

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 29 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580369

研究課題名（和文）臨床応用を前提としたエンドセリンの基礎的研究

研究課題名（英文） Studies on endothelin for clinical use

研究代表者

打出 毅 (Uchide Tsuyoshi)

酪農学園大学 獣医学部・教授

研究者番号：20327456

研究成果の概要（和文）：本研究では血管内皮由来の生理活性ペプチドであるエンドセリン（ET-1）が犬の呼吸循環器疾患および腫瘍性疾患において診断や予後判断の有効なマーカーとして利用可能であるかを検討した。呼吸循環器疾患である僧房弁逆流、三尖弁逆流、肺高血圧症が認められる犬では健康犬に比べ血中 ET-1 が有意に高値であった。また、腫瘍性疾患の 1 つである血管肉腫に罹患している犬において、血中 ET-1 が他の腫瘍性疾患に比べ有意に高値であった。以上より、血中 ET-1 濃度これらの疾患の診断マーカーとして利用できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Endothelin-1 (ET-1) is a bioactive peptide derived from vascular endothelial cells. Although ET-1 has recently received a lot of attention in human medicine because of its involvement in the pathophysiology of many diseases including heart failure, pulmonary hypertension, renal failure and tumors, no detailed studies on the clinical importance of ET-1 have been performed in veterinary medicine. In this study we investigated the feasibility of using ET-1 as a novel clinical marker to diagnose or assess the prognosis in canine cardiopulmonary and neoplastic disease. Dogs affected with cardiopulmonary disease, mitral valve regurgitation, tricuspid valve regurgitation and pulmonary hypertension, showed a significant increase in serum ET-1 levels compared to healthy dogs. In dogs presenting with hemangiosarcoma, a tumor that originates from vascular endothelial cells, significantly higher serum levels of ET-1 were observed than in dogs with non-neoplastic diseases or with neoplastic diseases other than hemangiosarcoma. Our observations suggest that serum ET-1 levels could be a novel clinical marker for these diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：獣医学、伴侶動物、内科学、呼吸循環器、腫瘍、エンドセリン

1. 研究開始当初の背景

(1) エンドセリンは血管内皮細胞由来の生

理活性物質であり強い血管平滑筋収縮作用を有することから、発見当初は血圧調節因子

として注目されたが、近年、ヒトの心不全や肺高血圧症などの心筋や血管病変を伴う疾患で増悪因子として注目されるようになった。ヒトの心不全時の心臓や肺高血圧症時の肺ではエンドセリンの発現量が著しく増加しており、このことが心筋や血管壁のリモデリングを惹起し、これらの疾患を増悪させると考えられている。従って医学領域では、これらの疾患の治療薬としてエンドセリンインヒビターが適応されている。また、ヒトの呼吸循環器疾患の患者では血中エンドセリン濃度が高値を示すことから、病態を示すマーカーとして有望視されている。

(2) 医学領域においてエンドセリンの発現が種々の腫瘍組織で確認されており、エンドセリンが持つ細胞増殖促進作用や血管新生刺激作用が腫瘍の増殖に一定の役割を果たしていることが明らかになっている。腫瘍組織において腫瘍細胞に栄養や酸素を供給する血管の新生は腫瘍の更なる増殖・転移に重要な役割を果たしているが、エンドセリンはこの血管新生時に中心的役割を果たしている血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生を局所で刺激することから、医学領域ではエンドセリンに着目した腫瘍の治療法が検討されている。

(3) しかしながら、獣医学領域では、エンドセリンの呼吸循環器疾患や腫瘍性疾患における役割について検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では実際の犬の臨床例を題材にして、

(1) エンドセリンが呼吸循環器疾患や (2) 腫瘍性疾患の診断や予後判断の有効なマーカーとして利用可能であるかを検討する。エンドセリンは血管内皮由来の生理活性ペプチドであることから、血管内皮由来の腫瘍である血管肉腫を題材に検討する。

3. 研究の方法

(1) 呼吸循環器疾患

① 自然発症僧房弁逆流罹患犬での検討

酪農学園大学附属動物病院に来院した僧房弁逆流罹患犬を対象とした。検査項目は、臨床症状 (臨床的ステージ分類)、一般血液検査、胸部 X 線検査、超音波検査、血中エンドセリン濃度測定で、臨床的病期 (臨床的重症度) と血中エンドセリン濃度の関連性について検討した。

② 心毒性薬物投与犬における検討

酪農学園大学附属動物病院に来院した犬のうち、腫瘍性疾患の治療のためにドキソルビシン (心毒性のある抗がん剤) を投与されている犬を対象とした。検査項目は、超音波検査と血中エンドセリン濃度および血中 NT-pro-BNP 濃度の測定で、血中エンドセリン

濃度と心筋障害 (心毒性発現) との関連性について検討した。

③ 実験的に作出した肺高血圧症モデル犬での検討

実験動物犬を用い、ピーズによる肺高血圧モデルを作成した。検査項目は、超音波検査、肺動脈圧測定と血中エンドセリン濃度、血中 NT-pro-BNP 濃度および血中 ANP 濃度の測定で、血中エンドセリン濃度と肺高血圧の重症度との関連性について検討した。

④ 自然発症肺高血圧症罹患犬での検討

酪農学園大学附属動物病院に来院した三尖弁逆流罹患犬を対象とした。検査項目は、臨床症状、一般血液検査、胸部 X 線検査、超音波検査、血中エンドセリン濃度測定で、超音波検査による右心機能パラメーターと血中エンドセリン濃度の関連性について検討した。

(2) 腫瘍性疾患

酪農学園大学附属動物病院に来院し、脾臓の血管肉腫が疑われる症例を対象とした。検査項目は臨床症状、一般血液検査、胸部・腹部 X 線検査、腹部超音波検査、血中エンドセリン濃度測定で、血管肉腫と血中エンドセリン濃度の関連性について検討した。血管肉腫の確定診断は脾臓摘出術後の病理学的検査によって行った。病理検査によって血管肉腫と診断された場合は血管肉腫群、血管肉腫以外の腫瘍と診断された場合は血管肉腫以外の腫瘍群、腫瘍性疾患以外の疾患と診断された場合は非腫瘍性疾患群として分類した。

4. 研究成果

(1) 呼吸循環器疾患

① 自然発症僧房弁逆流罹患犬での検討

僧房弁逆流罹患犬では健常犬に比べ血中エンドセリン濃度の有意な上昇が確認されたが、臨床的重症度と血中濃度との間に有意な関連性は認められなかった。臨床的重症度と血中濃度との間に有意な関連性が認められなかったことは、血中エンドセリン濃度に大きな影響を与える肺組織でのエンドセリン産生が僧帽弁逆流では顕著でないことを示唆している。

② 心毒性薬物投与犬における検討

ドキソルビシン投与前 (pre)、投与後 1、2、3、4、5、6 か月の血中 NT-pro-BNP 濃度と血中エンドセリン濃度の変化を調べたところ、いずれのパラメーターについても僧房逆流を持つ犬 (供試犬 2) で顕著な上昇がみられたが、心疾患を持たない犬 (供試犬 1 および 3) では上昇は見られなかった。また、血中エンドセリン濃度の上昇は臨床症状や超音波所見に異常を認める前に確認された (図 1, 2)。これらのことから、血中エンドセリンは心筋障害の鋭敏なマーカーとなる可能性

が示された。

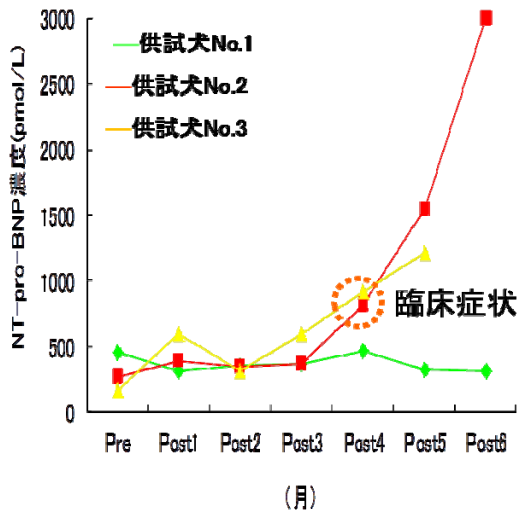


図1 血中 NT-pro-BNP 濃度の変化

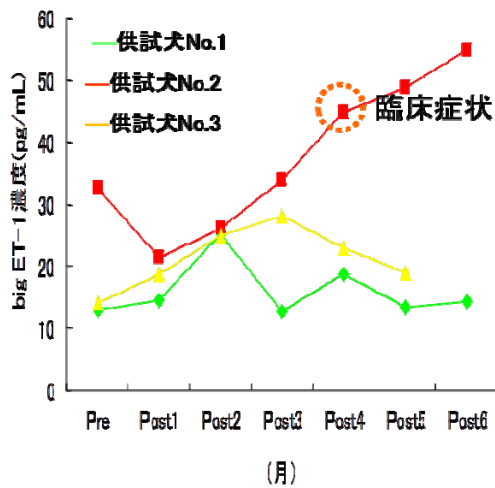


図2 血中エンドセリン濃度の変化

③実験的に作出した肺高血圧症モデル犬での検討

肺高血圧モデル犬では心エコー検査によって、肺動脈血圧の上昇、右心への圧負荷および容量負荷、右心室拡張障害の所見が得られ、肺高血圧による右心負荷が確認された。血中 ANP 濃度、NT-proBNP 濃度は肺動脈血圧および肺動脈径・大動脈径比と相関が認められ、犬の肺高血圧における有用なバイオマーカーに成り得ることが示唆された。しかし、血中エンドセリン濃度は観察期間を通して低く推移し、症状、心エコー所見、ANP、NT-proBNP と相関しなかった。

④自然発症肺高血圧症罹患犬での検討

血中 ET-1 濃度を重症度別に群を分け (normal 群 : 10pg/mL 未満, moderate 群 : 10~25pg/mL, severe 群 : 25pg/mL 以上)、各検査項目について比較検討を行なったところ、三尖弁逆流速、三尖弁拡張早期 (E) 波、組織ドップラーによる三尖弁輪部拡張早

期 (E') 波、心房収縮期 (A') 波および E' / A' 比において群間で有意差が認められた。また、big ET-1 濃度と NT-proBNP 濃度、三尖弁逆流速、心房収縮期 (A) 波、ならびに E/E' 比で相関が認められた。severe 群において、推定肺動脈圧の上昇 (図 3)、右心への圧負荷および容量負荷 (図 4)、右心室拡張障害が示唆された。また、血中 ET-1 濃度と三尖弁逆流速、E 波、A 波、E/A 比と相関が認められ、血中 ET-1 濃度は犬の肺高血圧における有用なバイオマーカーに成り得る事が示唆された。

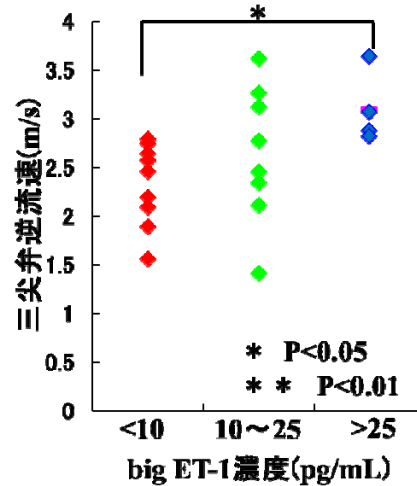


図3 三尖弁逆流速と血中エンドセリン濃度

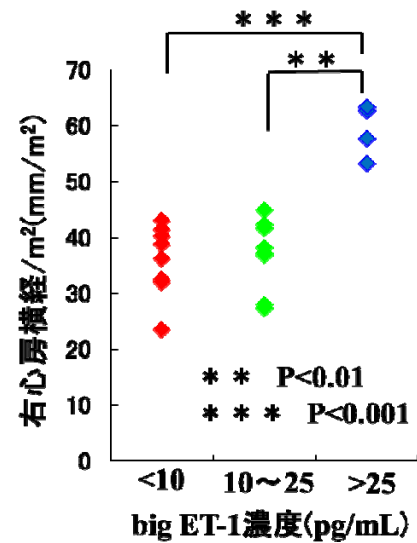


図4 右心房横径と血中エンドセリン濃度

(2) 腫瘍性疾患

健常犬の血中 ET-1 濃度は 5.86 ± 3.28 pg/mL であるのに対し、血管肉腫群では 25.79 ± 7.23 pg/mL、血管肉腫以外の腫瘍群では 5.65 ± 7.20 pg/mL、非腫瘍性疾患群では 5.23 ± 6.71 pg/mL であった。また、血中 ET-1 濃度は血管肉腫の切除手術後、著しく減少し、再発時には上昇した (図 5、6)。これらのことから、血中 ET-1 濃度は血管肉腫の腫瘍マーカーとして利用できる可能性が示された。

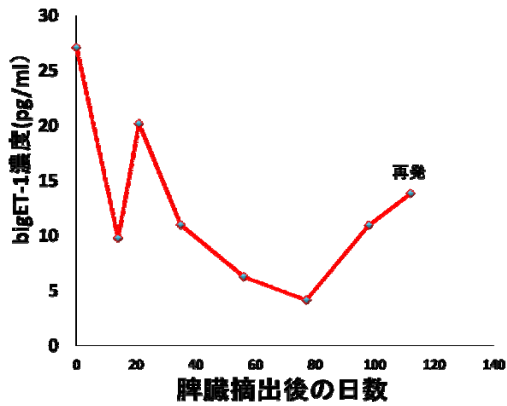


図5 血管肉腫摘出後の血中エンドセリン濃度の変化

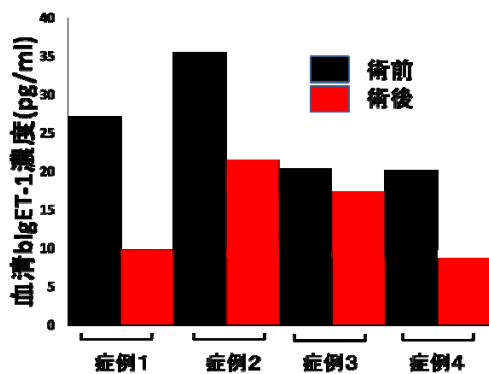


図6 術前、術後の血中エンドセリン濃度の比較

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計6件)

1. Fukumoto S, Hanazono K, Kawasaki N, Hori Y, Higuchi S, Sasaki T, Temma K, **Uchide T**. Anaplastic atypical myeloma with extensive cutaneous involvement in a dog. J Vet Med Sci (査読有) 74巻 2012 111-115
2. Sasaki T, Ueno S, Hara Y, **Uchide T**, Temma K. Antimuscarinic action of doxorubicin does not involve free-radical formation in isolated guinea pig hearts. Can J Physiol Pharmacol (査読有) 88巻 2010 77-81
3. Itoh, H, Horiuchi, Y, Nagasaki, T, Sakonju, I, Kakuta, T, Fukushima, U, **Uchide, T**, Yamashita, M, Kuwabara, M, Yusa, S, Takase, K. Evaluation of immunological status in tumor-bearing dogs. Vet. Immunol. Immunopathol. (査読有) 123巻 2009 85-90
4. 華園究 **打出毅** 泌尿器の腫瘍性疾患 SA Medicine (査読なし) 13巻 2012 5-14

5. 華園究 **打出毅** 尿検査 SA Medicine (査読なし) 14巻 2012 40-50

6. 華園究 **打出毅** 胸腔の腫瘍 SA Medicine (査読なし) 14巻 2012 82-92

〔学会発表〕(計25件)

1. 華園究 福本真也 石井俊治 布施辰樹 **打出毅** 犬の肺高血圧症における血清big-ET-1濃度と心エコーパラメーターとの比較検討 獣医内科学アカデミー学術大会 2012年2月18日 横浜
2. 華園究 福本真也 石井俊治 布施辰樹 **打出毅** 犬における超音波検査による右房径測定の有用性の検討日本獣医循環器学会 2011年12月2日 名古屋
3. 華園究 布施辰樹 石井俊也 福本真也 **打出毅** 右心房と右心室にSpontaneous echocardiographic contrastが認められた三尖弁異形成の猫の1例 第32回動物臨床医学会年次大会 2011年11月19日 大阪
4. 華園究 福本真也 石井俊治 布施辰樹 **打出毅** 三尖弁血流速度波形、三尖弁輪運動速度波形による犬の右室機能評価 平成23年度北海道地区三学会 2011年9月8日 札幌
5. 石井俊治 齊藤靖生 布施辰樹 華園究 福本真也 **打出毅** 腹大動脈血栓症を併発した消化器型リンパ腫の犬1例 平成23年度北海道地区三学会 2011年9月8日 札幌
6. 布施辰樹 石井俊治 福本真也 平山和子 谷山弘行 遠藤能史 廉澤剛 **打出毅** 赤血球貪食性組織球肉腫と診断された犬4例 平成23年度北海道地区三学会 2011年9月8日 札幌
7. 福本真也 佐藤倫子 華園究 賀川由美子 **打出毅** 犬胆嚢粘液嚢腫におけるABCB4 遺伝子検査の有用性 日本獣医内科アカデミー2010年大会 2011年3月12日 横浜
8. 華園究 福本真也 中出哲也 内田英二 三好健二郎 平山和子 廉澤剛 谷山弘行 **打出毅** 犬の消化管間質腫瘍(GIST)5例の腫瘍径と画像検査,病理組織検査所見の比較 日本獣医内科アカデミー2010年大会 2011年3月12日 横浜
9. 福本真也 華園究 廉澤剛 **打出毅** 赤血球貪食性組織球性肉腫の1例 第31回動物臨床医学会年次大会 2010年11月20日 大阪
10. 華園究 福本真也 中出哲也 三好健二郎 内田英二 平山和子 谷山弘行 廉澤剛 **打出毅** 犬の消化管間質腫瘍(GIST)4例の画像所見 第31回

動物臨床医学会年次大会 2010年11月20日 大阪

11. 華園究 福本真也 田村純 北島哲也 廉澤剛
内田英二 **打出毅** 緩和的化学療法により長期維持されたLGLリンパ腫の猫の1例 平成22年度北海道地区三学会 2010年9月10日 函館

12. 福本真也 **打出毅** 賀川由美子 廉澤剛 犬リンパ腫の診断におけるフローサイトメトリー(FC)の有用性 平成22年度北海道地区三学会 2010年9月10日 函館

13. 齋藤靖生 諫山紀子 苗村智水 **打出毅**
内田英二 非定型アジソン病の犬の1例 平成22年度北海道地区三学会 2010年9月10日 函館

14. 石井俊治 林美希 齋藤靖生 福本真也 華園究 内田英二 **打出毅** 自己免疫疾患の犬2症例におけるステロイド療法と制御性T細胞(Treg)の推移平成22年度北海道地区三学会 2010年9月10日 函館

15. **打出毅** 臨床徴候からのアプローチ「腹腔内腫瘍」日本獣医臨床病理学会2010年大会 2010年2月14日 東京

16. 華園究 **打出毅** 中村健介 中村篤史 田村淳 苗村智水 諫山紀子 廉澤剛 内田英二 北島哲也 緩和的化学療法により長期維持されたLGLリンパ腫が疑われた猫の1例 日本獣医臨床病理学会 2010年大会 2010年2月14日 東京

17. 苗村智水 諫山紀 加山朋 中村篤 平山和 内田英二 **打出毅** 肺に結節状腫瘍を呈した犬リンパ腫の1例 日本獣医内科アカデミー2010年大会 2010年2月14日 東京

18. 諫山紀子 苗村智 前田浩人 平山和子 内田英二 **打出毅** 気管支軟骨異形性による肺気腫を認めた犬の一例 日本獣医内科アカデミー2010年大会 2010年2月14日 東京

19. 苗村智水 諫山紀子 加山朋欣 中村篤史 平山和子 谷山弘行 内田英二 **打出毅** 肺原発と考えられたイヌのリンパ腫の1例 平成21年度北海道地区三学会 2009年9月4日 札幌

20. 内田英二 山倉麻由美 華園究 町田竜彦 松田憲児 **打出毅** 人用シスタチンC検査試薬の犬への応用と実用性の検討平成21年度北海道地区三学会 2009年9月4日 札幌

21. 諫山紀子 苗村智水 中村篤史 華園究 内田英二 **打出毅** 免疫介在性疾患に対するセファランチンの併用療法 21年度北海道地区三学会 2009年9月4日 札幌

22. Quan, J, Takizawa, S, Adur, J, Nara, E, **Uchide, T, Saida, K.**
Frog endothelins: cDNA cloning, sequence and evolutionary analysis of endothelins. Eleventh International Conference on Endothelin Sep 9, 2009 Montreal, Canada

23. **Uchide, T, Saida, K,** Sasaki, T, Temma, K. Elevated endothelin-1 expression in dogs with naturally occurring cardiovascular disorders. Eleventh International Conference on Endothelin Sep 9, 2009 Montreal, Canada

24. 華園究 川畑智敬 中村篤史 **打出毅** 内田英二 マキサカルシトール軟膏により高カルシウム血症を呈した犬の1例 日本獣医内科アカデミー2009年大会 2009年2月15日 東京

25. 西田暁子 中村篤史 華園究 金修敏 濱田興 堀知織 藪崎尚弘 平山和子 谷山弘行 内田英二 **打出毅** 長期生存を認めたイヌのT細胞性消化器型リンパ腫の一例 日本獣医内科アカデミー2009年大会 2009年2月15日 東京

〔産業財産権〕〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: エンドセリン-2/VIC に対する特異的な抗体、作製方法、およびその用途

発明者: 齋田要 瀧澤聡 小酒井貴晴 **打出毅**

権利者: 産業総合研究所

種類: 特許

番号: 第4635265号

取得年月日: 2010年12月3日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

打出毅 (Uchide Tsuyoshi)

酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号: 20327456

(2) 連携研究者

齋田要 (Saida Kaname)

独立行政法人産業技術総合研究所・

バイオニクス研究センター・研究員

研究者番号: 00357055