

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660240

研究課題名(和文) 犬の肺高血圧症に対する血管リモデリングを標的とした新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new therapy targeted vascular remodeling for pulmonary hypertension in dogs

研究代表者

日笠 喜朗 (HIKASA, YOSHIAKI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：30165071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：犬の慢性心不全による肺高血圧症(PH)に対する血小板由来成長因子の阻害活性を持つ分子標的薬の有効性を調べる目的で、PHラットモデルにおけるイマチニブを含む分子標的薬の肺血管リモデリングの抑制効果と右室肥大の改善効果を検討した。その結果、イマチニブとスニチニブは肺血管リモデリングの抑制を介してPHを改善することが示唆された。次に、犬慢性心不全によるPHに対する低用量イマチニブ治療の有効性を臨床徴候と各種循環パラメータにより評価したところ、標準的治療に低用量イマチニブを追加投与することによりPHを有意に改善でき、イマチニブはPHを示す慢性心不全犬の治療薬として有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to examine the efficacy of molecular target drugs having inhibitory activity of platelet-derived growth factor for pulmonary hypertension (PH) caused by chronic heart failure in dogs. For this purpose, the depression effect of the pulmonary blood vessel remodeling and the improvement effect of the right ventricular hypertrophy of molecular target drugs including imatinib were examined in the PH rat model. As a result, it was suggested that imatinib and sunitinib improved PH through the suppression of the pulmonary vascular remodeling. Subsequently, the efficacy of the low-dose imatinib therapy for the pulmonary hypertension caused by chronic heart failure in dogs was evaluated on clinical signs and various circulation parameters. As a result, the therapy with low-dose imatinib significantly improved PH and heart failure. Therefore, imatinib is useful as a therapeutic drug for the PH caused by the chronic heart failure in dogs.

研究分野：農学

キーワード：肺高血圧症 僧帽弁閉鎖不全症 血管リモデリング イマチニブ 慢性心不全 イヌ ラット

1. 研究開始当初の背景

(1)肺高血圧症(PH)とは、肺、血管傷害および心機能障害が原因となり、血管収縮、血管リモデリング、血栓形成などにより肺小動脈内腔の狭窄もしくは閉塞を招来し、肺動脈圧の上昇を惹起し、重篤な右心不全と死を引き起こす病態である。PHの進展は心不全の予後を大きく左右する要因となっている。近年、伴侶動物の高齢化に伴う各種弁膜症のような慢性心不全によるPHの罹患動物が増加しており、PHに対する治療法の確立は獣医臨床領域において極めて重要な課題となっている。しかし、PHに対する根本的な治療法が確立されていない現状にある。

(2) PHの治療には、これまでプロスタサイクリン経路、エンドセリン経路、一酸化窒素経路に作用する作用機序の異なる3系統の治療薬が使用されてきた。これらの薬物による治療は、基本的には肺動脈や血管を拡張させ、心負荷を軽減する効果を期待したものであり、根本的には治療にはなっていない。また、これらの薬物を使用しても重篤化を防げない症例が存在し、既存の治療薬とは異なる作用機序を持つ治療薬が望まれる。PHの本質的な原因は肺血管のリモデリングと考えられ、組織学的には肺小動脈中膜肥厚、内膜肥厚、叢状病変などが認められる。このリモデリングにはさまざまなシグナリング異常が関与しており、その一つとして血小板由来成長因子(PDGF)が重要である。イマチニブは元来フィラデルフィア染色体の遺伝子産物であるBcr-Ablチロシンキナーゼを標的として開発された治療薬であり、ヒトにおいて慢性骨髄性白血病や消化管間質腫瘍に対する抗悪性腫瘍治療薬として、イヌでは肥満細胞腫や消化管間質腫瘍の治療薬として使用されている分子標的薬である。このイマチニブには細胞増殖に関与するPDGF受容体および血管新生に関与する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体の活性化阻害作用を有する。ヒトPH患者の肺血管病変では、PDGF およびPDGF 受容体のm-RNAが過剰発現していることが明らかにされ、異常な増殖病変形成への関与が示唆されていると同時に、PDGFはIn vitroで肺動脈平滑筋細胞を増殖させることが明らかにされている。このため、イマチニブによるPDGF受容体刺激の抑制は治療の標的として十分期待できる。さらに、最近ではイマチニブに加えて、ソラフェニブ、スニチニブのような数多くのPDGF受容体活性阻害活性を有する分子標的薬が合成されている。従って、イマチニブのような分子標的薬は犬のPHの根本的な治療薬となり得る可能性がある。しかし、各種循環器疾患や肺疾患が原因となるPHに対するイマチニブおよびその類似薬の治療薬としての有効性は未だ確立されていない。

(3)本研究で注目している血管のリモデリング抑制を標的としたPDGF阻害作用を有するイマチニブおよびその類似薬の治療効果を確立すれば、致命的な病態である肺高血圧症の根本的な治療として極めて有用と考えられる。このような背景から、本研究では、PAHラットモデルを用いて数種類の分子標的薬の効果を検証し、イヌにおける血管リモデリングを標的とした肺高血圧症の根本的な治療法を確立しようとするものである。

2. 研究の目的

(1)本研究では犬の慢性心不全による肺高血圧症に対するPDGF受容体活性阻害活性を有する分子標的薬の有効性とその治療法を確立することを目的とした。

(2)この目的に対して、PHラットモデルを用いて、イマチニブを含む数種類の分子標的薬肺血管リモデリングの抑制効果、右室肥大と生存率の改善効果を明らかにする。

(3)次いで、犬慢性心不全による肺高血圧症に対するイマチニブ治療の有効性を一般臨床症状、生化学的心不全マーカーおよび各種循環パラメータの動態により評価し、その他の循環器改善薬の効果と比較することにより、検証し、治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)PHラットモデルの作成では、Wistar系ラットにMonocrotaline(MCT)を60 mg/kg皮下投与することにより作成した。そのモデルを用いて、分子標的薬のイマチニブ(5、15および50 mg/kg)もしくはスニチニブ(1、3および10 mg/kg)をMCT投与後、2週目から剖検日まで毎日、経口投与した。対照として分子標的薬非投与のMCT投与(MCT)群、薬物非投与の正常群を設けた。各群はMCT投与後2、4、6、8週目に剖検し、心臓の右室と左室+中隔壁の質量比を求め、肺の組織検査を行った。

(2)犬の慢性心不全による肺高血圧症に対する分子標的薬の有効性と治療法の確立を目的とした試験では、慢性僧帽弁閉鎖不全症または慢性フィラリア症によりPHを呈し、一般的治療を実施中の慢性心不全犬(ISACHC重症度II~IIIa)に対して低用量のイマチニブ(既報告の抗腫瘍薬としての用量の約1/3量)を追加投与することにより、その有効性を検討した。イマチニブ投与前と投与後には、一般身体検査、一般血液検査、血液生化学検査、レントゲン検査、非観血的血圧測定を行い、心エコー検査によるパルスドプラ、連続波ドプラおよび組織ドプラを用いた各種循環パラメータの測定を行った。

(3)PH治療の有効性はISACHC重症度分類、臨床症状スコア(失神、発咳、浮腫、腹水および胸

水)、レントゲン所見、心拍数と血圧、一般血液所見と血液生化学的所見および心エコーパラメータ所見により総合的に評価した。血液生化学所見には血清の脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント(NT-proBNP)と心房性ナトリウム利尿ポリペプチド(ANP)を含めた。

(4) 心エコー検査による各種循環パラメータの解析は以下のように実施した。Mモード法で左心房/大動脈径比、左室内径短縮率、左室駆出率、拡張末期中隔壁厚、拡張末期左室内径、拡張末期左室自由壁厚、収縮末期中隔壁厚、収縮末期左室内径、収縮末期左室自由壁厚を測定した。パルスドプラ法を用い、左室流入波形において拡張早期波(E波)、心房収縮期波(A波)、E波とA波の比(E/A)、E波減速時間を測定し、心尖部五腔断面において左室流出路断面積、大動脈血流速、流速積分値を測定し、1回拍出量および心拍出量を評価した。四腔断面での左室流入血流終了から再流入開始までの時間をa時間、心尖部五腔断面像による左室駆出血流の開始から終了までをb時間として、 $Tei\ index = (a-b)/b$ にて左室Tei indexを求め、同様に三尖弁流入血流終了から再流入開始までの時間と心基底短軸像による右室駆出血流開始から終了までを求めて、右室Tei indexを求めた。さらに、連続波ドプラ法を用いて、収縮期僧帽弁最高逆流速度、収縮期三尖弁最高逆流速度(TRmax)、拡張期肺動脈弁最高逆流速度を測定する。収縮期肺動脈圧(sPA)は、TRmax から簡易ベルヌーイ式を用いて圧較差を求め、推定右房圧の10~15 mmHgを加算して算出した。肺動脈楔入圧は拡張末期PRmaxから簡易ベルヌーイ式にて求めた値に、推定右房圧の10~15 mmHgを加算して算出した。組織ドプラ法(TDI)では、僧帽弁輪部運動速波形から拡張早期波(Em)と心房収縮期波(Am)を測定し、EmとAmの比(Em/Am)とE波とEmとの比(E/Em)を評価した。また、左室短軸像では左室後壁の心内膜側の速度(Vendo)と心外膜側の速度(Vepi)を計測し、その差を2点間の距離で除することにより心筋速度勾配(MVG)を算出し、MVGは収縮中期(MVGs)、拡張早期(MVGe)、心房収縮期(MVGa)にてそれぞれ評価した。

(5) 慢性心不全による肺高血圧症に対する分子標的薬のイマチニブの効果の程度を明らかにするため、心不全の治療効果を有するプラバスタチン(PS)とエプレノン(EP)の効果について検討した。方法では、健康犬においてPSとEPの各種循環パラメータと血液生化学的性状に及ぼす影響を基礎的に検討した。実験群ではPSもしくはEP非投与の対照群とPSおよびEP投与群に分け、PS投与群にはPS 0.5~2 mg/kg、EP投与群にはEP 2.5~10 mg/kgを24時間毎に4週間、経口投与した。各試験薬投与前および投与後 1、

2、4週間後にイマチニブ投与試験と同様の項目を評価した。次いで、肺高血圧を伴う重度の僧帽弁閉鎖不全を示し、一般的治療を実施中の犬においてPSまたはEP追加投与の治療効果について検討した。治療中の僧帽弁閉鎖不全犬をPS投与群と対照群に分け、PS投与前と投与後4週間後にイマチニブ投与試験と同様の検査項目を評価した。

4. 研究成果

(1) PHラットモデルにおける心臓および肺組織所見に対する分子標的薬の効果

試験薬非投与のMCT群では肺細動脈の肥厚と内腔狭窄がみられ、正常ラットに比べ右心室/(左心室+中隔)比が高値を示した。一方、イマチニブ(15~50 mg/kg)もしくはスニチニブ(10 mg/kg)投与群の4および6週目においては、MCT群よりも組織学的に肺血管の肥厚と狭窄が軽減され、比べ右心室/(左心室+中隔)比が低値を示し、右室肥大の改善が示唆された。このことから、血小板由来成長因子(PDGF)受容体阻害活性を有する分子標的薬のイマチニブおよびスニチニブは血管リモデリングの抑制を介してPHを改善することが示唆された。

(2) 慢性心不全によるPH犬に対する低用量イマチニブの治療効果

僧帽弁閉鎖不全症または慢性フィラリア症によりPHを呈し、一般的治療を実施中の慢性心不全犬に対して低用量(3 mg/kg)のイマチニブの1ヵ月間連続経口投与による有効性を調べたところ、臨床徴候は、発咳と総スコアにおいて投与1ヵ月後に有意に改善し、運動不耐性、失神および腹水・浮腫スコアは改善傾向を示した。心拍数、左心房径大動脈径比(LA/Ao)、TRmax、sPA、右室と左室のTei index、左室拡張早期流入速波形(E波)と僧帽弁輪運動速度Emの比(E/Em)および心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度は、イマチニブ治療前に比べ治療1ヵ月後に有意な低下を示した。拡張期血圧、左室内径短縮率(FS)、左室駆出率(EF)、E波減速時間(DecT)、Emおよび収縮中期心内膜と心外膜の速度差、1回拍出量および心拍出量は治療1ヵ月後に有意に増加し、心不全の改善を認めた。従って、低用量イマチニブ投与はPHを示す慢性心不全犬の治療として有効であることを明らかにした。標準的治療にイマチニブを追加投与することにより肺高血圧症と心不全を有意に改善できた。これはイマチニブのPDGF受容体阻害作用と抗線維化作用による肺動脈リモデリング改善効果、肺血管拡張作用および全身性血管拡張作用の両者によると考えられた。

PHを伴う僧帽弁閉鎖不全症犬に対する低用量イマチニブ長期間投与の効果：ペナゼプリルやピモベンダンなどの一般的な心不全治療中にPHを呈し、臨床徴候が悪化してきたた

め、イマチニブ 3 mg/kg、SID の経口投与を開始した。イマチニブ投与 2 週後には臨床症状の改善と三尖弁逆流速度および推定 sPA の改善がみられ、PH の改善が示唆された。イマチニブ投与 10 ヶ月までは PH や各種循環パラメータは安定して推移し、肺水腫の悪化と副作用はなかった。しかし、11~16 か月経過すると、NT-proBNP 濃度が上昇し、17 か月後には sPA の上昇を認めた。このことから、イマチニブの効果には耐性がある可能性が考えられた。しかし、PH を呈した犬の生存期間の中央値は 3 日~91 日との報告があり、今回の症例はこの期間を著しく超過し、良好に維持された。従って、イマチニブ治療は PH 犬の生存期間を延長する可能性が高いと考えられた。

(3) 犬の心機能パラメータに及ぼすプラバスタチン(PS)とエプレレノン(EP)の影響

PS 投与は LA/Ao、FS、EF、E 波、E/Em、収縮中期心筋速度勾配、SV、心拍出量および左室と右室の Tei index を有意に減少し、Em と拡張早期心筋速度勾配(MVGe)を有意に上昇した。従って、PS 投与は左室拡張能亢進、左室収縮力低下および左房圧低下作用を示すことを明らかにし、左室拡張不全や左房圧上昇した心不全犬に効果的であることを示唆した。

EP 投与は LA/Ao、E 波及び E/Em を低下し、DecT、Em および MVGe を増加したことより、EP の左房圧の低下作用と左室拡張能亢進作用が示唆された。このことから、エプレレノンも左室拡張不全や左房圧の上昇した心不全犬に効果を発揮できる可能性がある。

中等度から重度の僧帽弁閉鎖不全を示し、一般的治療を実施中の犬において PS 追加投与の治療効果について検討したところ、PS 投与群では対照群に比べ心拍出量の有意な増加が認められた。さらに、PS 投与群では PS 投与前に比べ収縮末期左室内径、拡張末期左室内径、左室 Tei index、TRmax、sPA および E/Em が有意に低下し、FS、EF、SV、心拍出量、E 波減速時間、Em および MVGe が有意に上昇した。これらの結果から、PS 投与は左房圧の低下、左室収縮能と左室拡張能の亢進、心拍出量の増加および sPA の減少を招来し、PS は僧帽弁閉鎖不全による慢性心不全の治療薬として有効であることを明らかにした。ただし、PS の肺高血圧に対する軽減効果は分子標的薬のイマチニブより弱いことが示唆された。以上のように、本研究は犬の肺高血圧症に対する新規治療薬として、PDGF 受容体阻害作用を持つイマチニブのような分子標的薬の有効性を示唆した。

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 6 件)

日笠喜朗・有田申二：心不全に対する新しい治療薬-犬の僧帽弁閉鎖不全症に対する HMG-CoA 還元酵素阻害薬プラバスタチンの効果-. M P アグロジャーナル、19、3-6、2014、査読無

有田申二・日笠喜朗：肺高血圧症：低用量イマチニブによる犬の肺高血圧症の治療. Veterinary Circulation、3(2)、39-47、2014、査読無

日笠喜朗、有田申二：肺高血圧症に対する新しい薬物治療法-イヌにおける慢性心不全による肺高血圧症の低用量イマチニブ治療-. M P アグロジャーナル、16、12-16、2014、査読無

http://www.mpagro.co.jp/dl_pdf/2014_01.pdf

Arita, S., Arita, N., and Hikasa, Y.: Effect of pravastatin on echocardiographic circulation parameters in dogs. Journal of Veterinary Medical Science 76, 481-489, 2014、査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/76/4/76_13-0505/article

Arita, S., Arita, N., and Hikasa, Y.: Effect of low-dose imatinib therapy for pulmonary arterial hypertension and hemodynamic disturbance caused by chronic heart failure in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine 27 (3), 728-729, 2013、査読無

Arita, S., Arita, N., and Hikasa, Y.: Therapeutic effect of low-dose imatinib on pulmonary arterial hypertension in dogs. Canadian Veterinary Journal 54, 255-261, 2013、査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573631/>

〔学会発表〕(計 5 件)

有田申二、有田昇、日笠喜朗：犬におけるエプレレノンの心エコー循環パラメータに及ぼす影響. 平成 26 年度日本獣医師会 獣医学術学会年次大会、岡山市、岡山コンベンションセンター、2015.2.13

有田申二、有田昇、日笠喜朗：僧帽弁閉鎖不全症犬に対するプラバスタチン効果、平成 25 年度獣医学術中国地区学会 日本小動物獣医学会、鳥取市、とりぎん文化会館、2013.10.13

日笠喜朗、花山純平、宮武真梨奈、辻野久美子、原田和記、有田申二：低用量イマチニブによる長期治療を実施している僧帽弁閉鎖不全症の犬一例、平成 25 年度獣医学術中国地区学会 日本小動物獣医学会、鳥取市、とりぎん文化会館、2013.10.13

宮武真梨奈、有田申二、日笠喜朗：僧帽弁閉鎖不全を呈する犬の各種心機能パラメータに及ぼすイマチニブの影響、平成 25 年度獣医学術中国地区学会 日本小動物獣医学会、鳥取市、とりぎん文化会館、

2013.10.13

Hikasa Y., Arita S. and Arita N.: Effect of low-dose imatinib therapy for pulmonary arterial hypertension and hemodynamic disturbance caused by chronic heart failure in dogs. 2013 ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine) Forum, Washington State Convention Center, USA, 2013.6.13

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日笠 喜朗 (HIKASA, Yoshiaki)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：30165071

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

有田 申二 (ARITA, Shinji)
有田 昇 (ARITA, Noboru)
宮武 真梨奈 (MIYATAKE, Marina)