

厚生労働科学研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

アドレノメデュリンを用いた循環器疾患の
画期的治療法の開発

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 宮武 邦夫

平成17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

アドレノメデュリンを用いた循環器疾患の画期的治療法の開発

国立循環器病センター 宮武 邦夫 1

II. 分担研究報告書

アドレノメデュリン投与による心筋保護の前臨床研究

国立循環器病センター 寒川 賢治 5

経静脈的アドレノメデュリン投与による心筋保護的治療：急性心筋梗塞症に対する
adjunctive therapy の可能性

国立循環器病センター 宮崎 俊一 9

アドレノメデュリンの心筋梗塞への応用

宮崎大学医学部 北村 和雄 11

アドレノメデュリンの虚血脳保護再生作用と脳血管疾患への応用に関する研究

京都大学大学院医学研究科 中尾 一和 13

アドレノメデュリンによる肺高血圧治療

国立循環器病センター 永谷 憲歳 20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

V. 研究成果の刊行物・別刷 29

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
総括研究報告書

アドレノメデュリンを用いた循環器疾患の画期的治療法の開発

主任研究者 国立循環器病センター副院長 宮武邦夫

平成 16 年度は、急性心筋梗塞に対する画期的治療法となる可能性を示し、少数例ではあるが急性心筋梗塞患者に対する臨床応用を開始した。またアドレノメデュリン(AM)の肺高血圧軽減効果に関する探索的臨床研究を実施した。また遺伝子改変動物を用いて AM が虚血脳において血管再生作用ならびに神経保護再生作用が明らかとなった。これらの結果より、AM は難治性循環器疾患に対する我が国独自の画期的治療薬となる可能性が示唆された。

分担研究者

宮武 邦夫
国立循環器病センター
副院長

寒川 賢治
国立循環器病センター
部長

宮崎 俊一
国立循環器病センター
医長

北村 和雄
宮崎大学医学部
講師

中尾 一和
京都大学大学院医学研究科
教授

永谷 憲歳
国立循環器病センター
部長

A. 研究目的

医療技術が進歩した現在においても虚血性心疾

患、脳虚血疾患は常に死因の上位を占め、また高額な医療費の原因にもなっている。アドレノメデュリン(AM)は 1993 年、研究分担者の寒川らが発見した内因性循環調節ペプチドである。近年、AM にはさまざまな心血管保護効果があることが報告された。本研究の目的は AM による心筋および脳の保護効果を病態モデルや遺伝子改変動物を用いて明らかにし、また急性心筋梗塞、心不全、脳梗塞、肺高血圧に対して AM を治療薬として臨床応用し、AM 投与による新たな循環器治療法の開発を行なうことである。

B. 研究方法

アドレノメデュリンによる虚血心筋保護作用の検討:

まず、ラットを用いて短時間の AM 投与による虚血再灌流障害の抑制効果とそのメカニズムを検討した。臨床研究では、本試験(二重盲検比較試験)の予備試験として、初回急性心筋梗塞症例を6人を対象に AM を虚血再灌流時に投与し、AM による虚血心筋保護効果と投与の安全性を検討した。

アドレノメデュリンによる心不全治療効果の検討:

ラットの左冠動脈結紮により心筋梗塞モデルを作製し、AM の持続静注による心筋梗塞後の心不全改善効果を検討した。

アドレノメデュリンによる脳虚血保護作用の検討:

AM の慢性投与による脳虚血治療効果を検証する動物モデルとして AM 単独過剰発現トランスジェニックマ

ウスを開発し、脳虚血に対するAMの効果を検討した。

アドレノメデュリンによる肺血管保護作用の検討:

原発性肺高血圧症患者 11 人を対象とし、ジェットネブライザーを用いた AM 吸入投与の安全性と有効性(肺高血圧軽減効果と運動耐容能改善効果)を検討した。

(倫理面への配慮)

1. 動物操作にあたっては、各施設の動物実験指針に従って行う。
2. 基礎的研究において遺伝子改変動物、プラスミドDNAを用いる場合は使用に際しては遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づき研究を実施する。
3. 臨床研究に関しては、国立循環器病センターを含め各施設の倫理委員会承認のもとで進める。

C. 研究結果

アドレノメデュリンによる虚血心筋保護作用の検討:

ラット急性心筋梗塞モデルを用いた実験では、再灌流時にAMを1時間投与したところ心筋細胞のアポトーシスが抑制され、また梗塞サイズが約半分に縮小した。このAMの抗アポトーシス効果はPI3K/Aktを介することが示された。これらの基礎研究結果をふまえ、「急性心筋梗塞におけるアドレノメデュリン心筋保護治療の臨床評価」を計画し、この臨床研究は国立循環器病センター倫理委員会で承認され、実際に臨床応用を開始した。急性心筋梗塞発症入院時よりAMを12時間静脈内投与してその安全性と有効性(急性心筋梗塞再灌流障害改善効果、心機能改善効果)を検討した。現在までのところ6例の患者に施行し、静脈内投与の安全性を確認した。今後は無作為化二重盲検試験を実施する予定である。

アドレノメデュリンによる心不全治療効果の検討:

AM 投与は心筋梗塞ラットの生存率を有意に改善し、左室拡張末期圧、心・肺重量、血中の内因性ラット AM 濃度、非梗塞部コラーゲン密度を減少させた。AM 投与は心筋梗塞後 1 週目の血行動態、尿量を変化させ

ず、非梗塞部心筋のアンジオテンシン変換酵素の発現を有意に抑制し、酸化ストレスの指標である尿中インプロスタンの排泄を有意に減少させた。以上より、AM は心不全や心筋リモデリングの抑制に働くことが示唆された。

アドレノメデュリンによる脳虚血保護作用の検討:

AMトランスジェニックマウスに中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデルを施行したところ、虚血域での血流と毛細血管密度が増加し、梗塞域とグリオーシスが約30%減少した。さらには再生ニューロンも有意に増加し、脳梗塞慢性期における運動機能の改善も認められた。白血球浸潤と神経細胞アポトーシスの減少が観察され、またCD34陽性内皮前駆細胞の末梢血中への動員も増加し、これらの機序がAMトランスジェニックマウスにおける虚血脳での毛細血管密度の増加ならびに梗塞域とグリオーシスの減少に関与する可能性が考えられた。

アドレノメデュリンによる肺血管保護作用の検討:

AM吸入による明らかな重篤な副作用は出現しなかった。ジェットネブライザーによるAM吸入は体血圧に影響を与えることなく平均肺動脈を有意に低下させ肺血管抵抗を低下させた。またAM吸入は肺高血圧患者の運動耐容能を改善させた。

D. 考察

医療技術が進歩した現在においても虚血性心疾患、脳虚血疾患は常に死因の上位を占め、また高額な医療費の原因にもなっている。分担研究者の中尾と寒川はANPやBNPなどのナトリウム利尿ペプチドの発見と病態生理的意義の研究によって、血中BNPによる診断法や心不全治療薬であるハンブ(HANP)を開発し、多くの患者を救命してきた。これまでの研究結果から、内因性ペプチドの一つであるアドレノメデュリンも循環器疾患の病態に深く関与していることが明らかとなり、その特異的な作用から循環器疾患の新たな治療薬として期待される。すなわち、現状の心臓、脳血管疾患などの循環器疾患の新しい治療法の開発が望まれている中で急性心筋梗塞の梗塞サイズの縮小効果は生命予後に直結し、また、脳梗塞の傷害部位の縮小や脳

機能の改善は患者の生命予後のみならず、QOLの改善をもたらす治療法は大きな期待がかけられている。

今回我々は動物実験モデルを用いて心筋梗塞急性期のAM投与が虚血心に対し保護的に作用すること、またそのメカニズムを明らかにした。これらの結果を基に、臨床応用を開始し急性心筋梗塞患者への急性期にAMを静脈内投与することの安全性と治療薬としての可能性を示した。再灌流療法が普及した現在においても急性心筋梗塞後の心筋保護・再灌流障害抑制は不十分である。AMはこれらの心筋障害を著明に抑制する可能性があり、今後はパイロット研究の結果を無作為化二重盲検試験で検証していく。

一方、AMが虚血脳において血管再生作用ならびに神経保護再生作用を有することが明らかとなった。これらの結果は、これまで治療法の存在しなかった脳梗塞の新たな治療法となる可能性を示したものである。今後は投与方法や至適容量の設定らの基礎的検討を重ねる必要がある。

我々が開発したジェットネブライザーを用いたAM吸入療法は原発性肺高血圧症例の肺血管抵抗を低下させ、運動耐容能を改善させた。原発性肺高血圧症は生命予後3年の極めて致死性疾患であり、新たな治療法として期待される。今後はさらに治療効果を達成するために、AMの徐放剤の開発が必要である。

我々は今回明らかにした以上のような基礎的・臨床的成果を基に急性心筋梗塞、心不全、脳血管疾患、肺高血圧症例に対する画期的治療薬としてのAMの実用化をめざし安全性、有効性について臨床探索研究を予定している。前述のごとくAMは我が国で発見され国立循環器病センター、京都大学、宮崎医科大学が中心となり世界に先駆けて基礎的、臨床的研究成果を蓄積してきた循環調節ペプチドである。難治性循環器疾患に対する我が国独自の画期的治療薬として実用化に向けたトランスレーショナルリサーチをさらに推進したい。

E. 結論

平成16年度は、急性心筋梗塞に対する画期的治療法となる可能性を示し、少数例ではあるが急性心筋梗塞患者に対する臨床応用を開始した。またAMの

肺高血圧軽減効果に関する探索的臨床研究を実施した。遺伝子改変動物を用いてAMが虚血脳において血管再生作用ならびに神経保護再生作用を発揮することが明らかとなり、新たな脳梗塞治療法となる可能性が示唆された。来年度は、前臨床、臨床試験にてAM投与の安全性と有効性のさらなる検討を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Nakanishi N, Shirai M, Mori H, Miyatake K, Kangawa K. Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2004;109:351-6.
- (2) Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke*. 2005;36:853-8.
- (3) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 2005;111:356-62.
- (4) Hanabusa K, Nagaya N, Iwase T, Itoh T, Murakami S, Shimizu Y, Taki W, Miyatake K, Kangawa K. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of mesenchymal stem cells after experimental stroke in rats. *Stroke*. 2005;36:853-8.

2. 学会発表

- (1) 永谷憲歳、宮武邦夫、寒川賢治: アドレノメデュリンとグレリンの難治性循環器疾患治療への応用
第8回心血管内分泌代謝学会シンポジウム
- (2) 永谷憲歳、宮武邦夫、寒川賢治: 内因性循環調節ペプチドのトランスレーショナルリサーチ
第77回日本内分泌学会シンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2005-036419

特願 2005-062951

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

アドレノメデュリン投与による心筋保護の前臨床研究

分担研究者 寒川 賢治 国立循環器病センター研究所生化学部 部長
永谷 憲歳 国立循環器病センター研究所先進医工学センター再生医療部 部長

ラット急性心筋梗塞の再灌流時にアドレノメデュリン (AM) を短期投与すると梗塞サイズの縮小、心機能の改善が見られ心筋細胞のアポトーシスが減少した。アドレノメデュリンが心筋の虚血再灌流障害に対する保護作用を有していること、その保護作用は心筋組織中の PI3K/Akt の活性化を介していることが示唆された。

A. 研究目的

アドレノメデュリン(AM)は抗酸化作用・抗アポトーシス作用を有する血管拡張性の降圧ペプチドであり、心筋においては心肥大・線維芽細胞増殖を抑制し、また心筋組織局所においても産生されることが明らかにされている。臨床的には永谷、宮武らが心不全患者に対する AM 投与の有用性を報告しているが(Nagaya N, Miyatake K, et al. Circulation 2000;101:498-503)、急性心筋梗塞時の心筋の虚血再灌流障害に対する AM の有効性については不明である。本研究ではラット再灌流障害モデルに AM を短期投与し、心筋梗塞サイズ・心筋細胞のアポトーシス・心機能に対する AM の作用について検討し、急性心筋梗塞治療時の AM 投与の有用性について考察した。

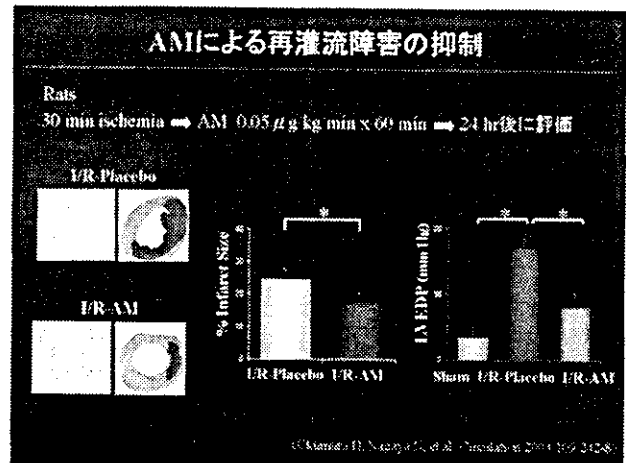
B. 研究方法

雄性 SD ラットの左冠動脈を結紮。結紮後30分で再灌流し虚血再灌流モデルを作製した。冠動脈結紮後60分において①0.05 μ g/Kg/min の AM ② wortmannin (phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor) 前投与後に AM をラットに60分間投与した。再灌流後6時間において心筋細胞のアポトーシスを TUNEL 染色、DNA ladder により評価し、再灌流後24時間において左室拡張末期圧、心筋梗塞サイズを測定した。また心筋組織中の Akt 活性を phospho-Akt 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析し、AM が心筋組織を保護する機序についても考察した。

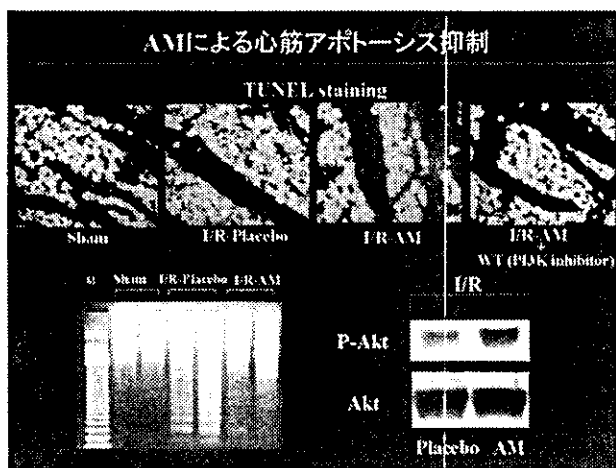
C. 研究結果

AM 投与により心筋梗塞サイズは有意に縮小(24 \pm 4% to 16 \pm 1%)、左室拡張末期圧は有意に減少(19 \pm 2 to 8 \pm 2 mmHg) (図1)、心筋細胞のアポトーシスは有意に減少(19 \pm 2 to 9 \pm 4%)し、心筋組織中の Akt 活性は増加した。wortmannin 前投与は AM 投与により増加した心筋組織中の Akt 活性を減少させ、また AM 投与による心筋梗塞サイズ縮小効果、心機能改善効果、心筋細胞のアポトーシス抑制効果を低下させた(図2)。

(図1)



(図2)



D. 考察

以上よりAMは心筋の虚血再灌流障害に対し保護的に作用し、その保護作用は心筋組織中のPI3K/Aktの活性化を介していると考えられる。このような前臨床研究の結果を基に急性心筋梗塞症例で冠動脈再疎通療法が予定されている症例を対象にAMを投与し安全性、梗塞サイズ縮小効果、慢性期心機能改善効果、再灌流障害抑制効果等につき臨床探索研究を予定している。AMは1993年に寒川が発見した内因性血管拡張ペプチドであり、以後国立循環器病センター、宮崎医科大学、京都大学が中心となり世界に先駆けて基礎および臨床研究を行ってきた。今後は我々がこれまでに行ってきた研究結果を基に新たな心不全治療薬、心筋梗塞治療薬としてのAMの実用化をめざしたい。

E. 結論

心筋梗塞急性期の再灌流時のAMの短期投与は臨床使用用量の範囲内において心筋の再灌流障害を抑制することを明らかにした。AMは心不全治療薬としてのみならず急性心筋梗塞治療時における再灌流障害予防薬としても有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kamei M, Hayashi Y, Kikumoto K, Kawai Y, Kangawa K, Kuro M, Minamino N: Effect of cardiopulmonary

bypass on pulmonary clearance of adrenomedullin in humans. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004, 48: 980-985.

2) Nishikimi T, Asakawa H, Iida H, Matsushita Y, Shibasaki I, Tadokoro K, Mori Y, Mori H, Mochizuki Y, Okamura Y, Miyoshi S, Kangawa K, Matsuoka H: Different secretion patterns of two molecular forms of cardiac adrenomedullin in pressure- and volume-overloaded human heart failure. *J Card Fail* 2004, 10: 321-327.

3) Chen L, Hashida S, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Serino R, Kis B, Yamashita H, Ueta Y: Disassociated increases of adrenomedullin in the rat cerebrospinal fluid and plasma after salt loading and systemic administration of lipopolysaccharide. *Peptides* 2004, 25: 609-614.

4) Suzuki Y, Horio T, Nonogi H, Hayashi T, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Kawano Y: Adrenomedullin as a sensitive marker for coronary and peripheral arterial complications in patients with atherosclerotic risks. *Peptides* 2004, 25: 1321-1326.

5) Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R: Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation* 2004, 109: 1789-1794.

6) Nagaya N, Kangawa K: Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension. *Peptides* 2004, 25: 2013-2018.

7) Suzuki Y, Horio T, Hayashi T, Nonogi H, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Kawano Y: Plasma adrenomedullin concentration is increased in patients with peripheral arterial occlusive disease associated with vascular inflammation. *Regul Pept* 2004, 118: 99-104.

8) Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, Goto R, Sada M, Kawano Y, Moriyama T, Yazawa K, Ichimaru N, Takahara

S, Kangawa K: Mycophenolate mofetil prevents autoimmune glomerulonephritis and alterations of intrarenal adrenomedullin in rats. *Eur J Pharmacol* 2004, 489: 127-133.

9) Kojima H, Sakurai S, Uemura M, Satoh H, Nakashima T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Fukui H: Adrenomedullin contributes to vascular hyporeactivity in cirrhotic rats with ascites via a release of nitric oxide. *Scand J Gastroenterol* 2004, 39: 686-693.

10) Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Cao Y, Marutsuka K, Asada Y, Kangawa K, Eto T: Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats. *Circulation* 2004, 110: 426-431.

11) Iwanaga K, Takamura N, Abe Y, Zhaojia Y, Shinzato K, Hosoda H, Kangawa K, Ohtsuru A, Kohno S, Yamashita S, Aoyagi K: Plasma concentrations of adrenomedullin and ghrelin in hemodialysis patients with sustained and episodic hypotension. *Endocr J* 2005, 52: 23-28.

12) Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H: Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288: H1444-1450.

13) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K: Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2005, 111: 356-362.

14) Nishikimi T, Wang X, Akimoto K, Tadokoro K, Mori Y, Ishikawa Y, Ishimura K, Yoshihara F, Minamino N, Kangawa K, Matsuoka H: Alteration of renal adrenomedullin and its receptor system in the severely

hypertensive rat: effect of diuretic. *Regul Pept* 2005, 124: 89-98.

2. 学会発表

(国内学会)

1) 寒川賢治: 新規ペプチドホルモンの発見・構造決定とその基盤的研究, 第77回日本内分泌学会学術総会(学会賞受賞講演), 2004, 京都.

2) 永谷憲歳、宮武邦夫、寒川賢治: 内因性循環調節ペプチドのトランスレーショナルリサーチ, 第77回日本内分泌学会学術総会, 2004, 京都.

3) Ishimura K, Nishikimi T, Ishikawa Y, Mori Y, Tadokoro K, Koshikawa S, Kangawa K, Matsuoka H: Chronic Administration of Combined Vasopeptidase Inhibition and Adrenomedullin has Renoprotective Effect in Dahl Salt-sensitive Rat via Inhibition of Oxidative Stress. 第69回日本循環器学会学術総会, 2005, 横浜.

4) Iwashima Y, Horio T, Suzuki Y, Kihara S, Rakugi H, Kangawa K, Funahashi T, Ogihara T, Kawano Y: Plasma Adiponectin and Adrenomedullin Levels in Peripheral Arterial Occlusive Disease. 第69回日本循環器学会学術総会, 2005, 横浜.

(国際学会)

1) Kangawa K: Novel peptide discovery. 12th International Congress of Endocrinology (Plenary lecture), 2004, Lisbon.

2) Takamura N, Iwanaga K, Abe Y, Ohtsuru A, Hosoda K, Kangawa K, Shinzato K, Kohno S, Yamashita S, Aoyagi K: Increased plasma ghrelin and adrenomedullin in hemodialysis patients with sustained and episodic hypotension. 12th International Congress of Endocrinology, 2004, Lisbon.

3) Abe M, Nishimatsu H, Suzuki E, Takeda R, Takahashi M, Yamamoto Y, Kangawa K, Hirata Y: Adrenomedullin augments collateral development and mobilization of

endothelial progenitor cells in response to acute ischemia.
The 77th Scientific Sessions American Heart Association,
2004, New Orleans.

4) Horio T, Suzuki Y, Kamide K, Takiuchi S, Kangawa K,
Kawano Y: Adrenomedullin as a sensitive marker for
coronary and peripheral arterial complications in patients
with atherosclerotic risk. The 77th Scientific Sessions
American Heart Association, 2004, New Orleans.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2005-036419

特願 2005-062951

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

経静脈的アドレノメデュリン投与による心筋保護的治療:急性心筋梗塞症に対する adjunctive therapy の可能性

分担研究者 宮崎 俊一 国立循環器病センター 医長
安田 聡 国立循環器病センター 医師

アドレノメデュリンは、抗炎症作用・抗アポトーシス作用、血管新生作用などその多機能性から薬物として臨床への応用が期待されている生理活性物質である。本研究では急性心筋梗塞症例を対象として、合成ヒトアドレノメデュリンを投与した際の心筋保護効果(無作為化二重盲検比較試験)について検討することを目的とする。

A. 研究目的

急性心筋梗塞に対する早期の血行再建にもかかわらず再灌流障害により心機能の改善が得られない症例がある。心機能は梗塞患者の重要な予後決定因子であることから、心筋保護的 adjunctive therapy が臨床に求められている。ラット急性心筋梗塞モデルにおいて、アドレノメデュリンを経静脈的に1時間投与することで、梗塞サイズの減少・心機能の改善が得られたことが報告されている(Circulation. 2004;109:242-8)。有効性(心筋保護効果)判定の本試験(無作為化二重盲検比較試験)の前に、安全性確認のための予備試験を行った。

対象:30歳以上79歳未満の初回の急性心筋梗塞で発症から12時間以内に来院し、重篤な合併症がなく、冠動脈再疎通療法が予定され本人から研究参加の承諾が得られた症例。

B. 研究方法

再灌流療法に先行してアドレノメデュリン(0.025 μ g/kg/min)の静脈内投与を開始し、以後12時間継続した。投与量は急性心筋梗塞症という病態ならびに投与の安全性という観点から、ヒト心不全治療にて用いられた0.05 μ g/kg/minの半量にて、投与量を設定した。

C. 研究結果

これまで6例(男2/女2, 67 \pm 8[mean \pm SD]歳)に対して治療を行った。内訳は前壁梗塞2、下壁梗塞各々4例で、再灌流までの時間は約3.3時間、peakCPK 3839U/L(中央値)であった。再灌流性不整脈は認められなかった。図1にアドレノメデュリン投与中の収縮期

血圧の推移を示す。1例において血圧の低下を認めたが、左室下壁梗塞に合併した右室梗塞が主たる原因と考えられ、薬剤との因果関係は明らかではなかった。また梗塞後リモデリングの指標とされる脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は慢性期(発症3ヶ月後)検査が終了している4例全例において低いレベルで推移した(図2)。左室駆出率は前:49 \pm 6、後:51 \pm 3%、左室拡張末期容積係数は前:66 \pm 25、後:69 \pm 3mL/m²であった。

図1:アドレノメデュリン投与に伴う収縮期血圧の急性変化(n=6)

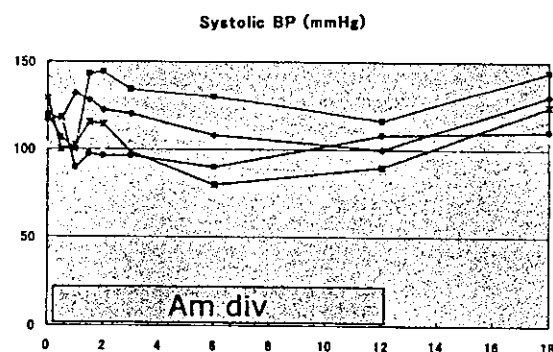
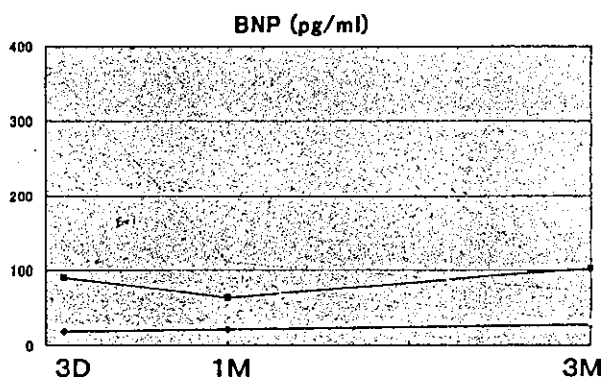


図2: アドレノメデュリン投与後のBNPの推移(n=4)



D. 考察

本年度実施した安全性確認のためのオープンラベル試験では、血圧低下をきたし投与量の減量を行った1例(右室梗塞合併例)を除き、血行動態に大きな影響を及ぼすことなく経静脈的にアドレノメデュリンを使用することが可能であった。今回の予備研究の結果をもとに、至適な投与方法(量・時間)についての検討が重要であると思われた。

E. 結論

アドレノメデュリン経静脈的投与は、急性心筋梗塞症例においても十分許容可能であると考えられた。心筋保護・リモデリング予防に対する効果に関して、今後無作為化二重盲検比較試験にて明らかにしていく必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

アドレノメデュリンの心筋梗塞への応用

分担研究者 北村和雄 宮崎大学医学部講師

ラット急性心筋梗塞モデルでは、アドレノメデュリン(AM)を急性期に投与することで、慢性期の心筋リモデリングと心機能低下を抑制し、予後を改善した。心筋梗塞治療におけるAMの臨床応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

アドレノメデュリン(AM)は、血圧や体液量の調節に関与するばかりでなく、心筋細胞の肥大と心線維芽細胞の増殖を抑制する。一方、AMの血中濃度は心筋梗塞(MI)の急性期に上昇し、その後徐々に低下することが知られている。AMの作用を考慮すると、MI急性期に増加するAMは生体に防御的に働く可能性が示唆される。本研究では急性MIモデルラットでの、AMの急性期投与における有効性を検討した。

B. 研究方法

雄性ウイスターラットの左冠動脈結紮によりMIモデルを作製し、処置後直ちに浸透圧ミニポンプを用いてヒトAMの持続腹腔内投与($1.0 \mu\text{g/h}$)を開始、1週間継続した(MI-AM群:n=11)。Control群には同プロトコールにて生食投与を行った(MI-生食群:n=17)。その後8週間経過観察を行い、9週後に両心カテーテル検査、心重量測定、血中ホルモン濃度測定を行った。また、非梗塞部の心筋細胞面積とコラーゲン密度を形態学的に定量した。さらに、機序について検討するため、MI導入後、1週間の時点でも評価を行った。

(倫理面への配慮)

当大学の動物実験委員会の承認を得た後に、動物実験に関する指針の「動物福祉」に関する項目に従い、できる限りの動物愛護上の配慮を行い、研究を遂行した。

C. 研究結果

コントロール群と比較して、AM投与群では有意な生存率の増加を認めた(59 vs. 81%, $P<0.05$)。MI-AM群では、MI-生食群と比較して、梗塞サイズは同程度で

あったが、心重量(4.7 ± 0.2 vs 3.4 ± 0.1 g/kg BW, $P<0.01$)、および肺重量(6.5 ± 0.6 vs. 4.8 ± 0.5 g/kg BW, $P<0.01$)が減少していた。また、心筋細胞面積の減少及びコラーゲン密度の低下を認めた。さらに、左室拡張末期圧がAM投与群では低下していた。MI導入後1週間後の検討では、MI-AM群では、非梗塞部心筋のアンジオテンシン変換酵素(ACE)の発現が有意に抑制されていた。さらに酸化ストレスの指標の尿中インプロスタンの排泄が著減していた。

D. 考察

本研究では、急性MIモデルにおいて、急性期のAM投与が慢性期の心筋リモデリングと血行動態を改善することで、予後を改善する可能性が明らかになった。我々は培養心筋細胞や心線維芽細胞においてAMが産生・分泌されており、AMが培養心筋細胞の肥大や心線維芽細胞の増殖を抑制することを観察している。今回の実験においては、外因性に投与されたAMが、増加した内因性AMとともに非梗塞心筋の心筋細胞や心線維芽細胞に作用して、心筋リモデリングを抑制したことが示唆される。

AMの心筋リモデリング抑制の機序としては、AMがレニン・アンジオテンシン系(RA)系の抑制することが一つと考えられる。また、AM投与群の酸化ストレスマーカーは著減しており、抗酸化剤の投与が心筋梗塞後のリモデリングを抑制するなどの報告を考慮すると、AMの抗酸化作用もリモデリング抑制に関与した可能性がある。

E. 結論

心筋梗塞急性期のAM投与は慢性期の心機能低下

を抑制し、予後を改善した。急性 MI 治療における AM の治療薬としての可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura R, Kato J, Kitamura K, Onitsuka H, Imamura T, Cao Y, Marutsuka K, Asada Y, Kangawa K, Eto T. Adrenomedullin administration immediately after myocardial infarction ameliorates progression of heart failure in rats.

Circulation. 2004;110(4):426-431.

2. 学会発表

北村和雄:アドレノメデュリンと心血管病. 第 52 回日本心臓病学会学術集会 モーニングセミナー 2004 年9月(京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

アドレノメデュリンの新たな用途について申請準備中

2. 実用新案登録

3. その他

アドレノメデュリンの虚血脳保護再生作用と脳血管疾患への応用に関する研究

分担研究者： 中尾 一和 （京都大学大学院医学研究科 教授）

我々はこれまで、アドレノメデュリン（AM）が血管トーンス及びリモデリング制御に加え、傷害内皮再生、更に血管再生作用を発揮することを報告した。AMは脳梗塞発症後にその発現が増加することも明らかにされており、その病態生理に関与すると考えられる。今回我々は、AMの脳血管疾患への臨床応用を目指し、発生工学的手法を用い、AMの虚血脳の保護再生作用を検討した。ヒトへのAM投与で得られる血中濃度に匹敵する血中濃度の上昇を認めるAM単独過剰発現トランスジェニックマウス（AM-Tg）を開発した。AM-Tgに中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデルを作成したところ、対照マウスと比較し有意の梗塞域及びグリオーシスの抑制と、神経機能の回復が認められた。本モデルにおいて、AMの血管再生促進に加え、内皮前駆細胞（endothelial progenitor cells; EPC）動員促進、炎症細胞浸潤抑制、ニューロンのアポトーシス抑制と再生促進作用が証明され、血管神経保護再生作用が生体において明らかとなった。

A. 研究目的

我々はこれまで、アドレノメジュリン（AM）が血管トーンス及びリモデリング制御に加え、cAMPカスケード及びPI₃キナーゼ/Aktカスケードを活性化し、傷害内皮再生、更に血管再生作用を発揮することを *in vitro* 及び *in vivo* で報告した。AM遺伝子は、虚血応答配列を有し虚血刺激によりその遺伝子発現は亢進する。事実、AMは通常脳組織での発現は低い、脳梗塞発症後にその発現が増加することも明らかにされており、その病態生理に関与すると考えられる。今回我々は、AMの脳血管疾患への臨床応用を目指し、発生工学的手法を用いヒトへのAMの投与により得られる血中濃度と同等の血中濃度の上昇を認めるAMトランスジェニックマウス（AM-Tg）を開発し、同モデル動物に脳梗

塞を作成し、AMの虚血脳の保護再生作用を検討した。

B. 研究方法

AM遺伝子はAMのみならず別の血管拡張性ペプチドPAMPも産生する。AMを単独で過剰産生するマウスを作成する目的で、AM遺伝子のPAMPコード領域3'端アミド化シグナルのグアニンをシトシンに塩基置換することで、PAMP生理活性発現に必須であるアミド化を阻害した変異型AM遺伝子を作成した。SAPプロモーターと結合して、肝臓からAMのみを単独で過剰産生するAM-Tgマウスを開発した。そのマウスにおいて中大脳動脈20分閉塞脳梗塞モデル（20m-MCAO）を作成した。末梢血中のCD34陽性CD45弱陽性細胞数を定量して、脳梗塞後の内皮

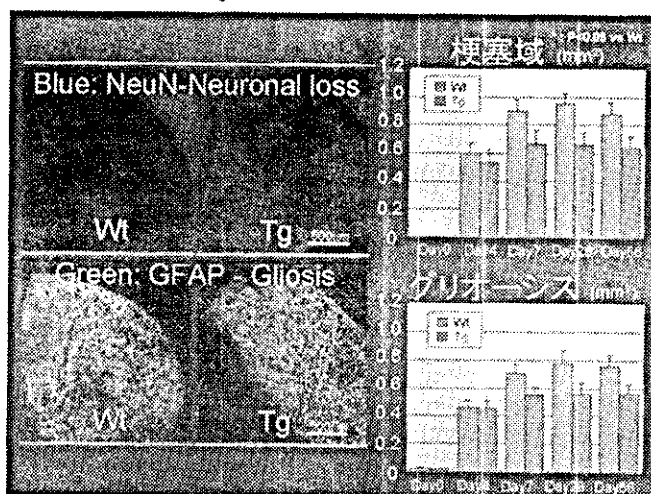
前駆細胞の動員を評価した。第 56 病日までに回収した大脳基底核においてはニューロンマーカー NeuN, アストログリアマーカー GFAP, 断片化 DNA マーカー ssDNA, 白血球マーカー CD45, 内皮マーカー PECAM-1 による免疫染色を施行し、梗塞域、グリオシス、アポトーシス、白血球浸潤、血管再生を評価した。さらには BrdU を第 4~6 病日に腹腔内投与した後に BrdU/NeuN 二重陽性細胞の免疫染色を施行し、神経再生を評価した。また AM が神経分化に与える効果を検討する目的で、ラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を血清 0.5% 下で 7 日間培養し、神経突起の伸長を評価した。

C. 研究結果

得られた AM-Tg マウスのアミド化 AM 濃度は $24.9 \pm 4.2 \text{ fmol/ml}$ まで上昇し、ヒトで治療効果を認めた濃度に匹敵した。一方アミド化 PAMP 濃度の上昇は認めなかった。20m-MCAO における梗塞域とグリオシスは AM-Tg において有意に減少した (day28 においてそれぞれ野生型比 $20.7 \pm 10.0\%$ 減、 $29.4 \pm 6.6\%$ 減) (図 1)。梗塞域の縮小が認められるよりも早期の段階から、虚血基底核におけるアポトーシスと白血球浸潤が有意に低下していた (day4 で野生型比 $28.8 \pm 7.4\%$ 減、 $42.6 \pm 5.2\%$ 減) (図 2)。梗塞域の血流と毛細血管密度は AM-Tg において有意に増加した (day28 で野生型比 $10.9 \pm 3.9\%$ 増、 $20.2 \pm 7.2\%$ 増) (図 3)。MCAO 施行前に野生型と AM-Tg でそれぞれ 1118 ± 69 , 1244 ± 89 (/ml) であった CD34 陽性細胞数は 20m-MCAO 施行後、有意に上昇して day4 にはそれぞれ 1774 ± 272 , 3199 ± 562 (/ml) となり AM-Tg で有意に高値であった。さらには再生ニューロン (BrdU/NeuN 二重陽性細胞) も AM-Tg で有意に増加し (day56 で野生型比 $66.2 \pm 23.0\%$ 増) (図 4)、第 28~56 病日には

ロータロッドで評価した運動機能の有意な改善を認めた。PC12 細胞 7 日間培養後の神経突起長は AM 10^{-8} mol/l 添加で有意に増加し (コントロールに対して $210.1 \pm 48.3\%$ 増)、PC12 細胞と臍帯血静脈内皮細胞 (HUVEC) の共培養でも神経突起長は有意に増加したが ($124.2 \pm 25.1\%$ 増)、AM の添加で更に増加した (AM 非添加内皮共培養群に対して $82.6 \pm 30.7\%$ 増)。

図 1. AMTg における梗塞域とグリオシスの縮小: 第 7 病日以降に梗塞域及びグリオシスの有意な縮小を認めた。



Wt: 対照マウス
Tg: AMTg

図 2. AMTg におけるアポトーシスと白血球浸潤の抑制:

第 4~7 病日を中心にアポトーシス細胞 (ssDNA 陽性細胞) 及び CD45 陽性炎症細胞浸潤の有意な縮小を認めた。

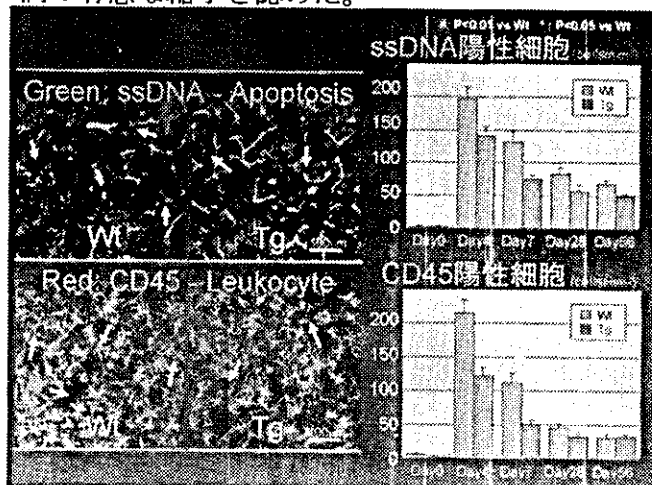


図3. AMTgにおける脳虚血域での血流改善:
虚血域の血流は AMTg で有意に増加した。

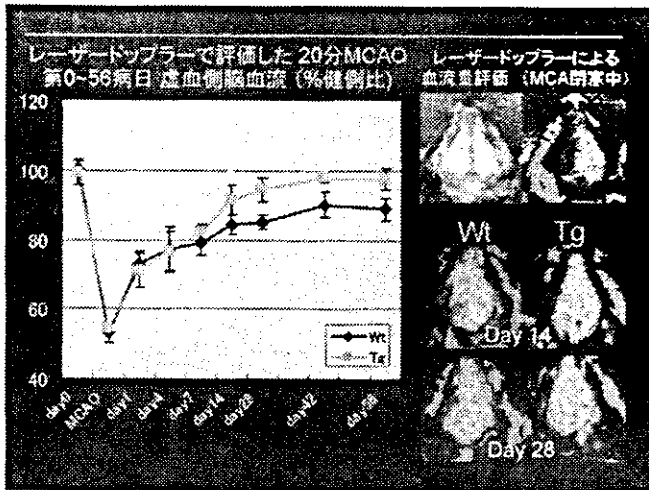
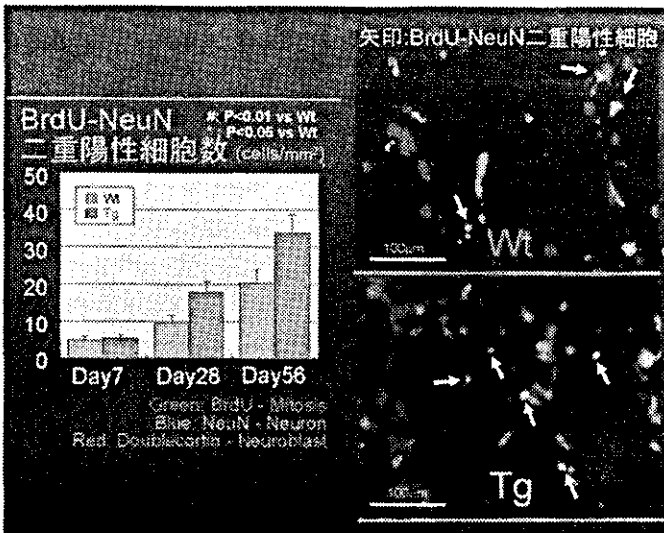


図4. AMTgにおける神経再生促進:
再生ニューロンが AMTg において第 28 病日以
降有意に増加した。



D. 考察

本年度の研究において、AM の生体虚血脳における血管再生作用が明らかとなった。また、脳卒中発症時、“内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells; EPC)” と考えられる CD34 陽性 CD45 群陽性細胞の末梢血中細胞数が増加したが、AM はその動員を促進した。また AM は、虚血脳組織への炎症細胞 (CD45 陽性細胞) の浸潤を有意に抑制した。AM はこれらの作用および

虚血神経細胞に対する保護作用および神経細胞に対する直接の再生促進作用により、虚血脳保護再生、神経機能の改善治療効果を発揮したと考えられる。

E. 結論

AM の EPC 動員促進、炎症細胞浸潤抑制、ニューロンのアポトーシス抑制と再生促進作用が証明され、血管神経保護再生作用が生体において明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Yasoda, Y. Komatsu, H. Chusho, T. Miyazawa, A. Ozasa, M. Miura, T. Kurihara, T. Rogi, S. Tanaka, M. Suda, N. Tamura, Y. Ogawa, and K. Nakao. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.* 10: 80-86, 2004.
2. H. Yokoi, M. Mukoyama, T. Nagae, K. Mori, T. Suganami, K. Sawai, T. Yoshioka, M. Koshikawa, T. Nishida, M. Takigawa, A. Sugawara, and K. Nakao. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 1430-1440, 2004.
3. Y. Li, I. Kishimoto, Y. Saito, M. Harada,

- K. Kuwahara, T. Izumi, I. Hamanaka, N. Takahashi, R. Kawakami, K. Tanimoto, Y. Nakagawa, M. Nakanishi, Y. Adachi, D. L. Garbers, A. Fukamizu, and K. Nakao. Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology* 145: 951-958, 2004.
4. E. Suganami, H. Takagi, H. Ohashi, K. Suzuma, I. Suzuma, H. Oh, D. Watanabe, T. Ojima, T. Suganami, Y. Fujio, K. Nakao, Y. Ogawa, and N. Yoshimura. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization - possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 53: 2443-2448, 2004.
5. S. Suzuki, M. Yoshimura, M. Nakayama, Y. Mizuno, E. Harada, T. Ito, S. Nakamura, K. Abe, M. Yamamoto, T. Sakamoto, Y. Saito, K. Nakao, H. Yasue, and H. Ogawa. Plasma level of B-type natriuretic peptide as a prognostic marker after acute myocardial infarction - A long-term follow-up analysis. *Circulation*. 110(11): 1387-1391, 2004.
6. R. Kawakami, Y. Saito, I. Kishimoto, M. Harada, K. Kuwahara, N. Takahashi, Y. Nakagawa, M. Nakanishi, K. Tanimoto, S. Usami, S. Yasuno, H. Kinoshita, H. Chusho, N. Tamura, Y. Ogawa, and K. Nakao. Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction. *Circulation*. 110: 3306-3312, 2004.
7. A. Ozasa, Y. Komatsu, A. Yasoda, M. Miura, Y. Nakatsuru, Y. Sakuma, H. Arai, N. Itoh, and K. Nakao. Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and MAPK pathway through FGFR-3 in ATDC5 cells. *Bone*. in press. 2005.
1. 学会発表
- 国際学会
1. Kazuwa Nakao
Translational Research of the Natriuretic Peptide Family
Seventh Trans-Pacific Symposium- Cardiovascular Endocrinology-. ENDO 2003. 6. 19-22, 2003 Philadelphia, U. S. A
2. Kazuwa Nakao
Translational Medicine in Endocrinology and Metabolism
IMSUT International COE Symposium
Translational Research
21世紀COEプログラム「ゲノム医学の展開による先端医療開発拠点」
2. 27-28, 2004 Tokyo, Japan
- 国内学会
1. 宮下和季、荒井宏司、伊藤 裕、向山政志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、万木-小林貴美、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリン単独過剰発現トランスジェニックマウスの開発とアドレノメ

デュリンの血管再生作用の検討
第 33 回日本心脈管作動物質学会
2004. 2. 1 (東京)

2. 山原研一、伊藤 裕、朴 貴典、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドの血管再生作用とそのメタボリックシンドローム血管合併症への臨床応用
第 101 回日本内科学会
2004. 4. 8-10 (東京)
3. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、野々口あかね、澤田直樹、山原研一、宮下和季、西川伸一、中尾一和
ヒト ES 細胞からの「血管前駆細胞」の同定と血管再生医療への応用
第 101 回日本内科学会
2004. 4. 8-10 (東京)
4. 山原研一、曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木 (小林) 貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生療法の開発 — マウス下肢虚血モデルによる検討
第 2 回幹細胞シンポジウム ポスター発表
2004. 4. 26-27 (東京)
5. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、小林貴美、野々口あかね、山原研一、宮下和季、朴 貴典、西川伸一、中尾一和
霊長類 ES 細胞由来血管前駆細胞の同定と血管再生治療への応用
第 2 回幹細胞シンポジウム
2004. 4. 26-27 (東京)
6. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、澤田直樹、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和

糖尿病における血管再生障害に対するナトリウム利尿ペプチドの治療応用の検討
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会
2004. 5. 13-15 (東京)

7. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、万木 (小林) 貴美、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリン単独過剰発現トランスジェニックマウスの開発と脳梗塞モデルにおけるアドレノメデュリンの血管再生作用および神経再生作用の検討
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004. 6. 24-26 (京都)
8. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、小林貴美、野々口あかね、山原研一、宮下和季、朴 貴典、西川伸一、中尾一和
ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定と血管再生治療への応用
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004. 6. 24-26 (京都)
9. 万木貴美、山下 潤、伊藤 裕、西川伸一、中尾一和
アドレノメデュリンのマウス ES 細胞由来血管前駆細胞からの血管内皮分化誘導作用
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004. 6. 24-26 (京都)
10. 山原研一、曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木 (小林) 貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生療法の開発—マウス下肢虚血モデルによる検討
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004. 6. 24-26 (京都)
11. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、澤田直

- 樹、曾根正勝、万木貴美、宮下和季、中尾一和
糖尿病における血管再生障害とナトリウム利尿ペプチドの再生医療への応用
第 77 回日本内分泌学会学術総会
2004. 6. 24-26 (京都)
12. 曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、小林貴美、山原研一、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
ヒト ES 細胞由来血管前駆細胞の同定
第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 シンポジウム「血管リモデリングの制御」
2004. 7. 23-24 (福岡)
13. 山原研一、曾根正勝、伊藤 裕、山下 潤、万木貴美、宮下和季、朴 貴典、中尾一和
マウス下肢虚血モデルにおける ES 細胞由来血管前駆細胞を用いた血管再生療法の検討
第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 ポスター
2004. 7. 23-24 (福岡)
14. 万木-小林貴美、山下 潤、伊藤 裕、西川伸一、中尾一和
マウス ES 細胞由来血管前駆細胞からの血管内皮分化誘導におけるアドレノメデュリンの意義
第 36 回日本動脈硬化学会学術総会 ポスター
2004. 7. 23-24 (福岡)
15. 朴 貴典、伊藤 裕、山原研一、曾根正勝、宮下和季、中尾一和
ナトリウム利尿ペプチドの血管再生作用と糖尿病血管合併症としての末梢動脈閉塞性疾患に対する応用の検討
第 8 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2004. 11. 25-26 (宮崎)
16. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、小林 (万木) 貴美、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリンの虚血脳再生治療への展開応用の可能性
第 8 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2004. 11. 25-26 (宮崎)
17. 宮下和季、伊藤 裕、荒井宏司、向山政志、菅波孝祥、曾根正勝、山原研一、朴 貴典、中尾一和
アドレノメデュリンの虚血脳における血管神経再生作用の検討
第 4 回日本再生医療学会総会
2005. 3. 1-2 (大阪)
18. Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh, Jun Yamashita, Kenichi Yamahara, Takami Yurugi-Kobayashi, Yutaka Suzuki, Naoki Sawada, Yasutomo Fukunaga, Kazutoshi Miyashita, Kwijun Park, Naofumi Oyamada, Naoya Sawada, Yasushi Kondo, Shinji Nito, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Shin-Ichi Nishikawa, Kazuwa Nakao.
Identification of vascular progenitor cells from human embryonic stem cells and their application to vascular regeneration therapy.
The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society / YIA
2005. 3. 19-21, 2005 (Yokohama)
19. Kenichi Yamahara, Masakatsu Sone, Hiroshi Itoh, Jun Yamashita, Takami