS Pathway. *Toxins (Basel)*. **2021**, 13: 909.
- 47) Barman SA, Chen F, Su Y, Dimitropoulou C, Wang Y, Catravas JD, Han W, Orfi L, Szantai-Kis C, Keri G, Szabadkai I, Barabutis N, Rafikova O, Rafikov R, Black SM, Jonigk D, Giannis A, Asmis R, Stepp DW, Ramesh G, Fulton DJ. NADPH oxidase 4 is expressed in pulmonary artery adventitia and contributes to hypertensive vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2014**, 34:1704-15.
- 48) Gramatzki D, Pantazis G, Schittenhelm J, Tabatabai G, Köhle C, Wick W, Schwarz M, Weller M, Tritschler I. Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*. **2009**, 28: 2593-605.
- 49) Hao T, Zhang R, Zhao T, Wu J, Leung WK, Yang J, Sun W. Porphyromonas gingivalis infection promotes inflammation via inhibition of the AhR signalling pathway in periodontitis. *Cell Prolif*. **2023**, 56: e13364.
- 50) Kim D, Shin DY, Liu J, Jeong NR, Koh Y, Hong J, Huang X, Broxmeyer HE, Yoon SS. Expansion of Human Megakaryocyte-Lineage Progeny via Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonism with CH223191. *Stem Cell Rev Rep*. **2022**, 18: 2982-2994.

- 51) Zhao B, Degroot DE, Hayashi A, He G, Denison MS. CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor. *Toxicol Sci.* **2010**, 117: 393-403.
- 52) Hiraide T, Teratani T, Uemura S, Yoshimatsu Y, Naganuma M, Shinya Y, Momoi M, Kobayashi E, Hakamata Y, Fukuda K, Kanai T, Kataoka M. Pulmonary Arterial Hypertension Caused by AhR Signal Activation Protecting against Colitis. *Am J Respir Crit Care Med.* **2021**, 203: 385-388.
- 53) Matsuno Y, Torisu T, Umeno J, Shibata H, Hirano A, Fuyuno Y, Okamoto Y, Fujioka S, Kawasaki K, Moriyama T, Nagasue T, Zeze K, Hirakawa Y, Kawatoko S, Koga Y, Oda Y, Esaki M, Kitazono T. One-year clinical efficacy and safety of indigo naturalis for active ulcerative colitis: a real-world prospective study. *Intest Res.* **2022**, 20:260-268.
- 54) Kwar B, Ellam T, Jackson C, Kiely DG. Pulmonary hypertension in renal disease: epidemiology, potential mechanisms and implications. *Am J Nephrol.* **2013**, 37: 281-90.

謝辞

終わりに臨み、本研究に際し研究発案から遂行、結果解析に渡り、終始懇切なる御指導、御鞭撻、種々の有益な御助言を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 医薬品機能生化学分野 土屋 浩一郎 教授、今西 正樹 助教に謹んで心より感謝に意を表します。

また本研究を遂行するにあたり、御指導、御助言を賜りました神奈川工科大学健康医療科学学部 食品・薬理学研究室 宮本 理人 准教授、徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬理学分野 池田 康将 教授、同 船本 雅文 准教授、徳島大学大学院医歯薬学研究部 疾患病理学分野常山 幸一 教授、同 清水 真祐子 講師、徳島文理大学薬学部 医療薬学研究室 堀ノ内 裕也 准教授に深く感謝申し上げます。

さらに本研究に際し、御協力頂きました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 医薬品機能生化学分野 植村 宥香さん、檜垣 良也さんに心から感謝いたします。

最後に、博士課程に進学する機会をあたえてくださり、あらゆる場面で温かく見守り続けてくれた家族に深く感謝いたします。

本研究は、徳島大学学際的次世代研究者育成プログラム うずしおプロジェクトの研究助成を受けて、実施することができました。