

明 細 書

発明の名称：

肺高血圧症の予防又は治療薬、及び肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度の検査方法

技術分野

[0001] 本開示は、肺高血圧症（Pulmonary Hypertension、PH）の予防又は治療薬に関する。また、本開示は、PHの罹患の有無又はPHの重症度の検査方法、及び当該検査方法に使用される検査キットに関する。

背景技術

[0002] 肺高血圧症は、肺動脈の血圧が高くなることで、心臓と肺の機能障害をもたらす予後不良な進行性の疾患群であり、ニース分類によって、第1群：肺動脈性肺高血圧症（Pulmonary Arterial Hypertension、PAH）、第1'群：肺静脈閉塞症（pulmonary veno-occlusive disease、PVOD）及び／又は肺毛細管腫症（pulmonary capillary hemangiomatosis、PCH）、第1''群：新生児遷延性肺高血圧症、第2群：左心性心疾患に伴う肺高血圧症、第3群：肺疾患及び／又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（chronic thromboembolic pulmonary hypertension、CTEPH）、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に分類されている。

[0003] PHの中でも、PAHは肺動脈の筋性化、新生内膜増殖、叢状病変などの病理学的変化を伴う、末梢の肺動脈（小動脈または細小動脈）に炎症の主座を有する疾患である（非特許文献1, 2）。PAHの病因は複合的であり、おそらく遺伝的背景、エピジェネティックな修飾要因、既存疾患や環境要因のような、多様な要因が組み合わさって引き起こされる（非特許文献3）。そうした中でも炎症や自己免疫疾患は、PAHの病因として大きく寄与していると考えられる（非特許文献4, 5）。

[0004] 近年、PHは、平滑筋の弛緩をターゲットとした血管拡張薬により、全体としての予後は改善しつつあるが、重症患者や薬剤抵抗性の患者の予後は未だ

にかなり不良である。PHの発症及び重症化には、遺伝的素因以外に炎症や薬物などのセカンドヒットが重要とされるが、その詳細は不明な点が多く残されている。

- [0005] 本発明者等は、炎症シグナルの調節因子であり、環境中の汚染物質の受容体として知られる芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor: AHR) がPAH病態形成の鍵を握ることを報告している (非特許文献6)。本報告において、PAH患者では、血清AHR活性が高く、重症なほど同活性がより高く、高い群は予後不良であることが見出されている (図1)。また、内因性のAHRリガンドであるFICZは、低酸素刺激と組み合わせることにより、ラットに内膜病変を伴う重症肺高血圧症を誘導されることが報告されている (図2)。更に、重症PHモデルであるSu/Hxモデルにおいて、AHRをノックアウトすると、PHの病態形成がほぼ完全に抑制され、AHRがPH重症化の鍵を握ることも報告されている (図3)。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. The New England journal of medicine 2004;351: 1425-36.
- 非特許文献2: Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. The Journal of clinical investigation 2012;122:4306-13.
- 非特許文献3: Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. The European respiratory journal 2019;53.
- 非特許文献4: Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, et al. Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2015;112:E2677-86.

非特許文献5: Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. Nature reviews Cardiology 2011;8:443-55.

非特許文献6: Masaki T, Okazawa M et al., Aryl hydrocarbon receptor is essential for the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. PNAS 2021; 118, e2023899118

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] PHの病態形成で重要な役割を担っているAHRのリガンドを除去できれば、PHの発症予防、治療、及び重症化予防に有効になる可能性がある。しかしながら、従来、PHの病態形成に関与しているAHRリガンドは特定されていない。
- [0008] そこで、本開示の一実施形態では、PHの病態形成に関与しているAHRリガンドを特定し、当該AHRリガンドを除去できるPHの予防又は治療薬を提供することを課題とする。
- [0009] また、本開示の他の実施形態では、AHRリガンドによって引き起こされるPHの病態形成の機序を解明し、当該機序に基づいて新たなPHの予防又は治療薬を提供することを課題とする。
- [0010] また、本開示の更に他の実施形態では、PHのバイオマーカーを見出し、PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0011] 腸内細菌叢の変容による代謝物の変化が様々な病気に関連することが報告されている。そこで、本発明者らは、PH患者の腸内細菌叢を解析した。その結果、PH患者では口腔内細菌の腸内異所性定着とRuminococcus gnavus (R. gnavus)の増加を特徴とした腸内細菌叢の変容 (dysbiosis) が生じていることを知得した。また、この腸内細菌叢の変容により、PH患者の腸管内ではトリプトファンが高濃度になっており、それに伴ってトリプタミン等のトリプトファン代謝産物 (インドール化合物) の産生が亢進していることを知得した。更に、トリプトファン代謝産物がAHRリガンドとして機能して、PHの病態形

成を促進していることを知得した。また、腸管内で、トリプタミン等のトリプトファン代謝産物（AHRリガンド）は、AHR依存的なアンジオテンシン変換酵素2（Angiotensin-converting enzyme 2: ACE2）発現量の低下を介してB0AT1機能を低下させることによりトリプトファンの吸収を阻害しており、腸管内でのトリプトファンの高濃度化をより一層亢進させていることも知得した。そして、トリプトファン代謝産物に吸着又は結合する物質を投与して腸管内からトリプトファン代謝産物を除去することにより、PHを予防又は治療できるという知見を得た。本開示は、これらの知見に基づいて更に検討を重ねることにより完成したものである。

[0012] 即ち、本開示の一実施形態では、腸管内でのトリプトファン代謝産物の除去を機序とするPHの予防又は治療技術に関し、以下に掲げる発明を提供する。

項1-1. トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質を含む、PHの予防又は治療薬。

項1-2. 前記物質が、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物に吸着又は結合する物質である、項1-1に記載のPHの予防又は治療薬。

項1-3. 前記インドール化合物が、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-エタノール、インドール-3-酢酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-アクリル酸、及びインドール-3-乳酸よりなる群から選択される少なくとも1種である、項1-1又は1-2に記載のPHの予防又は治療薬。

項1-4. 前記物質が多孔質無機吸着剤である、項1-1又は1-2に記載のPHの予防又は治療薬。

項1-5. 前記物質が吸着炭である、項1-1～1-4のいずれかに記載のPHの予防又は治療薬。

項1-6. PH患者の腸管内から、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を除去する工程を含む、PHの治療方法。

項1-7. トリプトファン代謝産物であるインドール化合物に吸着又は結合す

る物質の治療有効量をPH患者に投与することにより、PH患者の腸管内から当該インドール化合物を除去する、項1-6に記載のPHの治療方法。

項1-8. トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質の、PHの予防又は治療薬の製造のための使用。

項1-9. 前記物質が、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物に吸着又は結合する物質である、項1-8に記載の使用。

項1-10. PHを治療する処置に使用される、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質。

項1-11. PHを治療する処置に使用される、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物に吸着又は結合する物質。

[0013] また、本開示の他の一実施形態では、便、腸管内容物又は血液サンプル中のトリプトファン濃度を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する技術に関し、以下に掲げる発明を提供する。

項2-1. PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法であって、

被験者から採取された便、腸管内容物又は血液サンプル中のトリプトファン濃度を測定する工程を含む、検査方法。

項2-2. トリプトファンを測定するための試薬を含む、PHの罹患の有無又はPHの重症度の検査キット。

[0014] また、本開示の他の一実施形態では、便、腸管内容物又は血液サンプル中のトリプトファン代謝産物の濃度を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する技術に関し、以下に掲げる発明を提供する。

項3-1. PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法であって、

被験者から採取された便、腸管内容物又は血液サンプル中のトリプトファンの代謝産物であるインドール化合物の濃度を測定する工程を含む、検査方法。

項3-2. 前記インドール化合物が、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-エタノール、インドール-3-酢酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-アクリル酸、及びインドール-

3-乳酸よりなる群から選択される少なくとも1種である、項3-1に記載の検査方法。

項3-3. トリプトファンの代謝産物であるインドール化合物を測定するための試薬を含む、PHの罹患の有無又はPHの重症度の検査キット。

[0015] また、本開示の他の一実施形態では、便又は腸管内容物のAHR活性を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する技術に関し、以下に掲げる発明を提供する。

項4-1. PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法であって、

被験者から採取された便又は腸管内容物のAHR活性を測定する工程を含む、検査方法。

項4-2. 便又は腸管内容物のAHR活性を測定するための試薬を含む、PHの罹患の有無又はPHの重症度の検査キット。

[0016] また、本開示の他の一実施形態では、便、腸管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する技術に関し、以下に掲げる発明を提供する。

項5-1. PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法であって、

被験者から採取された便、腸管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度を測定する工程を含む、検査方法。

項5-2. ACE2を測定するための試薬を含む、PHの罹患の有無又はPHの重症度の検査キット。

[0017] また、本開示の他の一実施形態では、腸管内でのACE2発現量の増大を機序とするPHの予防又は治療技術に関し、以下に掲げる発明を提供する。

項6-1. ACE2の発現量を増大させる物質を含む、PHの予防又は治療薬。

項6-2. ACE2の発現量を増大させる物質の治療有効量を、PH患者に投与する工程を含む、PHの治療方法。

項6-3. ACE2の発現量を増大させる物質の、PHの予防又は治療薬の製造のための使用。

項6-4. PHを治療する処置に使用される、ACE2の発現量を増大させる物質。

発明の効果

[0018] 本開示の一実施形態によれば、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去することにより、PHの予防又は治療が可能になる。また、本開示の別の一実施形態によれば、腸管内でのACE2発現量を増大させることにより、PHを予防又は治療が可能になる。

[0019] また、本開示の他の一実施形態によれば、便、腸管内容物又は血液サンプルにおけるトリプトファン濃度、トリプトファン代謝産物、又はACE2濃度を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査することができる。また、本開示の更に他の一実施形態によれば、便又は腸管内容物のAHR活性を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]PAH患者において、血清中のAhrリガンド活性は上昇しており、それはPAHの重症度を反映している結果を示す図である(非特許文献6)。Aは、AHRルシフェラーゼレポーターアッセイによって決定された、健常者ボランティア(HV)及びPAH患者の血清のAHR-Luc活性(HV: n=16, PAH: n=18); Bは、WHO肺高血圧症機能分類によって層別化された、AHR-Luc(ルシフェラーゼ)活性の分布(HV: n=16; WHO-FC 1, 2: n=10; WHO-FC 3, 4: n=8); Cは、AHR-Luc活性の低い患者(n=10)及びAHR-Luc活性の高い患者(n=8)のevent-free survivalのカプランマイヤー分析(P=0.0376, two-sided log-rank test)、を示す図である。なお、Cにおいて、AHR-Luc活性の平均値をカットオフ値として、AHR-Luc活性の低い患者とAHR-Luc活性の高い患者に階層化した。また、Cにおいて、臨床イベントは、死亡、肺移植、及び右心不全による入院加療と定義した。統計値は平均±標準偏差である: ***P<0.001, *P<0.05。

[図2]内因性のAHRリガンドであるFICZは、低酸素刺激と組み合わせることにより、ラットに内膜病変を伴う重症肺高血圧症を誘導することを示す結果である(非特許文献6)。Aは、FICZ投与が低酸素刺激との組み合わせでラットにPHを誘導するのを決定するための実験手順(FICZ/Hx/Nxモデル); Bは、FICZ/Hx/Nxラット及びVeh/Hx/Nxラットの右室収縮期圧(RVSP) Normoxia: n=5, Ve

h/Hx/Nx 5 wks: n=7, FICZ/Hx/Nx 5 wks: n=6, Veh/Hx/Nx 8 wks: n=6, FICZ/Hx/Nx 8 wks: n=7); Cは、FICZ/Hx/Nxラット及びVeh/Hx/Nxラットの右室肥大係数(フルトン係数); Dは、前記B及びCのラットの肺組織切片をエラスチカワンギーソン(EVG)染色した、代表的な肺の遠位細葉動脈の血管リモデリング画像; Eは、FICZ/Hx/Nxラット及びVeh/Hx/Nxラットの中膜肥厚指数(Normoxia: n=3, Veh/Hx/Nx 5 wks: n=4, FICZ/Hx/Nx 5 wks: n=3, Veh/Hx/Nx 8 wks: n=6, FICZ/Hx/Nx 8 wks: n=6); Fは、FICZ/Hx/Nxラット及びVeh/Hx/Nxラットの肺動脈外径(OD: $<50\mu\text{m}$)の血管での肺動脈閉塞病変をopen(内膜病変なし)、partial($<50\%$ 閉塞)又はclosed($\geq 50\%$ 閉塞;)として等級付けした結果(Normoxia: n=3, Veh/Hx/Nx 5 wks: n=4, FICZ/Hx/Nx 5 wks: n=3, Veh/Hx/Nx 8 wks: n=6, FICZ/Hx/Nx 8 wks: n=6); Gは、FICZ/Hx/Nxラット及びVeh/Hx/Nxラットの肺動脈外径(OD: $50\text{--}100\mu\text{m}$)の血管での肺動脈閉塞病変を前記と同様にopen、partial、又はclosedとして等級付けした結果、を示す図である。図中、略号「FICZ」はFICZ投与群、「Veh」は溶媒投与群、「Hx」低酸素負荷、「Nx」は正酸素条件を示す。Aにおいて、略号「RHC」は右心カテーテル検査を示す。統計値は平均±標準偏差である: **** $P<0.0001$, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ 。

[図3]AHRノックアウトラットが、SuHxラットモデルの肺高血圧に抵抗性であったことを示す図である(非特許文献6)。Aは、SuHxラットモデルにおけるAHRシグナル経路の果たす役割を検証するための実験手順; Bは、SuHxラット(Ahr $^{-/-}$ 、Ahr $^{+/+}$)及び正酸素のままのラット(Normoxia; Ahr $^{-/-}$ 、Ahr $^{+/+}$)の5週時点での右室収縮期圧(RVSP)(Normoxia Ahr $^{+/+}$: n=7, Normoxia Ahr $^{-/-}$: n=7, SuHx 5 wks Ahr $^{+/+}$: n=3, SuHx 5 wks Ahr $^{+/-}$: n=7, SuHx 5 wks Ahr $^{-/-}$: n=8); Cは、SuHxラット(Ahr $^{-/-}$ 、Ahr $^{+/+}$)及び正酸素のままのラット(Normoxia; Ahr $^{-/-}$ 、Ahr $^{+/+}$)の5週時点でのフルトン係数; Dは、SuHxラット(Ahr $^{-/-}$ 、Ahr $^{+/+}$)及び正酸素のままのラット(Normoxia; Ahr $^{-/-}$ 、Ahr $^{+/+}$)の8週時点での肺組織切片をEVG染色した、代表的な肺の遠位細葉動脈の血管リモデリング画像; Eは、SuHxラット(Ahr $^{-/-}$ 、Ahr $^{+/+}$)及び正酸素のまま

のラット (Normoxia ; Ahr-/-、Ahr+/+) の8週時点でのラットの中膜肥厚指数 (Normoxia Ahr+/+: n=4, Normoxia Ahr-/-: n=5, SuHx 8 wks Ahr+/+: n=3, SuHx 8 wks Ahr-/-: n=3) ; Fは、SuHxラット (Ahr-/-、Ahr+/+) 及び正酸素のままのラット (Normoxia ; Ahr-/-、Ahr+/+) の8週時点での肺動脈外径(OD : <50 μ m)の血管での肺動脈閉塞病変をopen (内膜病変なし)、partial (<50% 閉塞)又はclosed ($\geq$ 50% 閉塞;)として等級付けした結果 ; Gは、SuHxラット (Ahr-/-、Ahr+/+) 及び正酸素のままのラット (Normoxia ; Ahr-/-、Ahr+/+) の8週時点での肺動脈外径(OD:50-100 μ m)の血管での肺動脈閉塞病変を前記と同様にopen、partial、又はclosedとして等級付けした結果である。図中、略号「Su」はSU5416投与群、「Hx」低酸素負荷、「Nx」は正酸素条件、「Ahr-/-」はAHRをノックアウトしたこと、「Ahr+/+」はAHRをノックアウトしていないこと、「RHC」は右心カテーテル検査を示す。統計値は平均±標準偏差である : ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01。

[図4]PH患者の腸内細菌叢変容を示す図である。Aは、PH患者 (PH、89例) と健常者 (HV、82例) の腸内細菌叢について、Faith PD及びShannon indexに関する α 多様性を示す図である。Bは、PH患者と健常者の腸内細菌叢の β 多様性 (unweighted unifrac PCoA) を示す図である。****P<0.0001, *P<0.05。

[図5]PH患者の腸内細菌叢変容を示す図である。Aは、腸内細菌叢を構成する細菌 (属レベル) をPH患者と健常者 (HV) と比較したボルケーノプロットである。Bは、PH患者と健常者の腸内の口腔内常在細菌スコアを示す図である。Cは、PH患者を口腔内常在細菌スコア(OS)が5以上と5未満に分けて、WHOのPH機能分類のI~IV度の各割合を比較した結果である。Dは、PH患者を口腔内常在細菌スコア(OS)が5以上と5以下に分けて、event-free survivalのカプランマイヤー解析(P<0.01, two-sided log-rank test)を行った結果を示す図である。Eは、PH患者と健常者の便中の酢酸、プロピオン酸、及び酪酸の各濃度を示す。Dにおいて、臨床イベントは、死亡、肺移植、及び右心不全による入院加療と定義した。統計値は平均±標準偏差である : ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05。

[図6]PH患者では、*Ruminococcus gnavus*が腸管内で複数の口腔内細菌とネットワークを形成して共存し、これが予後不良と関連していることを示す図である。Aは、PH患者の腸内細菌叢の組成分析の結果を用いて作成した、*Ruminococcus gnavus*と相関する細菌とのネットワーク図である。Bは、PH患者を、腸内における*Ruminococcus gnavus*と、*Streptococcus*、*Rothia*、*Fusobacterium*、又は*Veillonella*の存在量毎に分類して、event-free survivalのカプランマイヤー解析を行った結果を示す図である。Bにおいて、臨床イベントは、死亡、肺移植、及び右心不全による入院加療と定義した。

[図7]肺高血圧症モデルラットにおける腸内細菌叢変容を示す図である（国際公開第2021/167088号）。Aは、肺高血圧症モデルラット作製手順を示す図であり、上段が低酸素負荷、中段がモノクロタリン負荷、下段がSugen5416/低酸素/正酸素負荷（SuHx）による肺高血圧症モデルラット作製手順である。Bは、各モデルラットの腸内細菌叢について β 多様性を示す図である。Cは、各モデルラットの腸内細菌叢における腸内細菌の科レベルの構成割合をバースロットで示す図である。

[図8]肺高血圧症モデルラットに抗生剤を投与することによりPH病態が改善することを示す図である（国際公開第2021/167088号）。Aは、低酸素負荷（Hx）モデルラットに抗生剤カクテル水（Abx）又は水（Vehicle）を自由飲水投与、並びに刺激なしのSDラットに水を自由飲水投与（Control）させて、PH病態（肺動脈中膜肥厚、右室収縮期圧、及び右室肥大係数）を評価した結果である。Bは、MCTモデルラットに抗生剤カクテル水（Abx）又は水（Vehicle）を自由飲水投与させて、PH病態（肺動脈中膜肥厚、右室収縮期圧、及び右室肥大係数）を評価した結果である。Cは、SuHxモデルラットに抗生剤カクテル水（Abx）又は水（Vehicle）を自由飲水投与させて、PH病態（肺動脈中膜肥厚、右室収縮期圧、及び右室肥大係数）を評価した結果である。統計値は平均±標準偏差である：**** $P < 0.0001$ ，*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ 。

[図9]PHモデルノトバイオトラットにおける肺高血圧症病態の変化を示す図である。Aは、PHモデルノトバイオトラットの作製方法を示す図である。B

は、PH患者便移植F344ラット及び健常者便移植F344ラットの腸内菌叢の組成を解析した結果である。Cは、PH患者便移植F344ラット（MCT-PH）、健常者便移植F344ラット（MCT-HV）、無菌環境飼育F344ラット（MCT-GF）、及びSPF環境飼育F344ラット（MCT-SPF）の右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した結果である。統計値は平均±標準偏差である。 $**P<0.01$, $*P<0.05$ 。

[図10]PH患者便移植F344ラット（PH）及び健常者便移植F344ラット（HV）の肺のRNAseq解析結果を示す図である。Aは、肺におけるRNA発現の比較をボルケーノプロットで示した図である。Bは、肺におけるRNA発現をGene Ontology Term解析した結果である。Cは、Bに関連する個々の遺伝子発現の差をバープロットで示す図である。

[図11]PH患者便移植ラットに対してバンコマイシンを投与した実験結果を示す図である。Aは、実験手順を示す図である。Bは、バンコマイシンを投与したPH患者便移植ラット（PH-FMT-VCM）、及び水（Vehicle）を投与したPH患者便移植ラット（PH-FMT）の右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した結果である。統計値は平均±標準偏差である。 $**P<0.01$, $*P<0.05$ 。

[図12]ヒト便検体を用いた腸内細菌のショットガン解析と、ヒト及びノトバイオトラットの糞を用いたAHRルシフェラーゼレポーターアッセイの結果を示す図である。Aには、ショットガンメタゲノムデータを用いて、PH患者及び健常者の便検体のKEGGモジュール経路解析を行った結果をボルケーノプロットで示した図である。Bは、AHRルシフェラーゼレポーターアッセイによりPH患者（PH）及び健常者（HV）の便検体のAHRリガンド活性を測定した結果を示す図である。Cは、AHRルシフェラーゼレポーターアッセイによりPHモデルノトバイオトラット（PH患者便移植F344ラット（PH-FMT）及び健常者便移植F344ラット（HV-FMT））の糞中AHRリガンド活性を測定した結果を示す図である。統計値は平均±標準誤差である。 $**P<0.01$, $***P<0.001$

[図13]ターゲットLC-MS解析によって、ヒト及びノトバイオトラットの便又は糞検体中のトリプトファン及びその代謝産物の濃度を測定した結果を示す図である。Aは、PH患者（PH）及び健常者（HV）の便検体中のトリプトファン

(Trp) 及びその代謝産物 (トリプトタミン (TryptA)、インドール-3-ピルビン酸 (IPyA)、インドール-3-アルデヒド (IAld)、インドール-3-酢酸 (IAA)、インドール-3-エタノール (IEt)、インドール-3-プロピオン酸 (IPA)、インドール-3-乳酸 (ILA)、インドール-3-アクリル酸 (IAcr)) の濃度を測定した結果を示す図である。Bは、PHモデルノトバイオトラット (PH患者便移植F344ラット (PH) 及び健常者便移植F344ラット (HV)) 糞検体中のトリプトファン及びその代謝産物の濃度を測定した結果を示す図である。統計値は平均±標準偏差である。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 、**** $P<0.0001$ 。

[図14]PH患者便移植ラットに対するAHR阻害薬 (CH223191) 投与実験の結果を示す図である。Aは、実験手順を示す図である。Bは、AHR阻害薬 (CH223191) 又はコーン油 (Vehicle) を投与したPH患者便移植ラットの右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した結果である。Cは、前記PH患者便移植ラットの肺から回収した免疫細胞についてsingle cell RNA-seq解析した結果に基づいて作成したUMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection)、及びその分析結果を示す図である。統計値は平均±標準偏差である。* $P<0.05$ 、**** $P<0.0001$ 。

[図15]健常者 (HV) 及びPH患者 (PH) の便検体 (HV $n=28$, PH $n=31$) と血清検体 (HV $n=24$, PH $n=24$) について多成分一斉LC-MS解析を行った結果である。左図が便検体の結果、右図が血清検体の結果である。

[図16]健常者 (HV)、PH患者 (PH)、心不全患者 (HF) の便検体と血清検体のトリプトファン濃度を示す図である。Aは便検体中のトリプトファン濃度、Bは血清検体のトリプトファン濃度、Cは空腹時の血清検体のトリプトファン濃度の測定結果である。統計値は平均±標準偏差 (A、B) 又は標準誤差 (C) である。* $p<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。

[図17]健常者及びPH患者の血清検体中のアミノ酸濃度をLC-MSで測定した結果を示す図である。図17において、左側から、トリプトファン、バリン、プロリン、アスパラギン、トレオニン、アラニン、メチオニン、グリシン、グ

ルタミン酸、及びリジンの順で、健常者(HV)及びPH患者(PH)の血清検体中濃度を示している。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

[図18]腸管上皮細胞株CAC0-2細胞を用いたiv vitro実験を示す図である。Aは、トリプタミン0~500 μM を添加して培養した際のACE2タンパク質の発現量を示す図である。Bは、トリプタミン200 μM とAHR阻害剤(BAY-218) 0~5 μM を添加して培養した際のACE2タンパク質の発現量を示す図である。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

[図19]トリプタミンがAHR依存性にACE2発現を抑制し、小腸でのトリプトファンの吸収が低下することを示した図である。Aは、実験の手順を示した図である。Bは、小腸上皮細胞層を用いてウエスタンブロッティングを行った図である。Cは、Bの結果からAce2発現量を定量化した図である。Dは、野生型SDラット(Slc6a19 +/+)及びSlc6a19ノックアウトラット(Slc6a19 +/-, -/-)の小腸を取り出してトリチウム標識トリプトファンの取り込み実験を行った結果である。Eは、野生型SDラット(Ace2 +/y)及びAce2ノックアウトラット(Ace2 -/y)の小腸を取り出してトリチウム標識トリプトファンの取り込み実験を行った結果である。統計値は平均±標準誤差である。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

[図20]トリプトファンがPH病態形成に重要であることを示す図である。Aは、実験のプロトコールを示した図である。Bは、便及び血清のAHR活性を測定した結果を示す図である。Cは、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した結果である。統計値は平均±標準偏差である。Dは、便中のトリプトファン代謝物濃度を測定した結果である。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

[図21]トリプタミン摂取がPH病態の悪化を誘発することを示した図である。Aは、実験手順を示した図である。Bは、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した結果である。Cは、トリプタミン含有飼料を与えたラットの肺のエラスチカ・ワンギーソン染色画像である。Cにおいて、炎症細胞の浸潤が認められる箇所矢印を付している。統計値は平均±標準偏差である。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

[図22] *Ruminococcus gnavus* は *Streptococcus pasteurianus* との協調作用により、PHを悪化させることを示した図である。Aは、健常者（HV）及びPH患者（PH）の便検体を用いて全ゲノム解析（ショットガン解析）を行い、トリプトファンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子（K01593）の保有率を求めた結果である。Bは、K01593遺伝子を保有する細菌の菌種割合を分析した結果である。Cは、*Ruminococcus gnavus*、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus Pasturianus*、及び*Streptococcus mutans*をin vitroで嫌気性培養し、経時的に培養液中のトリプタミン（TryptA）濃度を測定した結果である。Dは、*Ruminococcus gnavus*と*Streptococcus pasteurianus*の無菌ラットへの投与実験のプロトコールを示す図である。Eは、Dの実験において、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した結果である。Fは、Dの実験において、qPCRにより小腸上皮細胞でのムチン発現量を測定した結果である。Fにおいて、「GF」は細菌接種なしの条件、「Gnavus」は*Ruminococcus gnavus*のみを接種した条件、「Gnavus+St」は*Ruminococcus gnavus*と*Streptococcus pasteurianus*の双方を接種した条件、「St」は*Streptococcus pasteurianus*のみを接種した条件である。Gは、ムチンの有無で*Ruminococcus gnavus*の培養実験を行い、培養後の培養液の濁度を測定した結果である。Hは、Dの実験において、糞中のトリプトファン及びその代謝産物の濃度をLC-MSにより測定した結果である。Hにおいて、「GF」は細菌接種なしの条件、「Gnavus」は*Ruminococcus gnavus*のみを接種した条件、「St」は*Streptococcus pasteurianus*のみを接種した条件「Gnavus+St」は*Ruminococcus gnavus*と*Streptococcus pasteurianus*の双方を接種した条件である。統計値は平均±標準偏差である。 * $P<0.05$, ** $P<0.001$ 。

[図23] 吸着炭AST-120の混餌投与がラットの腸内から様々なインドール化合物を吸着除去したことを示す図である。Aは、実験プロトコールを示す図である。Bは糞中のトリプタミン（TryptA）、インドール-3-ピルビン酸（IPyA）の濃度、Cは糞中のインドール-3-アルデヒド（IAld）濃度、Dは糞中のインドール-3-酢酸（IAA）濃度、Eは糞中のインドール-3-エタノール（IEt）濃度、F

は糞中のインドール-3-プロピオン酸 (IPA) 濃度、Gは糞中のインドール-3-乳酸 (ILA) 濃度、Hは糞中のトリプトファン (Trp) 濃度である。

[図24]PHモデルノトバイオトラットにおいてAST-120の経口投与が、腸内のトリプトファン代謝産物が除去され、PH病態が有意に改善したことを示す結果である。Aは実験プロトコールを示す図である。Bは、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した結果である。Cは、糞のAHRリガンド活性を測定した結果である。Dは、糞中のトリプタミン (TryptA)、インドール-3-ピルビン酸 (IPyA)、インドール-3-アルデヒド (IAld)、インドール-3-酢酸 (IAA)、インドール-3-エタノール (IEt)、インドール-3-プロピオン酸 (IPA)、インドール-3-乳酸 (ILA)、及びトリプトファン (Trp) の各濃度を測定した結果である。統計値は平均±標準偏差である。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

[図25]重症PAH自然発症モデルであるRegnase-1 Cd11cCre(Reg-1 CK0)マウスを無菌環境で飼育するとPAHの自然発症が抑制され、Reg-1 CK0マウスに吸着炭を投与するとPAH病態形成が抑制されることを示す図である。A及びBは、Reg-1 CK0マウスを、SPF環境又は無菌 (GF) 環境で飼育した後に、右室収縮期圧(A)及び右室肥大係数(B)を測定した結果である。AのReg1 f/wはPAHが発症しないコントロール群である。Cは、Reg-1 CK0マウスにAST-120を投与した実験のプロトコールである。Dは、Cの実験で右室収縮期圧を測定した結果である。統計値は平均±標準偏差である。 ** $P < 0.01$ 。

[図26]PHモデルラットに吸着炭を投与するとPAH病態形成が抑制されることを示す図である。Aは、モノクロタリン負荷PHモデルラットにAST-120を投与して、右室収縮期圧を測定した結果である。Bは、低酸素負荷PHモデルラットにAST-120を投与して、右室収縮期圧を測定した結果である。 * $P < 0.05$ 。

[図27]吸着炭 (AST-120、薬用炭、及び造粒活性炭) がインドール化合物に対して効率的に結合することを示す図である。L-バリン、L-グルタミン酸、3-アミノイソ酪酸、L-トリプトファン、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、及びインドール-3-酢酸に対する各吸着炭の吸着率の測定結果を示してい

る。

発明を実施するための形態

[0021] 1. 定義

本明細書で使用される用語は、特に具体的な定めのない限り、医学、薬学、分子生物学、微生物学、有機化学等の分野における当業者に一般に理解される通りの意味を有する。本明細書において定義された用語は、一般的に理解されるのと同じ意味を有していない場合、本明細書の記載内容が優先する。

[0022] 本開示において、「肺高血圧症（PH）」とは、肺動脈の血圧が高くなることで、心臓と肺の機能障害をもたらす予後不良な進行性の疾患群であり、具体的には、安静時に右心カテーテル検査を用いて実測した肺動脈圧（PAP）の平均値（mean PAP）が25 mmHg以上の病状である。PHは、ニース分類によって、第1群：肺動脈性肺高血圧症（Pulmonary Arterial Hypertension、PAH）、第1'群：肺静脈閉塞症（pulmonary veno-occlusive disease、PVOD）及び／又は肺毛細管腫症（pulmonary capillary hemangiomatosis、PCH）、第1''群：新生児遷延性肺高血圧症、第2群：左心性心疾患に伴う肺高血圧症、第3群：肺疾患及び／又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に分類されている。

[0023] 本開示において、「PHの重症度」は、表1に示すWHO肺高血圧症機能分類に従って分類される。

[表1]

WHO 肺高血圧症機能分類	
I 度	身体活動に制限のない肺高血圧症患者。 普通の身体活動では呼吸困難や疲労、胸痛や前失神など生じない。
II 度	身体活動に軽度の制限のある肺高血圧症患者。 安静時には自覚症状がない。普通の身体活動で呼吸困難や疲労、胸痛や前失神などが起こる。
III 度	身体活動に著しい制限のある肺高血圧症患者。 安静時に自覚症状がない。普通以下の軽度の身体活動では呼吸困難や疲労、胸痛や前失神などが起こる。
IV 度	どんな身体活動もすべて苦痛となる肺高血圧症患者。 これらの患者の一部は右心不全の症状を呈している。 安静時にも呼吸困難および/または疲労がみられる。 どんな身体活動でも自覚症状の増悪がある。

- [0024] 本開示において、「芳香族炭化水素受容体（AHR）」とは、アゴニスト（内因性又は外因性のリガンド）と結合して活性化し、CYP1A1（チトクロームP450、ファミリー1、サブファミリーA）やAHRR（AHRリプレッサー）等の下流の遺伝子発現を制御する転写因子を指す。
- [0025] 本開示において、「B0AT1」とは、ナトリウム依存性の中性アミノ酸トランスポーターB(0)AT1であり、SLC6A19遺伝子によりコードされているタンパク質である。
- [0026] 本開示において、「アンジオテンシン変換酵素2（ACE2）」とは、レニン・アンジオテンシン系で働く因子の一つであり、B0AT1のシャペロンとして機能することにより腸管での中性アミノ酸吸収に寄与することも知られているタンパク質である。
- [0027] 本開示において、「トリプトファン代謝産物であるインドール化合物」とは、トリプトファンの代謝により生じる化合物の内、インドール環を有する化合物を指す。トリプトファン代謝産物であるインドール化合物としては、具体的には、トリプタミン（TryptA）、インドール-3-アルデヒド（IAld）、インドール-3-ピルビン酸（IPyA）、インドール-3-エタノール（IEt）、インドール-3-酢酸（IAA）、インドール-3-プロピオン酸（IPA）、インドール-3-アクリル酸（IAcr）、インドール-3-乳酸（ILA）、インドール-3-アセトアルデヒド、インドール-3-アセトアミド、インドール-3-アセトニトリル、インドキシル硫酸、2-オキシインドール、インドール-3-酪酸、3-メチルインドー

ル、N-メチルトリプタミン、N-ヒドロキシトリプタミン、3-メチルインドールピルビン酸、インドール-3-アセトアルドキシム、3-メチルデオキシインドール、2-オキシインドール酢酸、2-オキシインドール、インドール-3-カルビノール、インドール、及びインドール-3-グリセロールリン酸が包含される。

[0028] 本開示において、「予防」とは、疾患又は症状の発症を抑制、又は発症までの期間を長くすることを指し、「治療」とは、疾患又は症状の軽減、緩和若しくは進行速度の低下を指す。

[0029] 本開示において、「血液サンプル」とは、血液由来のサンプルであり、全血、血清、及び血漿が包含される。

[0030] 2. 腸管内でのトリプトファン代謝産物の除去を機序とするPHの予防又は治療薬(1)

本発明者らは、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物が、PHの病態形成で重要な役割を担っているAHRのリガンドであることを特定し、腸管内から当該インドール化合物を除去することによりPHを予防又は治療できるという知見を得た。従って、本開示の一実施態様では、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質を含む、PHの予防又は治療薬（以下、「PH予防又は治療薬(1)」と表記する）が提供される。以下、本開示のPH予防又は治療薬(1)について詳述する。

[0031] [有効成分]

本開示のPH予防又は治療薬(1)では、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質が有効成分として含まれる。本開示のPH予防又は治療薬(1)では、腸管内に存在するトリプトファン代謝産物（インドール化合物）の除去により、PHを予防又は治療することが可能になる。

[0032] 本開示のPH予防又は治療薬(1)において、腸管内から除去対象となるインドール化合物の種類については、特に限定されないが、好ましくは、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-エタノール、インドール-3-酢酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-アクリル酸、及びインドール-3-乳酸等が挙げられる。有効成分として使用

される物質は、1種のインドール化合物を腸管内から除去できるものであってもよいが、2種以上のインドール化合物を腸管内から除去できるものが好ましい。また、インドール化合物の中でも、トリプタミンは、PHの病態形成において特に重要な役割を果たしているため、有効成分として使用される物質は、少なくともトリプタミンを腸管内から除去できるものであることが好ましい。また、トリプトファンは必須アミノ酸であるため、有効成分として使用される物質は、腸管内からトリプトファンを除去し難いものであることが好ましい。

[0033] トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質の種類については、特に限定されないが、具体的には、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物に吸着又は結合する物質が挙げられる。当該物質によれば、腸管内に存在するトリプトファン代謝産物（インドール化合物）に吸着又は結合して、当該トリプトファン代謝産物をAHRリガンドとして機能させることなく、便として排出させることにより、PHを予防又は治療することが可能になる。

[0034] インドール化合物に吸着する物質としては、インドール化合物に吸着することによりAHRリガンドとしての機能を妨げるものであることを限度として特に限定されないが、好適な一例として多孔質無機吸着剤（無機吸着剤）が挙げられる。多孔質無機吸着剤として、具体的には、吸着炭（活性炭、薬用炭等）、活性アルミナ、シリカゲル、ベントナイト、珪藻土、ゼオライト、モレキュラーシーブ、白土、シリカ・マグネシア製剤、シリカ、アルミノケイ酸亜鉛、酸化チタン、酸化鉄、酸化スズ、水酸化チタン、水酸化鉄、水酸化スズ、炭化カルシウム、モンモリロナイト、ヒドロキシアパタイト、タルク、カオリン、カーボンナノチューブ、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム、ヒドロタルサイト、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、酸化アルミニウム、酸化アルミニウム、水酸化アルミニウムゲル、シリカ・アルミナ系鉱物（シブレット、セカード等）、窒化炭素、プラチナ、ガラス、沸騰石等が挙げられる。多孔質無機吸着剤の細孔径については、特に限定されず、ミ

クロ孔（2nm以下）、メソ孔（2～50nm）、又はマクロ孔（50nm以上）のいずれを有するものであってもよいが、多孔質無機吸着剤の好適な一例としてメソ孔を有する多孔質無機吸着剤（メソポーラス無機吸着剤）が挙げられる。また、前記多孔質無機吸着剤の形状については、生体内に投与可能であることを限度として特に制限されず、粉末、造粒物等のいずれであってもよい。

[0035] また、インドール化合物に吸着する物質の他の例としては、有機金属構造体（金属イオンと架橋性の有機配位子から構成される多孔性配位高分子）；タンニン酸アルブミン等のタンニン酸系吸着剤；アルブミン、ラクトフェリン、ラクトグロブリン、カゼイン、及びこれらの断片等のタンパク質系吸着剤；ゼラチン、寒天、アルギン酸、カラギーナン、ペクチン、デキストリン等の増粘剤；カゼインミセル等のミセル；乳化剤；ポリジビニルベンゼン、ポリメタクリル、ポリメタクリルージビニルベンゼン架橋、ポリスチレンージビニルベンゼン架橋等を母体ポリマーとする合成吸着剤；イオン交換樹脂；これらの類縁構造物等が挙げられる。

[0036] インドール化合物に吸着する物質の中でも、好適な一例として多孔質無機吸着剤（無機吸着剤）、より好ましくは吸着炭が挙げられる。従来、経口投与用球形吸着炭として球形吸着炭AST-120（商品名：クレメジン）、球形吸着炭（商品名：マイラン）及び球形吸着炭（商品名：日医工）が、慢性腎不全における尿毒素症状の改善及び透析導入の遅延を目的として臨床的に使用されており、本開示では吸着炭としてAST-120、球形吸着炭（マイラン）、又は球形吸着炭（日医工）を使用することもできる。

[0037] インドール化合物に結合する物質としては、インドール化合物に結合することによりAHRリガンドとしての機能を妨げるものであることを限度として特に限定されないが、具体的には、インドール化合物に対する抗体及びその抗体断片；アルブミン（組換えアルブミンタンパク質等）、アルブミン断片、その部分ペプチド（組換え体等を含む）及びそれらの類似物質；AHRタンパク質（組換えAHRタンパク質等）、その部分ペプチド（組換え体等を含む）、及びそれらの類似物質；オーキシシン(Indole-3-acetic acid)受容体SCF (Skp1/C

ullin/F-box) 複合体のサブユニットであるF-ボックスタンパク質 (TIR1) (組換えTIR1蛋白質等)、その部分ペプチド(組換え体等を含む)、及びそれらの類似物質; セロトニン受容体4(組換えセロトニン受容体4蛋白質等)、その部分ペプチド(組換え体等を含む)、及びそれらの類似物質; その他インドール化合物結合性タンパク質(組換え体等)、その部分ペプチド、及びそれらの類似物質等が挙げられる。なお、アルブミンは、トリプタミンと結合する特性と共に、インドール化合物に吸着する特性も有しているので、アルブミン、アルブミン断片、その部分ペプチド等は、インドール化合物に吸着する物質又はインドール化合物に結合する物質のいずれとしても使用できる。

[0038] 本開示のPH予防又は治療薬(1)の一実施態様において、有効成分として、好ましくはインドール化合物に吸着する物質、より好ましくは無機吸着剤(多孔質無機吸着剤)、更に好ましくは吸着炭、特に好ましくは球形吸着炭、より一層好ましくはAST-120、球形吸着炭マイラン、球形吸着炭日医工が挙げられる。

[0039] 本開示のPH予防又は治療薬(1)において、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質は、1種のを単独で使用してもよく、また2種以上のものを組み合わせて使用してもよい。

[0040] [製剤化]

本開示のPH予防又は治療薬(1)は、前記有効成分と薬学的に許容される担体や添加剤等を配合して、所望の剤型に調製して提供される。薬学的に許容される担体又は添加剤としては、例えば、滅菌水、生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤、結合剤等が挙げられる。

[0041] 本開示のPH予防又は治療薬(1)の剤型としては、例えば、カプセル剤、タブレット剤、丸剤、サシェ剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、チュアブル剤、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤またはエマルション剤等が

挙げられる。本開示のPH予防又は治療薬(1)にける前記有効成分の含有量は、投与量、剤型等に応じて適宜設定すればよい。

[0042] [用量及び用法]

本開示のPH予防又は治療薬(1)において、予防又は治療対象となるPHの臨床分類については、特に限定されず、ニース分類の第1群、第1'群、第1''群、第2群、第3群、第4群、及び第5群のいずれに分類されるものであってもよい。本開示のPH予防又は治療薬(1)の一実施態様として、ニース分類の第1群(PAH)の予防又は治療に使用することができる。

[0043] また、本開示のPH予防又は治療薬(1)において、治療対象となるPHの重症度については、特に限定されず、WHO肺高血圧症機能分類におけるⅠ度～Ⅳ度のいずれの重症度であってもよい。

[0044] 本開示のPH予防又は治療薬(1)の投与経路については、前記有効成分が腸内に移行できればよく、例えば、経口投与及び経腸投与、好ましくは経口投与が挙げられる。

[0045] 本開示のPH予防又は治療薬(1)の投与量については、投与対象の年齢、PH病態の程度、使用する有効成分の種類等に応じて適宜設定すればよいが、例えば、成人1日当たり、前記有効成分が1～80000 mg/kg程度、好ましくは10～8000 mg/kg程度で、1日1～6回、好ましくは1日2～4回に分けて投与すればよい。より具体的には、有効成分として多孔質無機吸着剤（特に吸着炭）を使用する場合であれば、成人1日当たり、多孔質無機吸着剤（が10～8000 mg/kg程度、好ましくは80～500 mg/kg程度で、1日1～6回、好ましくは1日2～4回に分けて投与すればよい。

[0046] 3. 便、消化管内容物、又は血液サンプル中のトリプトファン濃度を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法(PH検査方法(1))

本発明者らは、PH患者の腸管内ではトリプトファンの吸収阻害が生じており、PH患者は健常者に比べて、便及び消化管内容物中のトリプトファンが高濃度であり、血液中のトリプトファンが低濃度であるという知見を得た。従って、本開示の一実施態様では、PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する

方法であって、被験者から採取された便、消化管内容物又は血液サンプル中のトリプトファン濃度を測定する工程を含む検査方法（以下、「PH検査方法(1)」と表記する）が提供される。以下、本開示のPH検査方法(1)について詳述する。

[0047] 本開示のPH診断方法(1)において、被験者は、PHの罹患の有無の検査が必要な者又はPHの重症度の検査が必要な者であればよい。PHの罹患の有無の検査が必要な者としては、例えば、健常者、PHの発症が疑われている者等が挙げられる。PHの重症度の検査が必要な者としては、PH患者、PHの発症が疑われている者等が挙げられる。

[0048] 本開示のPH検査方法(1)において、トリプトファン濃度が測定される生体サンプルは、便、消化管内容物又は血液サンプルのいずれであってもよい。消化管内容物は、小腸内の内容物であることが好ましい。消化管内容物は、例えば、経鼻腸管挿入等により採取できる。便は、非侵襲的に採取可能であることから好ましい。便又は消化管内容物を使用する場合には、トリプトファン濃度の測定用サンプルとして、水等の抽出溶媒を使用して便又は消化管内容物からトリプトファンを含む抽出液を準備すればよい。また、血液サンプルは、全血、血清または血漿のいずれであってもよいが、好適な一例として血清が挙げられる。

[0049] 便又は消化管内容物又は血液サンプル中のトリプトファン濃度の測定は、高速液体クロマトグラフ法、液体クロマトグラフィー質量分析法、ガスクロマトグラフィー質量分析法、酵素免疫測定法(ELISA)等の公知のトリプトファン測定方法で行うことができる。

[0050] 本開示のPH検査方法(1)においてPHの罹患の有無を検査する場合、便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度が高い被験者は、PHに罹患している可能性が高いと判断される。PHの罹患の有無の検査において、便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度の高低は、予め参照値として健常者及び／又はPH患者における便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度の平均値又は中央値、或いは両者を識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較

で判定することができる。例えば、健常者における便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度の平均値又は中央値と比較して、被験者における便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度が高い場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。また、PH患者における便又は消化管内容物のトリプトファン濃度の平均値又は中央値と比較して、被験者における便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度が同等以上である場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。後記する実験結果からは、便中のトリプトファン濃度について、PH患者の平均値が $113.7\mu\text{g/g}$ (dry fecal wt.)、PH患者の中央値が $28.9\mu\text{g/g}$ (dry fecal wt.)であり、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が $26.18\mu\text{g/g}$ (dry fecal wt.)であることが確認されているので、これらのいずれかの値を参照値として使用して、被験者のPHの罹患の有無を判断することもできる。

[0051] また、本開示のPH検査方法(1)においてPHの罹患の有無を検査する場合、血液サンプル中のトリプトファン濃度が低い被験者は、PHに罹患している可能性が高いと判断される。PHの罹患の有無の検査において、血液サンプル中のトリプトファン濃度の高低は、予め参照値として健常者及び／又はPH患者における血液サンプルのトリプトファン濃度の平均値又は中央値、或いは両者を識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。例えば、健常者における血液サンプル中のトリプトファン濃度の平均値又は中央値と比較して、被験者における血液サンプル中のトリプトファン濃度が低い場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。また、PH患者における血液サンプルのトリプトファン濃度の平均値又は中央値と比較して、被験者における血液サンプルのトリプトファン濃度が同等以下である場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。後記する実験結果からは、血清中のトリプトファン濃度について、PH患者の平均値が $7.48\mu\text{g/mL}$ 、PH患者の中央値が $7.35\mu\text{g/mL}$ 、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が $13.0\mu\text{g/mL}$ 以下あることが確認されているので、これらのいずれかの値を参照値として使用して、被験

者のPHの罹患の有無を判断することもできる。

[0052] また、本開示のPH検査方法(1)においてPHの重症度を検査する場合、便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度がより高い被験者は、PHの重症度が高い可能性があると判断される。PHの重症度の検査において、便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度の高低は、予め参照値としてPH患者を重症度毎に分けて、便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度の平均値又は中央値、或いは重症度の違いを識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。

[0053] また、本開示のPH検査方法(1)においてPHの重症度を検査する場合、血液サンプル中のトリプトファン濃度がより低い被験者は、PHの重症度が高い可能性があると判断される。PHの重症度の検査において、血液サンプル中のトリプトファン濃度の高低は、予め参照値としてPH患者を重症度毎に分けて、血液サンプルのトリプトファン濃度の平均値又は中央値、或いは両者を識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。

[0054] 本開示のPH検査方法(1)において、便又は消化管内容物中のトリプトファン濃度が高く、且つ血液サンプル中のトリプトファン濃度が低い場合は、一方の指標のみで判断される場合に比べて、より高い精度をもって、PHに罹患している可能性が高い、又はPHの重症度が高い可能性があると判断される。

[0055] 本開示のPH検査方法(1)は、PHの診断補助のための検査として行うことができるので、本開示のPH検査方法(1)によってPHを罹患している可能性が高い又はPHの重症度が高い可能性があるとして判断された被験者は対しては、確定診断のためにも、カテーテル検査、心エコー図検査、心電図検査、胸部レントゲン検査等の更なる検査を行うことが望ましい。

[0056] また、本開示の一態様では、PH検査方法(1)の実施に使用される検査キットが提供される。当該検査キットには、トリプトファンを測定するための試薬が含まれていればよい。また、当該検査キットには、更に、必要に応じて便又は消化管内容物を回収するため器具、便又は消化管内容物からトリプトフ

アンを抽出するための試薬等が含まれていてもよい。

[0057] 4. 便、消化管内容物又は血液サンプル中のトリプトファン代謝産物濃度を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法(PH検査方法(2))

本発明者らは、PH患者の腸管内ではトリプトファンが高濃度であることに起因して、腸内細菌叢及び血液ではトリプトファン代謝産物であるインドール化合物（AHRリガンド）の濃度が高いという知見を得た。従って、本開示の一実施態様では、PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法であって、被験者から採取された便、消化管内容物又は血液サンプル中のトリプトファンの代謝産物であるインドール化合物の濃度を測定する工程を含む検査方法（以下、「PH検査方法(2)」と表記する）が提供される。以下、本開示のPH検査方法(2)について詳述する。

[0058] 本開示のPH検査方法(2)において、被験者、便、消化管内容物、及び血液サンプルは、前記PH検査方法(1)の場合と同様である。

[0059] 本開示のPH検査方法(2)において、測定対象となるインドール化合物は、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-エタノール、インドール-3-酢酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-アクリル酸、及びインドール-3-乳酸よりなる群から選択される少なくとも1種であればよい。これらのインドール化合物の中でも、トリプタミン濃度はPHの病態との相関が高いため、測定対象となるインドール化合物には少なくともトリプタミンが含まれていることが好ましい。2種以上のインドール化合物を測定対象とする場合には、2種以上のインドール化合物の合計濃度を求めればよい。

[0060] 便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度の測定は、高速液体クロマトグラフ法、液体クロマトグラフィー質量分析法、ガスクロマトグラフィー質量分析法、酵素免疫測定法(ELISA)等の公知のトリプトファン測定方法で行うことができる。

[0061] 本開示のPH検査方法(2)においてPHの罹患の有無を検査する場合、便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度が高い被験者は、PHに

罹患している可能性が高いと判断される。PHの罹患の有無の検査において、便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度の高低は、予め参照値として健常者及び／又はPH患者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度の平均値又は中央値、或いは両者を識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。例えば、健常者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度の平均値又は中央値と比較して、被験者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度が高い場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。また、PH患者における便、消化管内容物又は血液サンプルのインドール化合物濃度の平均値又は中央値と比較して、被験者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度が同等以上である場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。

[0062] PHの罹患の有無を検査する場合において、後記する実験結果から推測される具体的な参照値は以下の通りである。便中のトリプタミン濃度について、PH患者の平均値が4648 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が1589 ng/g(dry fecal wt.)であり、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が1559 ng/g(dry fecal wt.) あることが確認されている。便中のインドール-3-アルデヒド濃度について、PH患者の平均値が179.9 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が106.0 ng/g(dry fecal wt.)であり、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が97.13 ng/g(dry fecal wt.)であることが確認されている。便中のインドール-3-ピルビン酸濃度について、PH患者の平均値が1177 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が623 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が558 ng/g(dry fecal wt.)であることが確認されている。便中のインドール-3-エタノール濃度について、PH患者の平均値が363.1 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が155.9 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が342.6 ng/g(dry fecal wt.)

であることが確認されている。便中のインドール-3-酢酸濃度について、PH患者の平均値が13986 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が4851 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が6097 ng/g(dry fecal wt.)であることが確認されている。便中のインドール-3-プロピオン酸濃度について、PH患者の平均値が7238 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が2750 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が12630.8 ng/g(dry fecal wt.)であることが確認されている。便中のインドール-3-アクリル酸濃度について、PH患者の平均値が174.1 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が84.5 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が159.2 ng/g(dry fecal wt.)であることが確認されている。便中のインドール-3-乳酸濃度について、PH患者の平均値が20099 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者の中央値が830.5 ng/g(dry fecal wt.)、PH患者と健常者との間で感度特異度が最適となるカットオフ値が249.1ng/g(dry fecal wt.)であることが確認されている。これらの値の少なくとも1つを参照値として使用して、被験者のPHの罹患の有無を判断することもできる。

[0063] 本開示のPH検査方法(2)においてPHの重症度を検査する場合、便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度がより高い被験者は、PHの重症度が高い可能性があると判断される。PHの重症度の検査において、便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度の高低は、予め参照値としてPH患者を重症度毎に分けて、便、消化管内容物又は血液サンプル中のインドール化合物濃度の平均値又は中央値、或いは重症度の違いを識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。

[0064] 本開示のPH検査方法(2)は、PHの診断補助のための検査として行うことができるので、本開示のPH検査方法(2)によってPHを罹患している可能性が高い又はPHの重症度が高い可能性があると判断された被験者に対しては、確定診断のためにも、カテーテル検査、心エコー図検査、心電図検査、胸部レントゲ

ン検査等の更なる検査を行うことが望ましい。

[0065] また、本開示の一態様では、PH検査方法(2)の実施に使用される検査キットが提供される。当該検査キットには、インドール化合物を測定するための試薬が含まれていればよい。また、当該検査キットには、更に、必要に応じて、便又は消化管内容物を回収するため器具、便又は消化管内容物からインドール化合物を抽出するための試薬等が含まれていてもよい。

[0066] 5. 便又は消化管内容物のAHR活性を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法(PH検査方法(3))

本発明者らは、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物はAHRリガンドであり、PH患者の腸管内では当該インドール化合物が高濃度であることに起因して、便及び消化管内容物のAHR活性が高いという知見を得た。従って、本開示の一実施態様では、PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法であって、被験者から採取された便又は消化管内容物のAHR活性を測定する工程を含む検査方法（以下、「PH検査方法(3)」と表記する）が提供される。以下、本開示のPH検査方法(3)について詳述する。

[0067] 本開示のPH検査方法(3)において、被験者、便、及び消化管内容物は、前記PH検査方法(1)の場合と同様である。

[0068] 本開示のPH検査方法(3)において、便又は消化管内容物のAHR活性は、AHRの転写活性を測定すればよい。AHRの転写活性は次の方法で測定することができる。異物応答配列(XRE)の下流にレポーター遺伝子を連結したプラスミドベクターが導入されたレポーター遺伝子アッセイ用細胞株を用いる。レポーター遺伝子としてはルシフェラーゼ遺伝子が例示できる。前記レポーター遺伝子アッセイ用細胞株を、被験体から単離し調製した試料の存在下で培養して、レポーター遺伝子の発現量を測定する。レポーター遺伝子の発現量は、AHRの活性（転写活性）と比例する。このためレポーター遺伝子の発現量により、前記試料中のAHRの活性を評価することができる。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いる場合、ルシフェラーゼ遺伝子の発現により生じたルシフェラーゼの触媒反応による発光量をルミノメーターにより測定する

ことにより、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量を測定することができる。レポーター遺伝子アッセイは市販の試薬（アッセイ用細胞株を含む）を用いて行うことができる。AHRルシフェラーゼレポーターアッセイを行うための試薬は、INDIGO Biosciences社のIB06001等が市販されている。

[0069] 本開示のPH検査方法(3)においてPHの罹患の有無を検査する場合、便又は消化管内容物のAHR活性が高い被験者は、PHに罹患している可能性が高いと判断される。PHの罹患の有無の検査において、便又は消化管内容物のAHR活性の高低は、予め参照値として健常者及び／又はPH患者の便又は消化管内容物のAHR活性の平均値又は中央値、或いは両者を識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。例えば、健常者の便又は消化管内容物のAHR活性の平均値又は中央値と比較して、被験者の便又は消化管内容物のAHR活性が高い場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。また、PH患者の便又は消化管内容物のAHR活性の平均値又は中央値と比較して、被験者における便又は消化管内容物のAHR活性が同等以上である場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。

[0070] また、本開示のPH検査方法(3)においてPHの重症度を検査する場合、便又は消化管内容物のAHR活性がより高い被験者は、PHの重症度が高い可能性があるとして判断される。PHの重症度の検査において、便又は消化管内容物のAHR活性の高低は、予め参照値としてPH患者を重症度毎に分けて、便又は消化管内容物のAHR活性の平均値又は中央値、或いは重症度の違いを識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。

[0071] 本開示のPH検査方法(3)は、PHの診断補助のための検査として行うことができるので、本開示のPH検査方法(3)によってPHを罹患している可能性が高い又はPHの重症度が高い可能性があるとして判断された被験者に対しては、確定診断のためにも、カテーテル検査、心エコー図検査、心電図検査、胸部レントゲン検査等の更なる検査を行うことが望ましい。

[0072] また、本開示の一態様では、PH検査方法(3)の実施に使用される検査キットが提供される。当該検査キットには、AHR活性を測定するための試薬（例えば

、AHRルシフェラーゼレポーターアッセイを行うための試薬）が含まれていればよい。また、当該検査キットには、更に、必要に応じて、便又は消化管内容物を回収するため器具、便又は消化管内容物からインドール化合物を抽出するための試薬等が含まれていてもよい。

[0073] 6. 便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度を指標としてPHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法(PH検査方法(4))

本発明者らは、PH患者の腸管内では、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物（AHRリガンド）が高濃度であることに起因してACE2発現量が低下しており、便、消化管内容物及び血液サンプル中のACE2濃度が低いという知見を得た。従って、本開示の一実施態様では、PHの罹患の有無又はPHの重症度を検査する方法であって、被験者から採取された便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度を測定する工程を含む検査方法（以下、「PH検査方法(4)」と表記する）が提供される。以下、本開示のPH検査方法(4)について詳述する。

[0074] 本開示のPH検査方法(4)において、被験者、便、消化管内容物、及び血液サンプルは、前記PH検査方法(1)の場合と同様である。

[0075] 腸内細菌叢又は血液サンプル中のACE2濃度の測定は、酵素免疫測定法(ELISA)、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング、LC-MS/MS MRM等の公知のACE2測定方法で行うことができる。なお、血液サンプル中のACE2濃度は、可溶性ACE2 (soluble ACE2) を測定すればよい。

[0076] 本開示のPH検査方法(4)においてPHの罹患の有無を検査する場合、便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度が低い被験者は、PHに罹患している可能性が高いと判断される。PHの罹患の有無の検査において、便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度の高低は、予め参照値として健常者及び／又はPH患者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度の平均値又は中央値、或いは両者を識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。例えば、健常者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度の平均値又は中央値と比較して、被験

者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度が低い場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。また、PH患者における便、消化管内容物又は血液サンプルのACE2濃度の平均値又は中央値と比較して、被験者における便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度が同等以下である場合には、被験者はPHを罹患している可能性が高いと判断できる。

[0077] また、本開示のPH検査方法(4)においてPHの重症度を検査する場合、便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度がより低い被験者は、PHの重症度が高い可能性があるとして判断される。PHの重症度の検査において、便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度の高低は、予め参照値としてPH患者を重症度毎に分けて、便、消化管内容物又は血液サンプル中のACE2濃度の平均値又は中央値、或いは重症度の違いを識別するカットオフ値を求めておき、当該参照値との比較で判定することができる。

[0078] 本開示のPH検査方法(4)は、PHの診断補助のための検査として行うことができるので、本開示のPH検査方法(4)によってPHを罹患している可能性が高いと判断された被験者に対しては、カテーテル検査、心エコー図検査、心電図検査、胸部レントゲン検査等の更なる検査を行うことが望ましい。

[0079] また、本開示の一態様では、PH検査方法(4)の実施に使用される検査キットが提供される。当該検査キットには、ACE2を測定するための試薬（例えば、抗ACE2抗体等）が含まれていればよい。また、当該検査キットには、更に、必要に応じて、腸内細菌叢を回収するため器具、便又は消化管内容物からACE2を抽出するための試薬等が含まれていてもよい。

[0080] 7. 腸管内でのACE2発現量の増大を機序とするPHの予防又は治療薬(2)

本発明者らは、PH患者の腸管内では、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物（AHRリガンド）が高濃度であることに起因してACE2発現量が低下し、これがB0AT1の機能低下をもたらし、PHの病態を形成しているという知見を得た。従って、本開示の一実施態様では、ACE2の発現量を増大させる物質を含む、PHの予防又は治療薬（以下、「PH予防又は治療薬(2)」と表記する

）が提供される。以下、本開示のPH予防又は治療薬(2)について詳述する。

[0081] [有効成分]

本開示のPH予防又は治療薬(2)では、ACE2の発現量を増大させる物質が有効成分として含まれる。本開示のPH予防又は治療薬(2)では、腸管内でのACE2の発現量を増大させてBOAT1の機能を正常化させることにより、PHを予防又は治療することが可能になる。

[0082] ACE2の発現量を増大させる物質としては、ACE2の発現を促進でき且つ薬学的に許容できるものであることを限度として特に限定されないが、例えば、胆汁酸（ウルソデオキシコール酸等）、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬、 17β -エストラジオール、アトルバスタチン、ジミナゼンジアセチュレート、線維芽細胞成長因子21（FGF21）、ポリイノシン酸-ポリシチジル酸カリウム塩（Poly(I:C)）が挙げられる。

[0083] 本開示のPH予防又は治療薬(2)においてACE2の発現量を増大させる物質は、1種のを単独で使用してもよく、また2種以上のものを組み合わせて使用してもよい。

[0084] [製剤化]

本開示のPH予防又は治療薬(2)は、前記有効成分と薬学的に許容される担体や添加剤等を配合して、所望の剤型に調製して提供される。薬学的に許容される担体又は添加剤としては、例えば、滅菌水、生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤、結合剤等が挙げられる。

[0085] 本開示のPH予防又は治療薬(2)の剤型としては、例えば、カプセル剤、タブレット剤、丸剤、サシェ剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、チュアブル剤、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤またはエマルション剤等が挙げられる。本開示のPH予防又は治療薬(2)にける前記有効成分の含有量は、投与量、剤型等に応じて適宜設定すればよい。

[0086] [用量及び用法]

本開示のPH予防又は治療薬(2)において、予防又は治療対象となるPHの臨床分類については、特に限定されず、ニース分類の第1群、第1'群、第1''群、第2群、第3群、第4群、及び第5群のいずれに分類されるものであってもよい。本開示のPH予防又は治療薬(2)の一実施態様として、ニース分類の第1群(PAH)の予防又は治療に使用することができる。

[0087] また、本開示のPH予防又は治療薬(2)において、治療対象となるPHの重症度については、特に限定されず、WHO肺高血圧症機能分類におけるⅠ度～Ⅳ度のいずれの重症度であってもよい。

[0088] 本開示のPH予防又は治療薬(2)の投与経路については、前記有効成分が腸内に移行できればよく、例えば、経口投与及び経腸投与、好ましくは経口投与が挙げられる。

[0089] 本開示のPH予防又は治療薬(2)の投与量については、投与対象の年齢、PH病態の程度、使用する有効成分の種類等に応じて適宜設定すればよいが、例えば、成人1日当たり、前記有効成分が1～100 mg/kg程度、好ましくは1～20 mg/kg程度で、1日1～4回、好ましくは1日2～3回に分けて投与すればよい。

実施例

[0090] 以下に実施例を示してより具体的に説明するが、本開示はこれらの実施例に限定して解釈されるものではない。

[0091] 1. 試験材料及び方法

1-1. 臨床研究

倫理委員会の承認を得て、PH患者89例、健常者82例を被験者として便検体及び血液検体を採取した。PH患者は、特発性・遺伝性肺動脈性肺高血圧症40例、膠原病性肺動脈性肺高血圧症19例、門脈圧亢進に伴う肺高血圧症10例、慢性血栓塞栓性肺高血圧症8例、先天性短絡性疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症7例、その他5例であった。健常者は年齢性別をマッチした集団とした。表2にPH患者と健常者の背景因子を示す。被験者から糞便を採取し、4℃で可及的速やかにラボへ運び、解析まで-80℃で保存した。血液検体は、3500rpm、5分で遠心分離して血清を回収し、解析まで-80℃で保存した。

[0092] [表2]

	PH 患者 (n=89)	健常者 (n=82)	p 値
年齢 (years, IQR)	47 (35-57)	44 (34-51)	0.099
女性 (n, %)	22 (25)	26 (32)	0.310
BMI (kg/m ²)	22.5 ± 5.3	21.6 ± 2.7	0.157
WHO-FC 1/2/3/4	5/36/45/3	—	—
平均肺動脈圧 (mmHg)	39.0 ± 13.5	—	—
血管抵抗性 (Wood units)	9.2 ± 6.1	—	—
心係数 (L/min/m ²)	2.6 ± 0.7	—	—

統計値は、平均 ± 標準偏差である。

[0093] 1－2. 糞便中短鎖脂肪酸濃度の測定

糞便中の有機酸を測定するために、100mgの糞便をジルコニアビーズと一緒に2.0 mL-チューブに入れ、MilliQに懸濁した。サンプルを85℃で15分間加熱し、FastPrep 24 5G (MPBiomedicals, CA, USA) を用いて5 m/sで45秒間ボルテックスし、15,350 × gで10分間遠心し、上清を0.2 μmフィルターでろ過した。ろ液中の有機酸濃度を、高速液体クロマトグラフィー (Prominence, SHIMADZU, Kyoto、検出器 (CDD-10A, SHIMADZU, 京都, 日本)、タンデムに配置された2本のカラム (Shim-pack SCR-102(H), 300 mm × 8 mm ID, SHIMADZU, 京都, 日本)、及びガードカラム (Shim-pack SCR-102(H), 50 mm × 6 mm ID, SHIMADZU, 京都, 日本) を用いたポストカラム反応により測定した。本測定では、移動相 (5 mM p-トルエンスルホン酸) と反応液 (5 mM p-トルエンスルホン酸、100 μM EDTA、20 mM Bis-Tris) を使用した。

[0094] 1－3. 動物実験

全ての実験は国立循環器病研究センター動物委員会のガイドラインのもとで行われ、国立循環器病研究センター施設審査委員会の承認も受けている。Ahrノックアウト (Ahr -/-) ラット (Masaki et. Al, PNAS, 2021, 118(11):e2023899118)、Ace2ノックアウトラット (Ace2 -/y)、Slc6a19ノックアウトラット (Slc6a19 +/-, -/-) は、CRISPR/Cas9遺伝子編集で作製した。全てのラットは明暗12時間/12時間サイクルで24 ± 1℃にて飼養され、標準的マウス飼料と水を与えられた。

[0095] 1-3-1. ノトバイオート実験

日本エスエルシー株式会社より無菌F344ラット雄を購入し、無菌アイソレーター環境下で飼育した。11週齢ラットに対して健常者由来便又は肺高血圧症患者由来便を投与し、15週齢ラットに対してモノクロタリン（MCT）を皮下投与して肺高血圧症モデルノトバイオートラットを作製した。具体的には、まず4人の健常者由来便を嫌気性チャンバー内で混合し嫌気性輸送培地（1000 mL中にLablemco powder 20g, L-システイン 1g、KH₂PO₄0.45g, NaCl 0.9g, (NH₄)₂SO₄0.45g, CaCl₂0.045g, MgSO₄0.045g, グリセロール400mL, 蒸留水 600mLを含む）で希釈した健常者便希釈液と、4人の患者由来便を同様に嫌気性チャンバー内で混合し嫌気性輸送培地で希釈した患者便希釈液を作製した。続いて11週齢ラットに対して別々のアイソレーター内で健常者便希釈液（最終10倍希釈）または患者便希釈液（最終10倍希釈）をそれぞれ経口投与して、健常者と患者の腸内細菌叢を再現した便移植ノトバイオートラットを作製した。便移植の4週間後（15週齢）にモノクロタリン(Sigma Aldrich) 60mg/kgを皮下注射し、その後3週間アイソレーター内で飼育し、モノクロタリン負荷によるPHモデルノトバイオートラットを作製した。便移植に使用したPH患者と健常者の基本情報を表3に示す。

[0096] [表3]

	年齢	性別	疾患
健常者 1	32	男性	—
健常者 2	53	女性	—
健常者 3	49	女性	—
健常者 4	47	女性	—
PH 患者 1	21	男性	特発性肺動脈性肺高血圧症
PH 患者 2	47	女性	膠原病性肺動脈性肺高血圧症
PH 患者 3	59	男性	特発性肺動脈性肺高血圧症
PH 患者 4	54	女性	膠原病性肺動脈性肺高血圧症

[0097] （AHR阻害薬を投与したノトバイオート実験）

11週齢無菌ラットに対して患者由来便を投与し、15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与して肺高血圧症モデルノトバイオートラットを作製した。

モノクロタリン投与の翌日からVehicle群はコーン油を、AHR阻害薬群はCH223 191 (Sellec) を8mg/kg/dayで毎日胃管投与した。モノクロタリン投与後21日目に、右室収縮期圧及び右室肥大係数の測定、糞、血液及び臓器の採取を行った。

[0098] (低トリプトファン食又は高トリプトファン食を与えたノトバイオート実験)

11週齢無菌ラットに対して患者由来便を投与し、13週齢ラットに対して、低トリプトファン食群と高低トリプトファン食群に分けて飼育した。低トリプトファン食群は0.1 w/w%トリプトファン含有餌を、高トリプトファン食群は1.25 w/w% トリプトファン含有餌を与え、15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与して肺高血圧症を誘導した。モノクロタリン投与後21日目に、右室収縮期圧及び右室肥大係数の測定、糞、血液及び臓器の採取を行った。

[0099] (単菌又は2菌を移植したノトバイオート実験)

Ruminococcus gnavus (JCM6515) と *Streptococcus pasteurianus* (患者便を移植したラット糞中から単離した) は、嫌気性条件、37℃で、トリプチケースソイブロスで培養した。11週齢の無菌ラットに対して、*Ruminococcus gnavus* 及び *Streptococcus pasteurianus* を単菌もしくは2菌を接種した。15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与して肺高血圧症を誘導した。モノクロタリン投与後21日目に、右室収縮期圧及び右室肥大係数の測定、糞、血液及び臓器の採取を行った。

[0100] (AST-120を投与したノトバイオート実験)

1週齢無菌ラットに対して患者由来便を投与し、15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与して肺高血圧症モデルノトバイオートラットを作製した。モノクロタリン投与の翌日から、Vehicle群は標準試料 (CRF-1粉餌) を、AST-120群は8w/w% AST-120含有CRF-1粉餌を与えた。モノクロタリン投与後21日目に、右室収縮期圧及び右室肥大係数の測定、糞及び臓器の採取を行った。

[0101] 1-3-2. SPF (Specific pathogen free) 環境での実験

SPF環境での実験はSprague-Dawley (SD) ラットを日本Charles River社から

購入して行った。6～8週齢の雄ラットを使用して行った。

[0102] 1－3－3. Regnase-1 CD11c-Creマウスを使用した実験

京都大学大学院医学研究科 竹内理教授より譲渡頂いたRegnase-1 CD11c-Cre(Reg-1 CKO)マウス (Yaku et al, 2022, Circulation, 146(13):1006-1022)を使用した。

[0103] 1－3－4. トリプタミンを投与した実験

13週齢の無菌F344ラットに対して、Vehicle群は標準飼料 (CRF-1粉餌) を、トリプタミン群は1.25 w/w%トリプタミン含有CRF-1粉餌を与え、15週齢の時点でモノクロタリン60mg/kgを皮下投与して肺高血圧症を誘導した。モノクロタリン投与後21日目に、右室収縮期圧及び右室肥大係数の測定、糞、血液及び臓器の採取を行なった。

[0104] 1－3－5. AST-120を投与した実験

(SDラット；トリプトファン代謝産物の測定)

6週齢の雄SDラットをVehicle群とAST-120群に分けた。Vehicle群は標準飼料 (CRF-1粉餌) を、AST-120群は8 w/w% AST-120含有CRF-1粉餌を与えて7日目の糞を採取し、LC-MSを用いて、糞中のトリプトファン代謝産物 (インドール化合物) を測定した。

[0105] (モノクロタリン負荷SDラット；右室収縮期圧の測定)

SPF環境で飼育した6週齢の雄SDラットをVehicle群とAST-120群に分けた。両群のラットを6週齢の時点でモノクロタリン60mg/kgを皮下投与して肺高血圧症を誘導し、Vehicle群は標準飼料 (CRF-1粉餌) を、AST-120群は8 w/w% AST-120含有CRF-1粉餌を与えて3週間飼育した。モノクロタリン投与から3週間後に右室収縮期圧の測定を行った。

[0106] (低酸素負荷SDラット；右室収縮期圧の測定)

SPF環境で飼育した6週齢の雄SDラットをVehicle群とAST-120群に分けた。両群のラットを10%酸素条件に維持したチャンバー内で持続的に4週間飼育した。10%酸素条件での飼育期間中は、Vehicle群は標準飼料 (CRF-1粉餌) を、AST-120群は8 w/w% AST-120含有CRF-1粉餌を与えた。10%酸素条件での飼

育4週間後に右室収縮期圧の測定を行った。

[0107] (Regnase-1 CD11c-Creマウス)

4週齢のRegnase-1 CD11c-Cre (Regnase-1 K0) マウスを、vehicle群とAST-120群に分けた。Vehicle群は標準試料 (CRF-1粉餌) を、AST-120群は8 w/w% AST-120含有CRF-1粉餌を与え、4週間後に、右室収縮期圧及び右室肥大係数の測定を行った。

[0108] 1－4．右室収縮期圧の測定

ラットはイソフルラン (Pfizer) による吸入麻酔によって鎮静・鎮痛化を行った。手技間のラットの体温を直腸温モニターと連動したサーモスタット制御のヒートパッドで37℃～38℃に維持した。気管切開し、ラット用人工呼吸器 (Harvard apparatus) で1回換気量10 μ L/g、70回/分で換気した。ポリエチレンチューブを右外頸静脈に挿入して右室まで進めて右室圧 (RVP) を測定した。RVPシグナルは圧トランスデューサー (MLT0670; ADインスツルメンツ) で検出し、圧アンプリファイアー (ML117; ADインスツルメンツ) でそのシグナルを中継して、持続的にPower Labシステム (ADインスツルメンツColorado Springs, CO) でサンプリングして、Chart software (ADインスツルメンツ) を用いてコンピューターに記録した。心拍数は右室収縮期のピークに基づいて算出した。

[0109] マウスの右室収縮期圧の測定は、(1)人工呼吸器は160-170回/分にセットしたこと、及び(2)ポリエチレンチューブ製カテーテルを挿入した24Gの針を横隔膜下から右心室に挿入してRVPを測定したこと以外は、ラットの場合と同様の条件で行った。

[0110] 1－5．右室肥大係数 (Fulton's index) の測定

右室収縮期圧測定後、ラットを過剰量の麻酔薬投与で安楽死させ心臓を摘出した。心房を外した上で、右心室を左心室と中隔から分離した。水分を吸い取った後、右心室重量と左心室+中隔の重量を測定し、両者の重量比 (右室/左室重量比) を右室肥大係数として算出して右心室の肥大を評価した。

[0111] 1－6．RNA-seq解析

RNA及びライブラリー調製の品質は、TapeStation (Agilent) によって保証された。ラット肺のRNA-Sequencing解析については、100ngのトータルRNAをリボソームRNA除去のために使用し、その後TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina)を用いてライブラリー調製を行った。ヒト又はラット末梢血単核細胞 (PBMC) のRNA-Sequencing解析については、100 pgのトータルRNAを使用し、SMART-seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (Takara Clontech)を用いてライブラリー調製を行った。1サンプルあたり、75bpのPair end リードを有する、2500万リード以上が得られた。シーケンシングデータの質の管理は、FastQCを用いて行った。トリミング・フィルタリングを行った各リードを、ラットについてはラットゲノム (Rn6) を用いてラットゲノムVersion rn6リファレンスゲノムに、ヒトについてはHisat2を用いてヒトゲノム (hg38) リファレンスゲノムにそれぞれアラインメントした。肺組織に特異的に発現している遺伝子群は、2倍以上あるいは1/2以下の発現量変化を認め、False Discovery Rate (FDR) < 0.05を満たすものとして定義した。PBMCで特異的に発現している遺伝子群は、ヒトは1.5倍以上、ラットは2倍以上の発現変化を認め、 $P < 0.05$ を満たすものとして定義した。

[0112] 1-7. メタゲノム解析

(16S解析)

糞便からNecleoSpin DNA stool (Macherey-Nagel) を用いてDNAを抽出した。16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina) 及び16SリボソームRNAのV1-V2をターゲットとしたプライマーセット (27Fmod: 5'-AGR GTTTGATCMTGGCTCAG-3' (配列番号1) 及び338R: 5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' (配列番号2)) を用いて、製品のプロトコールに従ってライブラリーを作製した。MiSeq System (Illumina) を用いて、251塩基のアンプリコンをシーケンシングした。得られたペアエンドリードはPEAR (sco.h-its.org/exelixis/web/software/pear/) を用いてマージされ、BBtrim ([bbmap.sourceforge.net](https://bbrmap.sourceforge.net/)) によってトリミングされた。更に、random_sequence_sample.pl (ualberta.ca/~stothard/software.html) によって、サンプルにつき20000リードに

まで無作為に抽出した。処理されたシーケンスは、UCLUST version 1.2.33 qをもとに、99%相同性からOTUs (operational taxonomic units) にクラスター化した。それぞれのOTUsはSilvav138データベースを参照して分類学的に分けられ、QIIME version 2により生物情報学的な菌叢解析を行った。

[0113] (Shotgun解析)

全ゲノムシーケンシングは、DNBSEQ-G400 (MGI Tech) にて実行され、150塩基のペアエンドリードが生成された。クオリティチェック (QC) プロセスの主なステップは(i)低品質塩基のトリミング、(ii)重複リードの除去、(iii)ヒトリードの同定とマスキングである。PRINSEQ-lite53 (version 0.20.4) を用いて重複リードをマークした。Trimomatic (version 0.39) を用いて、イルミナアダプターをクリップし、両端の低品質塩基をカットするために生リードをトリミングした。トリミング後の長さが60bp未満のリードは廃棄した。次に、同じ配列の重複のうち、最も長いリードのみを残して重複除去を行った。QCの最終段階として、quality-filteredしたリードを、bowtie2 (バージョン2.3.5)、BMTagger (バージョン3.101) を用いてヒト参照ゲノム (hg38) にアライメントした。いずれのツールでもペアエンドのアライメントに失敗したリードのみ保持した。系統学的アノテーションと存在量の定量は、フィルタリングされたペアエンドリードは、bowtie2を用いて参照ゲノムデータセットにアライメントされた。複数マップされたリードに関しては、アライメントスコアによって最良のアライメントのみが選択された。各ゲノムにマップされたリードの数をゲノムの長さで割った。各ゲノムの値をサンプルごとに合計し、種レベルのクレードの相対的な存在量を計算した。

[0114] MEGAHIT (version 1.2.9)を用いて、フィルタリングしたペアエンドリードをコンティグにde novoアセンブルした。コンティグ上のオープンリーディングフレーム (ORF) をMetageneMark (version 3.38)を用いて予測した。次に、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) protein database (<https://www.kegg.jp>)を用いて、ORFカタログのアノテーションを行った。原核生物のKEGG遺伝子のデータベースと、メタゲノムサンプルのKEGG遺伝子のデ

ータベースであるMGENESを利用しアノテーションを行った。BLASTP（バージョンv0.9.32.133）を用いて、ORFカタログから翻訳された推定アミノ酸配列とKEGGタンパク質データベースをDIAMONDでアラインメントした。ORFの存在量を定量するために、デフォルトのパラメータでbowtie2を用いて、フィルターしたペアエンドリードをアセンブルしたコンティグにマッピングした。遺伝子サイズのバイアスを避けるため、ORFの存在量はマッピング結果に従ってORFカタログの各ORFの領域の深さと定義した。サンプルQCの後、細菌量データのQCと正規化を行った。次に微生物遺伝子のオルソログ存在量データの正規化も行った。

[0115] 1－8．ルシフェラーゼアッセイ

AHRルシフェラーゼレポーターアッセイは、INDIGO Biosciences社のIB06001を用いて刺激条件以外は指示書通りに行った。刺激は指示書に記載の培地で最終濃度が10 w/v%となるように血清又はPBSによる糞便抽出液を添加した。

[0116] 1－9．LC-MS解析

LC-MS解析で測定したトリプトファン及びインドール化合物の標準物質を表4に示す。

[0117] [表4]

化合物名	略号	CAS	製造元
L-トリプトファン	Trp	73-22-3	Tokyo Chemical Industry
インドール-3-アルデヒド（インドール-3-カルボキシアルデヒド）	IAlD	487-89-8	Tokyo Chemical Industry
インドール-3-ピルビン酸	IPyA	392-12-1	Sigma Aldrich
インドール-3-エタノール（トリプトフォール）	IEt	526-55-6	Tokyo Chemical Industry
インドール-3-酢酸	IAA	87-51-4	Tokyo Chemical Industry
トリプタミン	TryptA	61-54-1	Tokyo Chemical Industry
インドール-3-プロピオン酸	IPA	830-96-6	Tokyo Chemical Industry
インドール-3-アクリル酸	IAcr	1204-06-4	Tokyo Chemical Industry
インドール-3-乳酸	ILA	1821-52-9	MedChemExpress

[0118] 1－10．測定試料の調製

血清は4倍量のメタノールを添加しボルテックス後遠心し、得られた上清を

解析に用いた。糞便は4倍量の0.1%ギ酸水を加えてビーズ破碎を行い、ホモジナイズした。遠心後の上清を等量のメタノールと混和した。メタノールと混和した試料を更に遠心し、得られた上清をfilter処理して解析に用いた。血清及び糞便中のIPyAの測定では、メタノール添加時に、上清の三倍量の0.25mol/l 2-アミノエタントール(pH8.0)を添加し、室温で一時間反応させた後に遠心して得られた上清をTAZ体として測定した。

[0119] 1-1-1. LC-MS分析

超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) 分離は、島津社製超高速液体クロマトグラフNexeraを用い、カラムは島津GLC社製のShim-pack Scepter C18 内径2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径3 μ mを使用した。移動相Aは0.1%ギ酸水、移動相Bは0.1%ギ酸アセトニトリルを使用した。質量分析は、LCMS-8060NX又は8060トリプル四重極質量分析計 (島津製作所) を用いた。MRM transitionの最適化はそれぞれの標準溶液で実施した。代謝物の初期データはLabSolutions LCMS (Shimadzu)で解析した。

[0120] 多成分一斉LC-MS解析は、島津製作所のメソッドパッケージ (細胞培養プロファイリング、一次代謝物) を用いて面積値による相対比較により行った。カラムは、Supelco Discovery HS F5-3 内径2.1mm, 長さ150mm, 粒子径3 μ mを使用した。移動相Aは0.1%ギ酸水、移動相Bは0.1%ギ酸アセトニトリルを使用した。質量分析は、LCMS-8060NXトリプル四重極質量分析計 (島津製作所) を用いた。

[0121] 1-1-2. シングルセルRNAseq解析

免疫細胞は、外科的に採取した肺から単離した。具体的には、肺組織をハンス平衡塩溶液 (HBSS) にコラゲナーゼ (Sigma)、DNase I (Roche)、Dispase (Thermo) を添加した消化液の中で、ハサミで裁断した上で、gentleMACS (Miltenyi Biotec) で機械的に破壊した。得られた細胞は免疫細胞の濃縮のためにパーコール密度勾配遠心分離にかけ、免疫細胞を含む画分を回収した。FACS Aria Fusion (BD Biosciences) を用いて免疫細胞を分離した。死細胞は7-Amino-Actinomycin D(7-AAD)染色で除いた。選別された細胞は、Chr

omium Controller (10x Genomics)上のChromium Next GEM Chip G (10x Genomics)にロードされ、バーコーディングとcDNA合成が行われた。cDNAの増幅とライブラリーの構築は、Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1又は3' プロファイリング用のChromium Next GEM Single Cell 3' Kit v3.1 (10x Genomics)を用いて、メーカーのプロトコールに従って行った。ライブラリーはDNBSEQ-G400 (MGI Tech) でシーケンスした。ドロップレットライブラリーはCell Ranger 5.0.0 (10X Genomics)を用いて処理した。シーケンスリードは、GRCh38ヒトファレンスゲノムを用いてSTAR (v2.7.2a) 50でアライメントした。Cell Ranger countを用いて作成したフィルター付き発現マトリックスを用いて解析を行った。各サンプルにおいて、Unique Molecular Identifier (UMI)が1パーセンタイルより少ない細胞、又は99パーセンタイルより多い細胞は除外した。また、発現している遺伝子が200個未満の細胞、及びミトコンドリア遺伝子やヘモグロビン遺伝子からのリードが10%以上の細胞も除外した。Uniform manifold approximation and projection (UMAP) 投影、細胞タイプアノテーション、及び発現差異解析は、BBrowser X (BioTuring) を用いて行った。

[0122] 1-13. CACO-2細胞を使用した実験 (in vitro)

ATCCから入手したヒトCACO-2結腸癌細胞株を使用した。培地は、20%ウシ胎児血清 (SIGMA)、1%非必須アミノ酸 (Nacalai tesque)、100U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン (Nacalai tesque) を添加した最小必須培地 (MEM; Nacalai tesque) を使用した。CACO-2細胞を12ウェルプレートに播種し、5%CO₂加湿インキュベーター中で37℃で培養した。1週間に2回培地交換を行い、21日後に実験を行った。実験では、トリプタミン又はBAY-218 (AC hemBlock)を所定濃度で培地に添加し、72時間後に細胞回収し、ACE2タンパク質の発現量を測定した。

[0123] 1-14. トリチウム標識トリプトファン取り込み実験 (Ex-vivo)

トリチウム標識トリプトファンは³H-Tryptophan, L-[5-³H] (American Radiolabeled Chemicals) を用いた。冷した生食でラットの小腸を洗浄後、1ml

ピペットで裏返し腸管リングを用意した。取り込み実験は、cOmplete (Roche) 入りHBSS(Hanks' Balanced Salt Solution, Ca²⁺、Mg²⁺入り) に対し、0.1 μ Ci トリチウム標識トリプトファンを添加し、室温で5分インキュベートした。Na free HBSSはNaClをコリン-Clに、Na₂HPO₄をK₂HPO₄に置き換えて使用した。腸をNa free HBSSで洗浄後、液体シンチレーション (pico-fluor plus, PerkinElmer) で溶解し、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 4910TR, PerkinElmer) で放射線量をカウントした。Na free HBSS下で取り込まれた放射線量と、Na⁺HBSS下で取り込まれた放射線量の比を計算し、Na依存的なTryptophan取り込み量を評価した。

[0124] 1-15. ウェスタンブロッティング

Caco2単層又はラット由来小腸上皮細胞層から、ラジオイムノ沈降アッセイバッファー (50 mM Tris pH7.4、150 mM 塩化ナトリウム、1% NP40、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1 mM EDTA、cOmplete protease inhibitor mixture) 中でタンパク質を抽出した。20,000×g、4℃、15分間の遠心後、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質を定量した。等量のタンパク質をSuperSep ace 5-20 (富士フイルム) にロードし、0.2 μ mポリフッ化ビニリデンプラス膜に転写した。5%スキムミルク (ナカライテスク) を用いて1時間室温でブロッキングした後、膜を4℃で一晩、以下の一次抗体とインキュベートした。一次抗体として、抗ACE2抗体 (NOVUS) 及び抗 β アクチン抗体 (Cell signaling) を使用した。洗浄後、膜をHorseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体 (Cell Signaling) と室温で1時間インキュベートし、ECL-plus (Thermo Fisher Scientific) とイメージングシステム (Cytiva) で可視化した。タンパク質発現は β -アクチンの発現に対して正規化し、ウェスタンブロットのバンドリングのデンストメトリーはImageJを用いて解析した。

[0125] 1-16. 細菌培養 (in vitro)

Ruminococcus gnavus (JCM6515)、Streptococcus salivarius (JCM5707)、Streptococcus pasteurianus (国立循環器病研究センターで患者便移植ノ

トバイオトラットの糞より単離)、Streptococcus mutans (JCM5705)、Rothia aeria (JCM11412)は、Trypticase soy培地で37℃嫌気性条件下にて培養を行い、培養上清をLC-MSを用いてトリプトファン由来インドール化合物を測定した。Ruminococcus gnavusは、Trypticase soy培地と0.5%ムチン (Sigma) 含有Trypticase soy培地で24時間培養を行い、MicroScan Turbidity Meter (BECKMAN) を用いて濁度 (細菌数) を測定した。

[0126] 1-17. qPCR

ラット又はヒトの肺組織、或いはPBMC又は培養細胞の溶解物をTRIzol (Invitrogen)を用いて溶解し、PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen)及びPureLink DNase (Invitrogen)を用いて、トータルRNAを抽出した。定量的リアルタイムRT-PCRは、QuantiFast SYBRGreen RT-PCRキット (Qiagen)、又はPrimeScript RT reagent kit (TAKARA BIO) 及びFastStart Essential DNA Green Master (Roche) を用いて行った。前者を使用する場合は、80 ngのトータルRNAを10分間50℃で転写させて95℃で5分間変性した後、95℃10秒間と60℃30秒間を45サイクルでqRT-PCRの反応を行った。蛍光データはLightCycler 96 (Roche) を用いて回収、解析した。用いた遺伝子とそのプライマーは以下の通りである。

Gapdh :

FW: AAAGGGTCATCATCTCCGCC (配列番号3)

RV: AGTGATGGCATGGACTGTGG (配列番号4)

Mucin2 :

FW: ACCACCATTACCACCACCTCAG (配列番号5)

RV: CGATCACCACCATTGCCACTG (配列番号6)

[0127] 1-18. 吸着炭の吸着能の測定

L-バリン、L-グルタミン酸、及び3-アミノイソ酪酸をそれぞれ20mg/mlとなるようにPBS(-)に溶解させ、ストック溶液を調製した。また、L-トリプトファン、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、及びインドール-3-酢酸をそれぞれ100mg/mlとなるようにジメチルスルホキシドに溶解させ、ストック

溶液を調製した。得られた各ストック溶液を混合してPBS(-)で希釈し、各化合物が0.1mg/mlの濃度で含まれる化合物混合液を調製した。

- [0128] AST-120 (CAS: 90597-58-3、株式会社クレハ)、薬用炭 (CAS: 16291-96-6、日医工株式会社)、及び造粒活性炭 (CAS: 7440-44-0、株式会社ユー・イー・エス) の各吸着炭20mgを15ml容チューブに入れ、更に前記化合物混合液を添加して、吸着炭と化合物混合液の総量を10mlにした。次いで、37℃で軽く攪拌を半日行った後に、ろ過にて吸着炭を除去して、ろ液を回収した。得られたろ液をLC-MS解析に供し、各化合物の濃度を定量した。また、コントロールとして、吸着炭を添加しないこと以外は前記と同様の操作を行った。下記式に従って各化合物に対する吸着炭の吸着率を求めた。

$$\text{吸着率} = \{ (A-B) / A \} \times 100$$

A: コントロールのろ液の化合物濃度

B: 吸着炭を添加した場合のろ液の化合物濃度

- [0129] 1-19. 統計

全てのデータは平均値±標準誤差あるいは標準偏差で表現した。多群間での有意差検定はone-way ANOVAで行い、post-hoc検定した。2群間の検定はStudent t検定あるいはMann-whitney testで解析した。無イベント生存曲線はKaplan-Meier法を用いて導き出し、log-rank検定を用いて比較した。ネットワーク解析スピアマン順位相関を用いて行った。p値0.05未満を統計的有意とした。

- [0130] 2. 発明者による既報内容 (非特許文献6)

2-1. PAH患者において、血清中のAHR活性は上昇しており、血清中のAHR活性はPAHの重症度を反映している

PAH患者及び健常者ボランティア (HV) の血清中のAHRアゴニスト活性 (AHR-Luc活性) は、HVに比べてPAH患者で有意に高いことが明らかになっている (図2A)。また、血清中のAHR-Luc活性は、より重症のPAH (WHO肺高血圧症機能分類のIII度及びIV度) の方が、比較的軽症のPAH (WHO肺高血圧症機能分類のI度及びII度) よりも有意に高いことも分かっている (図2B)。更に、AHR-Lu

c活性の高いPAH患者では、低いPAH患者と比較して、死亡・肺移植・右心不全による入院加療等の重度の臨床イベントが起こる可能性が有意に高いことも報告されている（図2C）。このように、本発明者により、AHRの活性化がPAHの発症に重要な役割を果たしていること、血清中のAHRの活性化がPAHの重症度の指標になり得ることが既に見出されている。

[0131] 2-2. 内因性のAHRリガンドであるFICZは、低酸素刺激と組み合わせることにより、ラットに内膜病変を伴う重症肺高血圧症を誘導する

6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)は、内因性の強力なAHRアゴニストである。ラットに対して、最初の3週間低酸素負荷（10%O₂）を行うとともに、FICZを皮下投与すると（FICZ/Hx/Nxラットモデル；図2A）、右室収縮期圧（図2B）及びフルトン係数（図2C）の著明な上昇が認められることが報告されている。また、FICZ/Hx/Nxラットの遠位細葉動脈では、中膜肥厚（図2D, E）だけでなく、新生内膜増殖による閉塞性病変（図2D, F, G）の出現が認められることも報告されている。このように、本発明者により、AHR活性化は、PHの発症及び重症化を生じさせる一因になっていることが既に見出されている。

[0132] 2-3. SuHxラットモデルにおいてAHRをノックアウトすると、PAH病態が顕著に抑制される

SuHxラットモデルは、VEGF受容体拮抗薬SU5416投与、低酸素負荷、及び正酸素負荷がなされ、PAH病態を誘導するモデルである。CRISPR/Cas9遺伝子編集システムを用いてAHRノックアウトSuHxラットモデル（Ahr^{-/-}ラット）を製作し、PAH病態を観察した結果について、以下の報告がなされている。Ahr^{-/-}ラットは、右室収縮期圧（図3B）及びフルトン係数（図3C）の上昇を認めなかった。遠位細葉動脈の中膜肥厚指数は、Ahr^{-/-}ラットではAhr^{+/+}よりも大きく低下していた。（図3D, E）。それに加えてAhr^{-/-}ラットでは、閉塞血管は認めなかった（図3D, F, G）。このことは、AHRシグナルを阻害する効果が、（マウスなどの軽症肺高血圧症モデルでも見られる）中膜肥厚だけでなく、ヒトの重症肺高血圧症にみられる新生内膜病変・叢状病変の出現の抑制に

も有効であることを示しており、既存の薬剤で十分な病態改善が得られない重症例、治療抵抗例にも有効である可能性を示している。このように、本発明者により、AHRの阻害が、PAHの発症抑制に有効であることが既に見出されている。

[0133] 3. 参考試験結果

3-1. PH患者では口腔内細菌の異所性定着を特徴とする腸内細菌叢変容を認める

PH患者（PH、89例）と健常者（HV、82例）の腸内菌叢を解析した。PH患者の腸内細菌叢は、健常者と比較して α 多様性の指標であるFaith PD及びShannon indexは有意に低下していた（図4A）。また、PH患者の腸内細菌叢は、健常者と比較して β 多様性（unweighted unifracc PCoA）が大きく変化していた（図4B）。

[0134] また、腸内細菌叢の組成解析（ANCOM）のボルケーノプロットの結果から、PH患者では、腸内でStreptococcus、Rothia、Actinomyces等の口腔内細菌が増加し、Subdolignulum、Ruminococcus、Coprococcus等の短鎖脂肪酸（SCFA）産生菌が減少していることが分かった（図5A）。また、腸内に定着している口腔内常在細菌（全体で90%以上の人が1%以上の頻度で保有するコア14菌）の菌種数をスコアリングすることにより口腔内常在細菌スコア(OS)を求めたところ、PH患者の腸内の口腔内常在細菌スコアは健常者と比較して有意に上昇していた（図5B）。更に、口腔内常在細菌スコアが高いPH患者（OS>5）は、口腔内常在細菌スコアが低いPH患者（OS≤5）に比べて、WHOのPH機能分類が高くより重症であり（図5C）、無イベント生存率も低くなっていた（図5D）。

[0135] また、PH患者の便は、健常者便と比較して、酢酸、プロピオン酸、及び酪酸の濃度が有意に低下しており（図5E）、腸内環境が非常に健常な状態から逸脱していることが示唆された。

[0136] これらの結果から、PH患者の腸内細菌叢には、口腔内細菌の定着による変容が生じていることが確認できた。

[0137] 3-2. PH患者の腸内ではRuminococcus gnavusが腸管内で複数の口腔内細菌とネットワークを形成して共存し、これが予後不良と関連している

PH患者の腸内細菌叢の組成分析の結果から、口腔内常在細菌スコアが高いPH患者ではRuminococcus gnavusの相対頻度が高かった。更に、Ruminococcus gnavusと関連する細菌（スピアマン相関係数 >0.2 ）についてネットワーク解析したところ、腸内でRuminococcus gnavusは、Streptococcus、Veillonella、Rothia、及びFusobacterium（いずれもコア口内菌）とネットワーク形成して共存していることが判明した（図6A）。また、腸内においてRuminococcus gnavusがStreptococcus、Rothia、Fusobacterium、又はVeillonellaと共存しているPH患者では、予後が顕著に不良になることも判明した（Log-rank test; Streptococcus $P=0.007$, Rothia $P=0.004$, Veillonella $P=0.023$ ）（図6B）。これらの結果から、PH患者では、Ruminococcus gnavusが腸管内で複数の口腔内細菌とネットワークを形成して共存し、これが予後不良と関連していることが明らかとなった。

[0138] 3-3. 肺高血圧症モデルラットは腸内細菌叢の変容を呈する（国際公開第2021/167088号）

PHには、ラットを使った3つの代表的な疾患モデルが存在する（図7A）。これらのラットのモデルにおいて腸内細菌叢の変容を確認した。

[0139] 6週齢の雄SDラットを10%酸素の低酸素チャンバー内で持続的に3週間飼育し、低酸素負荷（Hx）による肺高血圧症モデルラットを作製した（図7A）。6週齢の雄SDラットにモノクロタリンを60mg/kgで皮下投与し、通常酸素濃度環境（正酸素）で3週間飼育し、モノクロタリン負荷（MCT）による肺高血圧症モデルラットを作製した（図7A）。6週齢の雄SDラットにVEGFR2阻害剤であるSugen5416を20mg/kgで皮下投与した後に10%酸素の低酸素チャンバー内で持続的に3週間飼育し、その後通常酸素濃度環境（正酸素）で2週間飼育することによりSugen5416／低酸素負荷（SuHx）による肺高血圧症モデルラットを作製した（図7A）。

[0140] 各肺高血圧症モデルラットの腸内細菌叢を解析したところ、Hx、MCT、及び

SuHxの各モデルラットにおいて β 多様性が変容していた(図7B)。しかし、ラットの腸内細菌叢はヒトの腸内細菌叢と大きく異なっており、Streptococcusをはじめとする口腔内細菌はラットではほとんど検出できず、Mulibaculaceaeに属する菌が共通して増加しており、Lachnospiraceaeが共通して減少していた(図7C)。

[0141] 3-4. 肺高血圧症モデルラットに対する抗生剤の投与はPH病態を改善する(国際公開第2021/167088号)

Hx、MCT、及びSuHxの各モデルラットに対して、アンピシリン1g/L、ネオマイシン1g/L、メトロニダゾール1g/L、バンコマイシン1g/Lを含む水(抗生剤カクテル水)又は水を投与して、PH病態(肺動脈中膜肥厚、右室収縮期圧、及び右室/左室重量比)を評価した。Hxの場合には、10%酸素の低酸素チャンバー内での3週間の飼育期間中に抗生剤カクテル水又は水を自由飲水させた後に、PH病態の評価を行った。MCTの場合には、モノクロタリン投与後の通常酸素濃度環境(正酸素)での3週間の飼育期間中に抗生剤カクテル水を自由飲水させた後に、PH病態の評価を行った。SuHxでは、低酸素負荷後の通常酸素濃度環境(正酸素)での2週間の飼育期間中に抗生剤カクテル水又は水を自由飲水させた後に、PH病態の評価を行った。また、コントロールでは、PHを誘発させていない雄SDラットに水を自由飲水させる条件で飼育した。この結果、抗生剤カクテルを投与したPHモデルラットのいずれでも、水を摂取させた場合に比べて、肺動脈中膜肥厚、右室収縮期圧、及び右室/左室重量比の有意な低下が認められた(図8A~C)。

[0142] 3-5. PHモデルラットにおいてPH患者の腸内菌叢を再構成すると、PH病態を促進し、肺の炎症性シグナルや生体異物に対する反応が亢進する

11週齢の無菌F344ラットにPH患者又は健常者由来の便希釈液を投与し、15週齢の時点でモノクロタリンを投与して、更に3週間飼育することによりPHモデルノトバイオートラット(PH患者便移植F344ラット又は健常者便移植F344ラット)を作製した(図9A)。また、11週齢の無菌F344ラットに便希釈液を投与することなく15週齢の時点でモノクロタリンを投与して、更に3週間飼育

することにより無菌環境飼育F344ラットを作製した。また、11週齢の無菌F344ラットに便希釈液を投与することなく国立循環器病研究センターのSPF環境で飼育し、15週齢の時点でモノクロタリンを投与して更にSPF環境で3週間飼育することによりSPF環境飼育F344ラットを作製した。

[0143] PH患者便移植F344ラット及び健常者便移植F344ラットの腸内細菌叢の組成を解析したところ、両者では腸内細菌叢の組成が大きく異なっており、PH患者便移植F344ラットでは口腔内菌のStreptococcusが多く定着しており、健常者便移植F344ラットでは代表的な酪酸産生菌であるFaecalibacteriumが多く定着していた（図9B）。

[0144] また、各ラットの右室収縮期圧及び右室/左室重量比を測定したところ、無菌環境飼育F344ラットでは、右室収縮期圧及び右室/左室重量比が共に、SPF環境飼育F344ラットと比較して低下しており、モノクロタリン誘発性PHが有意に抑制されていた（図9C）。また、健常者便移植F344ラットは、無菌環境飼育F344ラットと同程度の右室収縮期圧及び右室/左室重量比を示し、モノクロタリン誘発性PHが有意に抑制されていた（図9C）。更に、患者便移植F344ラットでは、健常者便移植F344ラットと比較して右室収縮期圧が有意に上昇していた（図9C）。これらの結果から、PHモデルラットにおいてPH患者の腸内細菌叢を再構成することにより、PH病態が現れやすくなることが確認できた。

[0145] PH患者便移植F344ラット及び健常者便移植F344ラットの肺のRNAseq解析した結果、PH患者便移植F344ラットの肺では、Egr1、Cma1、Mcp1、Tnf、Gzmb等のRNA発現が亢進していた（図10A）。また、Gene Ontology Term解析の結果から、PH患者便移植F344ラットでは、健常者便移植F344ラットに比べて、グラム陽性菌に対する防御反応に関連する遺伝子群や炎症反応を促進する遺伝子群、及びXenobiotic stimulusに対する反応に関連する遺伝子群が亢進しており（図10B）、特に、Macrophage chemotaxis (C5ar1、Cxcl17など)、Lymphocyte chemotaxis (Ccl9、Ccl6等)、Protein processing (Cma1、Gzmbなど)、IL-6 response (Mcp1、Prnp等)、Xenobiotic stimulation (Cebpa、Eg

r1等)に関する遺伝子が発現亢進していることが分かった(図10C)。一方、健常者便移植F344ラットでは、血管新生や血管形成に関連する遺伝子群が亢進しており(図10B)、特に、Angiogenesis(Tmem100, Sox17等)の遺伝子が発現亢進していた(図10C)。

[0146] 3-6. PHモデルラットにおいてPH患者の腸内菌叢の再構成によるPH病態促進は、バンコマイシンによってグラム陽性球菌を減じることによりキャンセルできる

PHモデルノトバイオートラットに対するバンコマイシンの投与がPH病態に及ぼす影響を検討した(図11A)。具体的には、11週齢の無菌F344ラットにPH患者又は健常者由来の便希釈液を投与し、その翌日から4週間バンコマイシン1g/Lを含む水又は水を自由飲水させた。15週齢の時点でモノクロタリン60mg/kgを皮下投与し、通常酸素濃度環境(正酸素)で3週間飼育した後に、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した。

[0147] その結果、バンコマイシンを投与した群では、水を投与した群に比べて、右室収縮期圧及び右室肥大係数が有意に低下していた(図11B)。即ち、PHの病態にはバンコマイシン感受性菌(主にグラム陽性球菌)が関与しており、バンコマイシンによってグラム陽性球菌を減じることにより、PH患者の腸内菌叢の再構成によるPH病態促進をバンコマイシンによってグラム陽性球菌を減じることによりキャンセルできることが明らかとなった。

[0148] 4. 試験結果

4-1. PH患者の腸内細菌叢はトリプトファン代謝が亢進し、豊富なAHRリガンドが産生されている

PH患者に特徴的な腸内細菌叢変容がPH病態の悪化もたらすメカニズムを探索した。まず、健常者52人及び患者71人の便検体を用いてwhole genome shotgun sequencingを行った。KEGG module databaseを用いて、健常者と比較してPH患者で有意に変化するmetagenomic biological pathway解析を行なった。その結果、PH患者で有意に亢進したパスウェイモジュールの中で、5番目に亢進したパスウェイがトリプトファン代謝であり(図12A)、PH患者の腸内細

菌叢は、健常者の腸内細菌叢と比較をしてトリプトファン代謝が亢進していることが判明した。また、AHRルシフェラーゼレポーターアッセイにより、PH患者及び健常者の便検体のAHRリガンド活性を測定した。その結果、PH患者の便検体では、健常者の便検体と比較して、AHRリガンド活性が有意に上昇していた（図12B）。即ち、これらの結果から、PH患者の腸内ではトリプトファンを原料として豊富なAHRリガンドが産生されていることが明らかとなった。

[0149] また、前記で作製したPHモデルノトバイオトラット（PH患者便移植F344ラット及び健常者便移植F344ラット）の糞に対してAHRルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した。その結果、PH患者便移植F344ラットは、健常者便移植F344ラットに比べて、糞中AHRリガンド活性が有意に上昇しており（図12C）、PH患者便移植F344ラットでもPH患者の腸内菌叢の特徴が反映されていることが確認できた。

[0150] 次に、病態形成の鍵となる腸内細菌由来のAHRリガンドを同定するために、PH患者及び健常者の便検体に対してターゲットLC-MS解析を行い、トリプトファン及びその代謝産物の濃度を求めた。その結果、PH患者は、健常者と比較して、便検体中のトリプトファン代謝産物の濃度が上昇していることが分かった（図13A）。特に、PH患者は、健常者に比べて、便検体中のILA、Trp、TryptA、IPyA、IAA、及びIAldの濃度が有意に上昇し、IAcr、IPA、及びIEtも上昇する傾向が認められた。

[0151] また、ターゲットLC-MS解析によって前記で作製したPHモデルノトバイオトラット（PH患者便移植F344ラット及び健常者便移植F344ラット）の糞中のトリプトファン及びその代謝産物の濃度を求めた。その結果、PH患者便移植F344ラットは、健常者便移植F344ラットに比べて、糞中のTryptAの濃度が有意に上昇していることが分かった（図13B）。

[0152] これらの結果から、PAH患者の腸内細菌叢はTryptAを中心としたインドール化合物の産生能を有しており、腸内細菌叢変容がもたらすPH病態の悪化に関与していることが分かった。また、PH患者の便では、トリプトファン濃度が高く、トリプトファンの代謝産物として生じるAHRリガンド（インドール化合

物)の濃度も上昇しており、便又は腸管内容物におけるトリプトファン及びその代謝産物の濃度、並びに便又は腸管内容物におけるAHR活性をPHの検査マーカーとして利用できることが確認された。

[0153] 4－2．PH患者の腸内細菌叢による病態悪化はAHR阻害薬でキャンセルされる

PHモデルノトバイオートラットに対するAHR阻害薬の投与がPH病態に及ぼす影響を検討した(図14A)。具体的には、11週齢の無菌F344ラットにPH患者由来の便希釈液を投与し、15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与した。モノクロタリン投与の翌日からAHR阻害薬であるCH223191を8mg/kg/day又はコーン油を毎日胃管投与した。モノクロタリン投与から21日後に、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定し、更に肺から免疫細胞を回収した。AHR阻害薬(CH223191)を投与した群では、コーン油(Vehicle)を投与した群に比べて、右室収縮期圧及び右室肥大係数が共に有意に改善していた(図14B)。

[0154] そこでAHRシグナル依存的な肺での免疫細胞変化を捉えるために、CH223191の効果をSingle cell RNA seq解析を実施した。具体的には、肺から回収した免疫細胞をsingle cell RNA-seq解析した結果に基づいて、遺伝子発現様態の特徴を可視化するためのUMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection)を作成した。この結果、AHR阻害薬(CH223191)を投与した群では、IL17aを発現するCluster3(Th17細胞)においてIfn γ 陽性細胞の割合が有意に低下しており、Th17細胞はAHR依存的にpathogenic Th17細胞に変化していることが分かった(図14C)。

[0155] これらの結果をまとめると、肺のTh17細胞はPH病態促進の鍵であり、腸管でのAHRシグナルはMLNでのeffector memory T細胞への分化とそれに伴う肺でのpathogenic Th17細胞の極性化を誘導し、PHを悪化させていると考えられた。

[0156] 4－3．PH患者の腸管でトリプトファン吸収障害が生じ、腸管内容物中のトリプトファン濃度の上昇、及び血清中のトリプトファン濃度の低下が生じる

健常者及びPH患者の便検体と血清検体について多成分一斉LC-MS解析を行った。その結果、PH患者では、便検体のトリプトファン濃度が高値であり、逆

に血清検体のトリプトファン濃度は低値になっていた（図15）。

[0157] また、健常者、PH患者、及び心不全患者の便検体と血清検体について、トリプトファン濃度の測定を行った。便検体のトリプトファン濃度については、PH患者は健常者と比較して有意に上昇していたが、血清検体のトリプトファン濃度については、PH患者は健常者及び心不全患者と比較して有意に低下していた（図16A, B）。また、健常者及びPH患者から空腹時に採取した血清検体についてトリプトファン濃度の測定を行ったところ、PH患者は健常者と比較して有意に低下していた（図16C）。この現象の疾患特異性を検討したところ、心不全患者ではみられず、PH患者に特異性があることが示された（図16A, B）。

[0158] これらの結果から、PH患者では、トリプトファン吸収障害が生じ、便及び腸管内容物中のトリプトファン濃度の上昇、血液中のトリプトファン濃度の低下をもたらしていることが示唆された。

[0159] 4－4．PH患者の腸管では中性アミノ酸輸送活性が低下している

トリプトファンは主に、小腸刷子縁に存在する中性アミノ酸輸送体であるB0AT1によって吸収されるが、ACE2がB0AT1のシャペロンとしてその発現や機能を制御すると報告されている。そこで、健常者及びPH患者の血清検体中のアミノ酸濃度をLC-MSで測定した。その結果、PH患者の血清検体では、中性アミノ酸であるトリプトファンやバリン、プロリン、アスパラギン、スレオニン、アラニン、及びメチオニンの濃度が有意に低下していたが、酸性アミノ酸（グルタミン酸）及び塩基性アミノ酸（リジン）濃度の低下は認められなかった（図17）。これらの結果から、PH患者の腸管では中性アミノ酸輸送活性が低下していることが分かった。

[0160] 4－5．腸管上皮細胞において、AHR依存的にACE2タンパク質の発現が低下する

PH患者の腸内において高濃度になっているトリプタミン（TryptA）が腸管細胞に及ぼす影響を検証するために腸管上皮細胞株CAC0-2細胞を用いた *in vitro* 実験を行った。

- [0161] 具体的には、CACO-2細胞を含む培地にトリプタミンを0~500 μ Mとなるように添加して72時間培養した後に、細胞回収し、ACE2タンパク質の発現量を測定した。その結果、トリプタミンの濃度に依存してCACO-2細胞のACE2タンパク質の発現量の低下が認められた（図18A）。
- [0162] また、CACO-2細胞を含む培地にトリプタミン200 μ MとAHR阻害剤（BAY-218）0~5 μ Mを添加して72時間培養した後に、細胞回収し、ACE2タンパク質の発現量を測定した。その結果、トリプタミンによるACE2タンパク質発現量の低下は、AHR阻害剤（BAY-218）により阻害されることが分かった（図18B）。即ち、これらの結果から、腸管上皮細胞において、AHR依存的にACE2タンパク質の発現が低下することが明らかとなった。
- [0163] 4-6. トリプタミンはAHR依存性にACE2発現低下を介してB0AT1（Slc6a19）機能を低下させトリプトファンの吸収を阻害する
- 野生型SDラット及びAhrノックアウト（Ahr-K0）ラットにトリプタミン100mg/kg/dayを混餌により一週間経口投与した後に、小腸を取り出して、ウェスタンブロッティング解析及びex-vivoでのトリチウム標識トリプトファンの取り込み実験を行った（図19A）。野生型SDラットではトリプタミン投与によってACE2タンパク質の発現量が低下したが、Ahr-K0ラットではトリプタミン投与によってACE2タンパク質の発現量は低下しなかった（図19B,C）。また、Ex-vivoトリプトファン取り込み実験の結果、トリプタミンを投与した野生型SDラットでは、小腸におけるトリプトファンの取り込み量が減少したが、トリプタミンを投与したAhr-K0ラットでは、小腸におけるトリプトファンの取り込み量の減少は見られなかった（図19F）。
- [0164] 更に、野生型SDラット、Slc6a19ノックアウト（Slc6a19-K0）ラット、及びAce2ノックアウト（Ace2-K0）ラットの小腸を取り出してトリチウム標識トリプトファンの取り込み実験を行った。中性アミノ酸輸送体であるSlc6a19（B0AT1）をノックアウトしたSlc6a19-K0ラットでは、Slc6a19のアレル数の減少に伴い（ワイルドタイプ（+/+）→ヘテロ（+/-）→ホモ（-/-））、ナトリウム依存性のトリプトファンの取り込みが低下していた（図19D）。また、Ace2

-K0ラットでも、ナトリウム依存性のトリプトファンの取り込みが低下していた（図19E）。

[0165] 4－7．高トリプトファン食負荷はAHRアゴニスト増加を介してPH病態を促進させる

PHモデルノトバイオートラットに対する高トリプトファン食負荷がPH病態に及ぼす影響を検討した（図20A）。具体的には、11週齢の無菌F344ラットにPH患者由来の便希釈液を投与し、13週齢の時点から低トリプトファン含有餌（0.1 w/w%トリプトファン）又は高トリプトファン含有餌（1.25 w/w%トリプトファン）を与えた。15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与し、モノクロタリン投与から21日後に、便及び血清を回収すると共に、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した。

[0166] AHRルシフェラーゼレポーターアッセイにより便及び血清のAHR活性を測定したところ、高トリプトファン含有餌を与えた群では、低トリプトファン含有餌を与えた群に比べて、便及び血清中のAHR活性が上昇していた（図20B）。更に、高トリプトファン含有餌を与えた群では、右室収縮期圧及び右室肥大の係数が上昇し、PH病態が悪化していた（図20C）。また、LC-MSにより便中のトリプトファン代謝物（インドール化合物）濃度を測定したところ、高トリプトファン含有餌を与えた群では、トリプトファン代謝物（インドール化合物）濃度の上昇が認められた（図20D）。即ち、これらの結果から、腸管内のトリプトファンが、PH病態形成に重要であることが確認できた。

[0167] 4－8．AHRリガンドは、腸管上皮細胞のACE 2 の発現低下を介してトリプトファンの取り込みを阻害し、腸内にAHRリガンドを豊富にする正のフィードバックループが存在する

以上に示す結果から、PH病態は以下の(1)～(4)の機序に基づいて形成されることが考えられる。

(1)AHRリガンドであるトリプトファン代謝物（インドール化合物）を産生する口腔内細菌が腸内細菌叢に定着することにより腸内菌叢の変容が生じる。

(2)腸内菌叢の変容を受けて、腸管内でトリプトファンからAHRリガンド（ト

リプトファン代謝物)の産生が亢進する。

(3)AHRリガンド(トリプトファン代謝物)の産生亢進によりTh17細胞の分化が促進され、肺に移動し、PH病態が形成される。

(4)腸管でのAHRリガンド(トリプトファン代謝物)の産生亢進によりAHR依存的なACE2発現低下が生じてトリプトファン吸収障害が起こり、腸管内でのトリプトファン濃度が更に高まって、腸管内でAHRリガンド(トリプトファン代謝物)の産生がより一層亢進するという悪循環が生まれる。

[0168] 4-9. AHRリガンドのトリプタミンはPH病態を悪化させる

無菌ラットに対するトリプタミン投与がPH病態に及ぼす影響を検討した(図21A)。具体的には、11週齢の無菌F344ラットに標準飼料又は1.25 w/w%トリプタミン含有飼料を与え、15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与し、モノクロタリン投与から21日後に、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定し、更に肺を回収して肺血管組織の組織学的解析を行った。

[0169] トリプタミン含有飼料を与えた群では、標準飼料を与えた群に比べて、右室収縮期圧及び右室肥大係数が有意に上昇していた(図21B)。また、肺のエラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色画像からは、1.25 w/w%トリプタミン含有飼料を与えたラットでは、肺小動脈が中膜肥厚を呈し、炎症細胞の浸潤が観察された(図21C)。

[0170] 4-10. Ruminococcus gnavusはStreptococcus pasteurianusとの協調作用により、PHを悪化させる

TryptA産生菌を同定するため、代謝酵素に着目し、メタゲノム情報から検討した。TryptAはトリプトファンからL-トリプトファンデカルボキシラーゼ(K01593)によって産生される。そこで、健常者及びPH患者の便検体を用いて全ゲノム解析(ショットガン解析)を行い、トリプトファンデカルボキシラーゼをコードする遺伝子(K01593)の保有率を求めた。その結果、PH患者は、健常者と比較して、K01593遺伝子を保有する細菌の割合が有意に高いことが分かった(図22A)。また、K01593遺伝子を保有する細菌の菌種割合を分析したところ、K01593遺伝子を保有する細菌としてRuminococcus gnavus、Stre

ptomyces ficellus、Faecalicatena sp.、Marseille、Cupriavidus metallig
urans、Bradyrhizobium、Sphingopyxis macrogoltabida、及びBlautia hanse
niiがあり、その大部分はR. gnavusが占めていた（図22B）。

[0171] また、R. gnavus、S. salivarius、S. Pasturianus、及びS. mutansをin v
itroで嫌気性培養し、経時的に培養液中のトリプタミンを測定した。その結
果、これらの菌の中では、R. gnavusのみがトリプタミンを産生することが確
認された（図22C）。

[0172] 以上の結果から、R. gnavusがTryptAを産生しPHを悪化させる原因菌である
と考えられた。そこで、次に、R. gnavusとS. pasteurianusの無菌ラットへ
の投与実験を行った（図22D）。具体的には、11週齢の無菌F344ラットにR. g
navusとS. pasteurianusをそれぞれ単独で又は組み合わせて接種し、4週間か
けて腸内にこれらの細菌を定着させた。15週齢の時点で、モノクロタリンを
皮下投与し、モノクロタリン投与から21日後に、右室収縮期圧及び右室肥大
係数の測定、小腸上皮細胞のqPCR解析、並びに糞中のトリプトファン及びそ
の代謝産物の濃度測定を行った。

[0173] R. gnavus又はS. pasteurianusを接種した場合には右室収縮期圧及び右室
肥大係数の著しい上昇は認められなかったが、R. gnavusとS. pasteurianus
を組み合わせて接種した場合に、相加的な右室収縮期圧及び右室肥大係数の
顕著な上昇が認められた（図22E）。R. gnavusはStreptococcus等の口腔内細
菌と共存してPH重症度と相関していたことから、StreptococcusがR. gnavus
の増殖をサポートしている可能性が考えられた。

[0174] Streptococcusは宿主の小腸上皮細胞に作用してムチン産生を促進すること
が知られている。実際、小腸上皮細胞のqPCRの結果から、小腸上皮細胞での
ムチンの産生がS. pasteurianus存在下でのみ上昇していることも確認された
（図22F）。また、ムチンがR. gnavusの増殖に与える影響を確認するために
、ムチンの有無でR. gnavusの培養実験を行った。その結果、ムチン非存在下
でR. gnavusをin vitroで嫌気培養しても濁度が上昇せず増殖は促進されてい
なかったが、ムチン存在下でR. gnavusをin vitroで嫌気培養すると、濁度が

上昇し、増殖が促進されていた（図22G）。即ち、これらの結果から、*R. gnavus*はPH病態の形成に重要であるTryptAを産生するが、*Streptococcus*が宿主のムチン産生を促し、*R. gnavus*はムチン産生を炭素源として利用し増殖をサポートされることで、相乗的に作用することが示された。

[0175] また、糞中のトリプトファン及びその代謝産物の濃度をLC-MSにより定量したところ、*R. gnavus*単独摂取の場合にはトリプタミン及びIPAの濃度の上昇が認められた（図22H）。更に*R. gnavus*と*S. pasteurianus*を組み合わせで接種した場合にはILA、IPA等の濃度の上昇も認められ（図22H）、糞中AHR活性の上昇が生じていることが示唆された。

[0176] 4－1 1. 吸着炭は様々なトリプトファン代謝産物を吸着し除去する

吸着炭AST-120はインドール硫酸を吸着して腸管での吸収を阻害する経口吸着剤であり、慢性腎不全患者治療として広く使用されている。そこで、AST-120の投与により腸内からトリプトファン代謝産物を除去できるかを確認した。具体的には、6週齢のSDラットに、標準飼料又は8w/w% AST-120含有飼料を1週間与えた後に、糞中のトリプトファン代謝物をLC-MSを用いて解析した（図23A）。その結果、AST-120を投与した群では、糞中のトリプトファン代謝物（TryptA、IAld、IAA、IEt、IPA、及びILA）の顕著な減少が認められた（図23B-G）。一方、AST-120を投与しても、糞中のトリプトファンの減少は認められなかった（図23H）。これらの結果から、吸着炭の投与は、腸内で、必須アミノ酸であるトリプトファンを減じることなく、トリプトファン代謝物（インドール化合物）を除去できることが確認された。

[0177] 4－1 2. 吸着炭は腸内細菌由来トリプトファン代謝産物を吸着してPHを改善する

PHモデルノトバイオトラットに対する吸着炭AST-120投与がPH病態に及ぼす影響を検討した（図24A）。具体的には、11週齢の無菌F344ラットにPH患者由来の便希釈液を投与し、15週齢の時点でモノクロタリンを皮下投与した。モノクロタリンの投与の翌日から、標準飼料又は8w/w% AST-120含有飼料を3週間与えた後に、右室収縮期圧及び右室肥大係数の測定、糞のAHR活性の測定

、及び糞のLC-MS解析を行った。

[0178] AST-120を投与した群では、右室収縮期圧及び右室肥大係数が有意に抑制されており、PH病態が改善されていた（図24B）。また、AST-120を投与した群では、糞のAHR活性も有意に低下していた（図24C）。また、糞のLC-MS解析によりトリプトファン及びその代謝産物の濃度を測定した結果、AST-120を投与した群では、トリプトファン代謝産物（TryptA、IAld、IAA、IEt、IPA、及びILA）の糞中濃度が有意に低下していたが、トリプトファンの糞中濃度の低下は認められなかった（図24D）。即ち、これらの結果から、吸着炭によって腸内のトリプトファン代謝産物を除去することにより、PHの病態を改善できることが確認された。

[0179] 4－13．重症PAH自然発症モデルであるRegnase-1 CD11c-Cre(Reg-1 CK0)マウスを無菌環境で飼育するとPAHの自然発症が抑制され、Reg-1 CK0マウスに吸着炭を投与するとPAH病態形成が抑制される

重症PAHを自然発症する新規モデルとして報告されているRegnase-1 CD11c-Cre(Reg-1 CK0)マウスをSPF環境又は無菌環境にて12週齢まで飼育した後に、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した。この結果、Reg-1 CK0マウスは、SPF環境での飼育下では右室収縮期圧が有意に上昇したが、無菌環境での飼育下では右室収縮期圧の上昇を抑制できていた（図25A）。右室肥大係数はいずれの群も有意な差は無かった（図25B）。

[0180] 次に、Reg-1 CK0マウスへの吸着炭AST-120投与が、PAHの自然発症に及ぼす影響を確認する実験を行った（図25C）。具体的には、0週齢のReg-1 CK0マウスを4週間飼育した後に、標準飼料又は8w/w% AST-120含有飼料を4週間給餌し、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した。この結果、AST-120を投与したReg-1 CK0マウスでは、右室収縮期圧が有意に低下しており、PH病態形成が抑制されていた（図25D）。

[0181] これらの結果からも、PH病態形成には腸内細菌叢の変容が関与しており、腸管からトリプトファン代謝産物を除去することによりPH病態を改善できることが確認された。

[0182] 4-14. モノクロタリン負荷PHモデルラット及び低酸素負荷PHモデルラットに吸着炭を投与するとPH病態形成が抑制される

モノクロタリン負荷PHモデルラットへの吸着炭AST-120投与がPH病態に及ぼす影響を確認した。具体的には、6週齢の雄SDラットにモノクロタリンを皮下投与し、標準飼料又は8w/w% AST-120含有飼料を3週間与えた後に、右室収縮期圧を測定した。この結果、AST-120を投与したラットでは、右室収縮期圧が有意に低下しており、PH病態形成が抑制されていた（図26A）。

[0183] 更に、低酸素負荷PHモデルラットへの吸着炭AST-120投与がPH病態に及ぼす影響を確認した。具体的には、6週齢の雄SDラットを10%酸素条件に維持したチャンバー内に入れた状態で標準飼料又は8w/w% AST-120含有飼料を4週間与えた後に、右室収縮期圧及び右室肥大係数を測定した。この結果、AST-120を投与したラットでは、右室収縮期圧が有意に低下しており、PH病態形成が抑制されていた（図26B）。

[0184] これらの結果からも、腸管からトリプトファン代謝産物を除去することによりPH病態を改善できることが確認された。

[0185] 4-15. 吸着炭はインドール化合物を吸着する

AST-120（CAS: 90597-58-3、株式会社クレハ）、薬用炭（CAS: 16291-96-6、日医工株式会社）、及び造粒活性炭（CAS: 7440-44-0、株式会社ユー・イー・エス）の各種化合物に対する吸着能を評価した。具体的には、3-アミノイソ酪酸、L-バリン、L-グルタミン酸、L-トリプトファン、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、又はインドール-3-酢酸を含む水溶液に各吸着炭（AST-120、薬用炭、及び造粒活性炭）を添加して、吸着炭の各化合物に対する吸着率を測定した。その結果、AST-120、薬用炭、及び造粒活性炭は、いずれも、3-アミノイソ酪酸、L-バリン、及びL-グルタミン酸に対する吸着率が低い、L-トリプトファン、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、及びインドール-3-酢酸に対する吸着率が高いことが確認された（図27）。本結果から、吸着炭はインドール化合物を効率的に吸着できることが明らかとなった。

[0186] 本開示は、前記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で示した文献等の内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

- [請求項1] トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を腸管内から除去できる物質を含む、肺高血圧症の予防又は治療薬。
- [請求項2] 前記物質が、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物に吸着又は結合する物質である、請求項1に記載の肺高血圧症の予防又は治療薬。
- [請求項3] 前記インドール化合物が、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-エタノール、インドール-3-酢酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-アクリル酸、及びインドール-3-乳酸よりなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1又は2に記載の肺高血圧症の予防又は治療薬。
- [請求項4] 前記物質が多孔質無機吸着剤である、請求項1又は2に記載の肺高血圧症の予防又は治療薬。
- [請求項5] 前記物質が吸着炭である、請求項1又は2に記載の肺高血圧症の予防又は治療薬。
- [請求項6] 肺高血圧症患者の腸管内から、トリプトファン代謝産物であるインドール化合物を除去する工程を含む、肺高血圧症の治療方法。
- [請求項7] トリプトファン代謝産物であるインドール化合物に吸着又は結合する物質の治療有効量を肺高血圧症患者に投与することにより、肺高血圧症患者の腸管内から当該インドール化合物を除去する、請求項6に記載の肺高血圧症の治療方法。
- [請求項8] 肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度を検査する方法であって、
被験者から採取された便、腸管内容物又は血液サンプル中のトリプトファン濃度を測定する工程を含む、検査方法。
- [請求項9] トリプトファンを測定するための試薬を含む、肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度の検査キット。
- [請求項10] 肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度を検査する方法で

あって、

被験者から採取された便、腸管内容物又は血液サンプル中のトリプトファンの代謝産物であるインドール化合物の濃度を測定する工程を含む、検査方法。

[請求項11] 前記インドール化合物が、トリプタミン、インドール-3-アルデヒド、インドール-3-ピルビン酸、インドール-3-エタノール、インドール-3-酢酸、インドール-3-プロピオン酸、インドール-3-アクリル酸、及びインドール-3-乳酸よりなる群から選択される少なくとも1種である、請求項10に記載の検査方法。

[請求項12] トリプトファンの代謝産物であるインドール化合物を測定するための試薬を含む、肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度の検査キット。

[請求項13] 肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度を検査する方法であって、

被験者から採取された便又は腸管内容物の芳香族炭化水素受容体の活性を測定する工程を含む、検査方法。

[請求項14] 便又は腸管内容物の芳香族炭化水素受容体の活性を測定するための試薬を含む、肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度の検査キット。

[請求項15] 肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度を検査する方法であって、

被験者から採取された便、腸管内容物又は血液サンプル中のアンジオテンシン変換酵素2濃度を測定する工程を含む、検査方法。

[請求項16] アンジオテンシン変換酵素2を測定するための試薬を含む、肺高血圧症の罹患の有無又は肺高血圧症の重症度の検査キット。

[請求項17] アンジオテンシン変換酵素2の発現量を増大させる物質を含む、肺高血圧症の予防又は治療薬。

[請求項18] アンジオテンシン変換酵素2の発現量を増大させる物質の治療有効

量を、肺高血圧症患者に投与する工程を含む、肺高血圧症の治療方法

。