

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 25 年 8 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22500439

研究課題名（和文） 超音波を用いた心筋の p53 および mTOR 制御によるアントラサイクリン心毒性の軽減

研究課題名（英文） A preliminary study for reduction of anthracycline-induced cardiotoxicity by regulation of p53 and mTOR in myocardium using ultrasound

研究代表者

水野 麗子（MIZUNO REIKO）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80398437

研究成果の概要（和文）：

我々は、以前に超音波照射併用による Rituximab と Cetuximab の抗腫瘍効果増強について報告した。今回、Edaravone と Pifithrin の心毒性抑制効果が超音波照射併用により増強し、少量投与で心筋特異的な有効性が得られるかを検討した。また、左室収縮末期壁心力-心拍数補正左室円周短縮速度関係(WS-Vcf relationship)を用い、アントラサイクリン心毒性の早期検出についての臨床研究も行った。超音波照射による有意な心毒性抑制効果の増強は認められず、超音波照射条件に関してさらなる検討を重ねる予定である。臨床研究では、負荷非依存的な WS-Vcf relationship によりアントラサイクリン心毒性の早期検出が可能であった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether the cardioprotective effects of edaravone and pifithrin were increased with ultrasound exposure. In addition, clinical research about early detection of anthracycline-induced cardiotoxicity was performed using left ventricular end-systolic wall stress-velocity of circumferential fiber shortening relationship (WS-Vcf relationship). Significant enhancement of the cardioprotective effects of these agents with ultrasound exposure was not seen. We plan the further investigation about the condition of ultrasound exposure. In the clinical research, WS-Vcf relationship was useful for the detection of the early anthracycline-induced cardiotoxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 24 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波医科学

1. 研究開始当初の背景

アントラサイクリンは、強力な抗癌作用を有する一方で、不可逆的な心毒性を生じることが知られているが、現在、心毒性発現に対する有効な対策は確立されていない。近年、低用量のアントラサイクリン投与下でも心毒性が出現することが報告され、心毒性回避の

ための有効かつ安全性の高い対策の確立が喫緊の課題となっている。近年、in vitro での実験において脳神経保護剤である Edaravone がアントラサイクリンの薬効を減弱することが報告され、心毒性抑制への応用が期待される。しかし、腎障害作用を有する Edaravone の臨床使用においては、低用量で

心筋特異的にアントラサイクリンの薬効を減弱させる方策の開発が不可欠である。研究者らは、超音波の生体作用の中で、非熱作用の1つであるキャビテーション作用に注目し、薬剤単独投与より超音波照射を併用した方が、薬効が相乗的に増強することを CD 陽性リンパ腫細胞と抗 CD 抗体 (Rituximab) および EGFR 発現頭頸部扁平上皮癌由来細胞と抗 EGFR 抗体 (Cetuximab) との基礎的実験で示した。そこで、Edaravone に関しても超音波照射併用により薬効が増強し、少量投与での有効性が期待される。また、近年、アントラサイクリンの心毒性発現に p53 の関与が報告され、メカニズムとして p53 による直接的な心筋細胞のアポトーシス誘導と p53 を介した mTOR 機能の活性低下の2経路が注目されている。そこで、p53 の機能制御による心毒性抑制に関心が持たれているが、p53 機能制御物質の臨床使用においては発癌誘発の観点から、低用量で心筋特異的に p53 の機能を制御する手法が不可欠であり、超音波照射併用により実現し得る可能性がある。

2. 研究の目的

前項で述べた最近の知見を踏まえ、これらの成果をさらに発展させるための超音波照射併用の有用性を実証するために以下の研究を計画した。

(1) まず、超音波照射単独による細胞障害について種々の超音波照射条件を設定することにより検討する。

(2) 次に、細胞障害が少ない超音波照射条件を設定し、Edaravone のアントラサイクリンの効果減弱作用が超音波照射併用により増強されるかを検討する。

(3) (2) で超音波照射併用によりアントラサイクリンの効果減弱が確認された超音波照射や薬剤投与のタイミングなどの諸条件下で、Edaravone と同様に p53 機能制御物質 (Pifithrin) のアントラサイクリンの効果減弱作用が超音波照射併用により増強されるかを検討する。

(4) また、心臓超音波を用いた潜在的なアントラサイクリン心毒性の検出についての臨床研究も行った。

3. 研究の方法

(1) まず、ラット心臓横紋筋細胞 (H9c2) を用い、超音波照射単独による細胞障害を調査した上で、超音波照射の至適条件について検討した。超音波照射には、1-MHz generator (Sonic master) を用いた。超音波照射条件としては、以下の5つの条件 (20% duty factor: 0.5 W/cm² x 1 min, 0.3 W/cm² x 1 min, 10% duty factor: 0.5 W/cm² x 1 min, 0.3 W/cm² x 1 min, 0.3 W/cm² x 15 min) を設定した。35 mm の dish で H9c2 を 24 時間培養した後に、上記の各条件で超音波照射を行い、その後さらに 24 時間培養した後に cell survival (WST-8 assay) に加え、apoptosis および necrosis (apoptotic & necrotic cell detection kit;

FITC-annexin V, propidium iodide (PI)) の程度を評価した。

(2) 次に、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞 (MOLT4) を用い、Edaravone の Doxorubicin に対する防護効果が超音波照射により増強されるかを検討した。以下の6群 (control、Edaravone のみ添加 (E 群)、Doxorubicin のみ添加 (D 群)、超音波照射単独 (U 群)、Edaravone と Doxorubicin を添加 (E+D 群)、Edaravone と Doxorubicin を添加に加えて超音波照射併用 (E+D+U 群)) で cell survival (WST-8 assay) に加え、apoptosis および necrosis (apoptotic & necrotic cell detection kit; FITC-annexin V, propidium iodide (PI)) の程度を評価した。MOLT4 (2M cells /ml) を 35 mm の dish で培養した後、前述の6群を作成した。E 群あるいは D 群では、それぞれ Edaravone (0.5 μM/2ml)、Doxorubicin (1 μM) を投与した後、24 時間培養し、評価を行った。U 群では、0.4 W/cm²、1 分間の超音波照射を行った後、同様に 24 時間培養し、評価を行った。E+D 群では、まず、Edaravone (0.5 μM/2ml) を投与し、30 分の培養後に Doxorubicin (1 μM) を投与し、さらに 24 時間培養した後に、評価を行った。E+D+U 群では、まず、Edaravone (0.5 μM/2ml) を投与し、30 分の培養後に 0.4 W/cm²、1 分間の超音波照射を行い、5 分後に Doxorubicin (1 μM) を投与し、その後 24 時間培養した後に、評価を行った。

(3) (2) で Edaravone の超音波照射併用による防護効果増強が確認された場合、超音波照射や薬剤投与のタイミングなどの諸条件を (2) と同様に設定し、(2) と同様の実験系において Edaravone を Pifithrin (30 μmol/L) に置き換えて、アントラサイクリンの効果減弱作用が超音波照射併用により増強されるかを H9c2 を用いて検討する。

(4) 臨床研究では、明らかな心機能障害を有さない無症状のアントラサイクリン投与例を対象に左室収縮末期壁応力-心拍数補正左室円周短縮速度関係 (WS-Vcf relationship) について心臓超音波を用いて評価し、年齢や性別を一致させた健常例と比較した。

4. 研究成果

(1) 超音波照射単独による細胞障害について種々の照射条件を設定して検討した結果、以下の結果 (図 1 と 2) が得られた。10% duty factor-0.3 W/cm²-1 min の条件下で、cell survival が最も高く、細胞死の程度は FITC-annexin V および propidium iodide (PI) とともに最も低値を示した。この照射条件は、キャビテーション作用を利用した薬効増強に最適な照射条件を検討する上で、重要な基礎的設定条件になると考えられる。

図 1

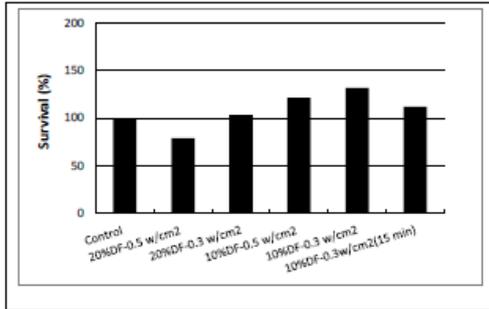
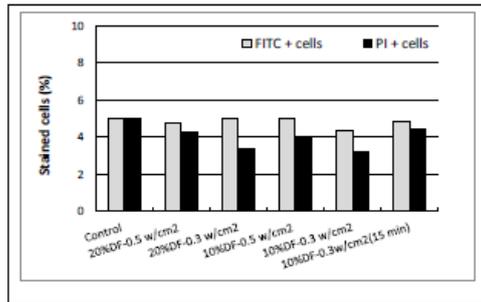


図 2



(2) Edaravone の Doxorubicin に対する防護効果についての検討では、以下の結果 (図 3 と 4) が得られた。

図 3

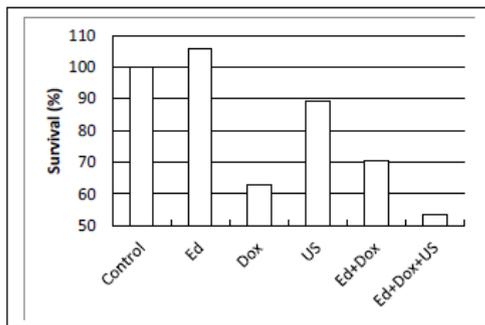
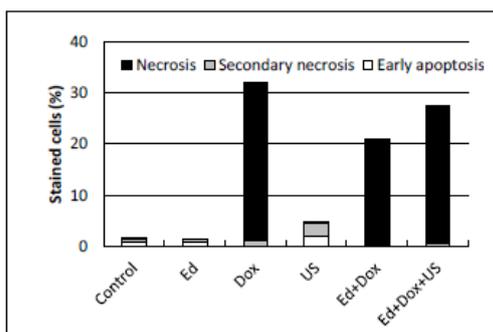


図 4

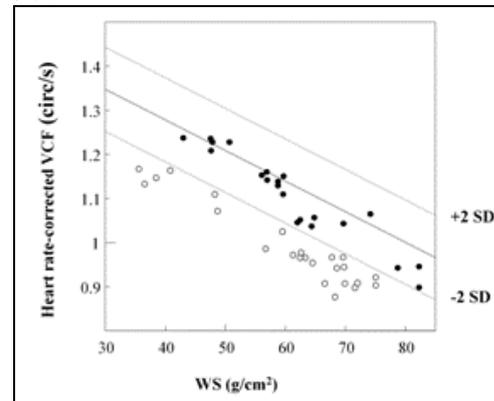


Cell survival は、D 群で 62%であったのに対して D+E 群では 71%であり、Edaravone の Doxorubicin に対する防護効果が確認された。一方、D+E+U 群では、cell survival は 54%であり、われわれの予想とは異なり、超音波併用による Edaravone の防護効果の増強は認められないだけでなく、反対に Doxorubicin による細胞死を増強させる結果であった。細胞死に関しても cell survival と同様の傾向

がみられ、D 群が最も高く 32%であり、D+E 群では 22%、D+E+U 群では 27%であった。超音波照射併用は、Edaravone の Doxorubicin に対する防護効果を減弱させる結果であった。われわれは、これまでの検討で B 細胞性リンパ腫細胞に対する Retuximab および頭頸部癌細胞に対する Cetuximab の超音波照射併用による抗腫瘍効果の増強 (科学研究費補助金 課題番号 21500450) を確認しており、当初のわれわれの予想では、Edaravone の Doxorubicin に対する防護効果が超音波照射により増強することを期待していた。しかし、得られた結果は、予想に反し、超音波照射により防護効果が減弱した。理由として、超音波照射によって Edaravone の防護効果より Doxorubicin の抗腫瘍効果がより増強された可能性や超音波照射自体の細胞障害などが考えられる。超音波照射と Edaravone および Doxorubicin のそれぞれの投与のタイミングや超音波照射強度についてさらに検討を重ね、Edaravone の超音波照射併用による防護効果増強が得られる条件下で Pifithrin の超音波照射併用による Doxorubicin の効果減弱作用増強についてさらに検討を重ねる予定である。

(3) 臨床研究においては、以下のアントラサイクリン投与群と健常群の WS-Vcf relationship が得られた (図 5)。

図 5



負荷非依存的な心筋収縮能の低下がアントラサイクリン投与群の半数以上において認められ、WS-Vcf relationship はアントラサイクリン心毒性の早期検出に有用である可能性が示唆された。なお、この臨床研究結果については、論文掲載予定である (Heart and Vessels (in press))。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

(1) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Detection of latent anthracycline-induced cardiotoxicity using left ventricular end-systolic wall stress-velocity of

circumferential fiber shortening relationship, Heart and Vessels, 査読あり, in press

(2) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Optimal antihypertensive level for improvement of coronary microvascular dysfunction: the lower, the better?, Hypertension, 査読あり, Vol. 60, No. 2, 2012, pp. 326-332

(3) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Complete occlusion of the left main coronary artery trunk, Internal medicine, 査読あり, Vol. 51, No. 18, 2012, pp. 2669

(4) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yasuyuki Okamoto, Mediastinal huge non-Hodgkin's lymphoma causing compression of the main pulmonary artery trunk, British medical journal case reports, 査読あり, Aug 2, 2012

(5) Shinichi Fujimoto, Cardiac sympathetic activity and left ventricular dyssynchrony: an old and new issue, 査読あり, Vol. 76, No. 2, 2012, pp. 295-296

(6) Reiko Mizuno, Yoshiyuki Hayata, Shigeki Taniguchi, Yoshihiko Saito, Shinichi Fujimoto, Giant left atrial myxoma causing severe pulmonary hypertension, Journal of echocardiography, 査読あり, Vol. 9, No. 4, 2011, pp. 151-153

(7) 藤本眞一, 水野麗子, 森嶋良一, UCG の報告書をどう読むか、査読あり, JIM, Vol. 21, No. 4, 2011, pp. 268-273

(8) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Shinobu Nakamura, Cardiac Raynaud's phenomenon induced by cold provocation as a predictor of long-term left ventricular dysfunction and remodelling in systemic sclerosis: 7-year follow-up study, European journal of heart failure, 査読あり, Vol. 3, No. 12, 2010, pp. 268-275

(9) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Shinobu Nakamura, Exercise-induced delayed onset of left ventricular early relaxation in association with coronary microcirculatory dysfunction in patients with diabetes mellitus, Journal of cardiac failure, 査読あり, Vol. 3, No. 16, 2010, pp. 268-275

[学会発表] (計 29 件)

(1) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Detection of masked anthracycline-induced cardiotoxicity using left ventricular

end-systolic wall stress-velocity of circumferential fiber shortening relationship, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月, 横浜

(2) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Exaggerated blood pressure response to exercise as negative predictor of antihypertensive treatment-induced regression of myocardial hypertrophy in hypertensive patients, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月, 横浜

(3) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Relationship between insulin resistance and impaired left ventricular early relaxation in metabolic syndrome, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月, 横浜

(4) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Latent cardiac dysfunction in Systemic Sclerosis with Cardiac Raynaud's Phenomenon Induced by Cold Provocation: detection using new strain index, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月, 横浜

(5) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Impact of subclinical thyroid dysfunction on left ventricular contractility in post-menopausal women: 7-years follow-up study, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月, 横浜

(6) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Detection of latent myocardial dysfunction in post-menopausal women with subclinical hypothyroidism using new strain index, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月, 横浜

(7) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Impact of Mitral Ring Dyssynchrony on Functional Mitral Regurgitation in Ischemic Cardiomyopathy, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 2013 年 3 月, 横浜

(8) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yasuyuki Okamoto, Assessment of early manifestation of anthracycline-induced cardiomyopathy in patients with preserved left ventricular ejection fraction, 第 12 回アジア臨床病理臨床検査医学会, 2012 年 11 月, 京都

(9) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Chronic pulmonary thromboembolism associated with protein C deficiency

presenting remarkable pulmonary artery dilatation, 第23回日本心エコー図学会学術集会, 2012年4月、大阪

(10) 水野麗子, 藤本眞一, 岡本康幸, 2型糖尿病における食後高血糖が血管内皮機能に与える影響に関する検討, 第59回日本臨床検査医学会学術集会, 2012年11月、京都

(11) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Mechanical dyssynchrony in anthracycline-induced cardiomyopathy with preserved left ventricular ejection fraction, 第76回日本循環器学会総会学術集会, 2012年3月, 福岡

(12) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Impaired coronary microvascular function and myocardial structural change in post-menopausal women: association with subclinical thyroid dysfunction, 第76回日本循環器学会総会学術集会, 2012年3月, 福岡

(13) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Relation of coronary microvascular dysfunction with cardiac Raynaud's phenomenon induced by cold provocation in systemic sclerosis, 第76回日本循環器学会総会学術集会, 2012年3月, 福岡

(14) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, An adult case of giant atrial septal defect: useful of real-time three-dimensional transesophageal echocardiography, 第84回日本超音波医学会学術集会, 2011年5月、東京

(15) 水野麗子, 藤本眞一, 岡本康幸, 2型糖尿病における食後高血糖と心筋微小循環および血管内皮機能との関連, 第58回日本臨床検査医学会学術集会, 2011年11月、岡山

(16) 水野麗子, 藤本眞一, 斎藤能彦, 岡本康幸, 巨大縦隔悪性リンパ腫により肺動脈狭窄を呈した1例, 第22回日本心エコー図学会学術集会, 2011年4月、鹿児島

(17) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Insight into the Pathogenesis of Anthracycline-induced Cardiomyopathy in Patients with Malignant Lymphoma: Relation with Myocardial Contractility and Stiffening, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(18) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Depressed Recovery of Myocardial Perfusion and Contractility after Complete Revascularization in Diabetic

Patients: Inverted J-curve Association with Tight Glycemic Control, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(19) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Persistent Diastolic Dysfunction Regardless of Regression of Left Ventricular Hypertrophy Late after Valve Replacement in Severe Aortic Stenosis, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(20) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Hypoglycemic Attack Exacerbates Left Ventricular Early Relaxation in Association with Coronary Microcirculatory Dysfunction in Patients with Diabetic Mellitus, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(21) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Relationship between Insulin Resistance and Cardiac Autonomic Dysfunction in Diabetic Patients, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(22) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Impaired Ventricular-arterial Interaction in Post-menopausal Women: Association with Subclinical Thyroid Dysfunction, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(23) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, J-curve between Blood Pressure and Coronary Microvascular Dysfunction in Hypertensive Patients, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(24) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Cardiac Raynaud's Phenomenon Induced by Cold Provocation as Predictor of Progression of Myocardial Fibrosis in Systemic Sclerosis: 7-year Follow-up Study, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(25) Reiko Mizuno, Shinichi Fujimoto, Yoshihiko Saito, Yasuyuki Okamoto, Dobutamine-induced Atrial Dysfunction as Predictor of Development of Persistent Atrial Fibrillation in Elder Hypertensive Patients with Left Ventricular Hypertrophy, 第75回日本循環器学会総会学術集会, 2011年3月, 横浜

(26) Takashi Masui, Ichiro Ota, Masatoshi Kanno, Hiroshi Hosoi, Combination of cetuximab and low-intensity ultrasound

causes a synergistic enhancement in cell killing and an additive enhancement in apoptosis induction in human head and neck cancer cell, The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2011年12月, 神戸

(27) 神野正敏、木村道子、樋野光生、古川直人、中村卓、再発または難治性濾胞性およびマントル細胞リンパ腫に対する Ibritumomab tiuxetan の臨床的有用性に関する後方的検討、第9回日本臨床腫瘍学会学術集会、2011年7月、横浜

(28) 水野麗子、藤本眞一、岡本康幸、高齢高血圧患者での至適降圧レベルの設定について：心筋微小循環障害との関連、第107回日本内科学会総会講演会、2010年4月、東京

(29) Masatoshi Kanno, Takanori Kitauchi, Makoto Kawahara, Satoshi Ueno, Yasunori Enomoto, Noboru Yamagata, Hitoshi Sawada, Progressive multifocal

leukoencephalopathy after treatment with rituximab for macroglobulinemia, 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月、横浜

〔図書〕(計 3 件)

(1) 水野麗子、斎藤能彦、南江堂、循環器疾患 最新の治療 2014-2015、2013 掲載予定

(2) 水野麗子、藤本眞一、文光堂、心エコー、2011、1198、650

(3) 真貝隆之、長谷川正俊、神野正敏、バイエル薬品株式会社/富士フィルム RI ファーマ株式会社、¹¹¹In-ゼヴァリン画像アトラス、2010、80、68

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 麗子 (MIZUNO REIKO)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80398437

(2) 研究分担者

藤本 眞一 (FUJIMOTO SHINICHI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70209097

神野 正敏

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30195185

(3) 連携研究者

なし