

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

**アドレノメデュリン（AM）の
炎症性腸疾患治療薬としての臨床応用**

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 北村 和雄

平成 24（2012）年 5 月

研究組織

研究代表者

北村 和雄 宮崎大学医学部

研究分担者

芦塚 伸也 宮崎大学医学部附属病院

鶴田 敏博 宮崎大学医学部

北 俊弘 宮崎大学医学部附属病院

稲津 東彦 宮崎大学医学部附属病院

研究協力者

一圓 剛 ヒュービットジェノミクス株式会社

永田 さやか 宮崎大学医学部

彦坂 ともみ 宮崎大学医学部附属病院

中島 孝治 宮崎大学医学部附属病院

稲垣 匡子 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所

目 次

I. 総合研究報告

アドレノメデュリン(AM)の炎症性腸疾患治療薬としての臨床応用 -----	1
北村和雄	

II. 臨床試験実施計画書-----	29
--------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	55
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	59 ～
-----------------------	------

アドレノメデュリン（AM）の炎症性腸疾患治療薬としての臨床応用

研究要旨

アドレノメデュリン（AM）は本研究代表者等が発見した強力な降圧作用を有する生理活性ペプチドであり、多彩な作用を有し、循環調節や循環器疾患の病態に極めて重要な役割を果たしている。一方、AM には強力な抗炎症作用や組織保護作用があることが明らかになり、炎症性腸疾患治療薬としても期待されている。実際、本研究代表者・分担者等は炎症性腸疾患のモデルである酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデル動物に AM を投与すると、炎症が抑制され、病態が改善することを明らかにした。

本研究の目的は、炎症性腸疾患の治療薬としての AM の有用性を基礎的および臨床的研究で明確にすることである。研究期間 3 年のうち、前半は臨床研究を行うための基礎研究を行い、後半に AM の炎症性腸疾患治療薬としての有用性を証明するための探索的臨床研究を主に行う計画とした。

基礎研究としては、まず「AM の炎症性腸疾患(IBD)発症・増悪化抑制効果およびその機序」について検討した。dextran sulfate sodium salt (DSS)を用い、腸管上皮層破綻によるマウス腸炎モデルを用い検討を行なった。DSS を摂取させた結果、対照群では顕著な体重減少、下痢、下血などが示されたが、AM 投与群ではそれらの症状が著しく軽減した。組織病理学的解析でも AM 投与群では炎症像が顕著に軽減した。AM の作用機序の解析を行ったところ、AM はサイトカイン制御による抗炎症作用および抗菌作用、さらには上皮バリアの構築に不可欠な分子であるジャンクション分子の発現亢進などを示すことにより、有効な腸炎治療薬になりうる可能性が示された。

AM 自体は循環器疾患の治療薬として可能性が高く、急性心筋梗塞治療薬として開発治験をヒュービット社が準備している。AM は急性心筋梗塞治療薬として用いる場合は、経静脈持続投与が予定されており、前臨床試験もそれに合わせて実施されている。これらの前臨床試験のデータを生かし、経静脈投与での臨床研究を行うための基礎実験として、「AM の経静脈投与による炎症性腸疾患モデル動物の実験的治療」のサブテーマで、DSS 腸炎モデルラットや TNBS 腸炎モデルラットに対する AM の経静脈投与の有用性を検討した。DSS を摂取させた結果、対照群では顕著な下痢、血便などが示され体重の増加が認められなかったが、AM 投与群ではそれらの下痢、血便など症状が軽減し、体重も増加した。組織病理学的解析では、対照群で炎症細胞浸潤が多く、腺管構造のねじれ、goblet cell の減少が見られた。しかし、AM 投与群では炎症像は顕著に軽減し、腺管構造も保たれた。TNBS 腸炎モデルラットに対しても同様な AM 静脈投与での有用性が認められた。これらの結果、炎症性腸疾患モデル動物に対する AM 投与の経静脈持続投与の有用性が明らかとなった。興味深いことに、低用量の方が AM 投与の効果が大きい傾向であることが判明し、臨床研究での投与量を決定する際の重要なデータも得られた。

以上の基礎研究での成果やヒュービットジェノミクスが実施した前臨床試験のデータに基づき、まず「健常人に対するアドレノメデュリン投与の臨床研究」を行った。AM は強力な血管拡張性ペプチドであるが、血中半減期が短く、治療薬として用いるには長時間の持続静注が必要である。AM を炎症性腸疾患の新たな治療薬として応用するための基盤研究を推進するにあたり、AM 投与の安全性を検討することは必須である。

AM を人体に投与した場合、血管拡張作用に基づく血圧低下が予測されるが、同時に心機能、主要血管の血流にも影響が出ると考えられる。さらに、各種血中ホルモンや、炎症関連物質への影響も評価しておく必要がある。本研究では、最初に安全性が担保できる最大投与量を短時間（90 分）持続静注した場合の血行動態と各種ホルモンの変化

を評価した。続いて、投与量を下げて長時間（27 時間）投与した場合の、血行動態と各種ホルモンの変化を評価した。その結果、AM は投与量を調整すれば、ヒトにおいても安全に持続投与できることが明らかとなった。

4 時間を超える持続投与では、心臓への負担も懸念されたことから、最終的には、AM 1.5pmol /kg/min、1 日 8 時間投与(9-17 時)、14 日間連続というプロトコールに到達できた。

以上のような基礎研究と臨床研究の成果を基盤として、倫理委員会での承認と UMIN への登録後に、「難治性潰瘍性大腸炎患者に対する探索的臨床研究」を開始した。ステロイドや LCAP に抵抗性の難治性潰瘍性大腸炎の患者に 1.5pmol/kg/min の AM を持続投与することで、顕著な腸管粘膜再生が見られ、さらに 3 か月後の内視鏡検査ではすべての大腸病変が癒痕治癒していた。現在までに、7 例の難治性 UC 患者へ AM 持続静注療法（AM 1.5 pmol/kg/min、8 時間/日、14 日間）を行い、その有効性と忍容性に関して検討した。その結果、7 例中 6 例の症例において排便回数、血便等の腹部症状の改善や内視鏡所見の改善が認められ、寛解導入が得られた。有害事象としては、軽度血圧低下を認めたがふらつきなどの自覚症状は伴わず、安全に投与できた。AM は生理活性ペプチドのため比較的安全性が高いと考えられ、炎症性腸疾患に対する新たな治療戦略として期待される。

研究代表者

北村 和雄	宮崎大学医学部	教授
-------	---------	----

研究分担者

芦塚 伸也	宮崎大学医学部附属病院	助教
鶴田 敏博	宮崎大学医学部	助教
北 俊弘	宮崎大学医学部附属病院	講師
稲津 東彦	宮崎大学医学部附属病院	講師

A. 研究目的

本研究代表者等は 1993 年にヒト褐色細胞種組織より、アドレノメデュリン (AM) を強力な降圧作用を有する生理活性ペプチドとして発見 (BBRC 192, 553-560, 1993) した。AM は多彩な作用を有し、生体機能の調節や循環器疾患の病態に極めて重要な役割を果たしている。また、循環器疾患治療薬としても有望であり、ヒュービットジェノミクス株式会社より AM の急性心筋梗塞治療薬として開発治験の申請がなされている。

一方、AM は消化管の粘膜や筋層にも認められ、炎症性疾患では血中濃度が増加している。また AM 遺伝子は、IL-6 や TNF- α 等の炎症性サイトカインで誘導され、誘導された AM はこれらのサイトカインを強力に抑制する。これらの結果は、AM が内在性の抗炎症物質として機能していることを示唆している。実際、我々は炎症性腸疾患モデルである酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデルラットを用いて、AM の新規かつ特徴的作用である大腸潰瘍治癒促進効果を報告した (Peptides. 26: 2610-2615 (2005) ; 炎症性腸疾患治療薬としての特許取得済)。さらに、AM の炎症性腸疾患治療薬としての有用性を示す動物実験の成果はヨーロッパのグ

ループからも、我々の論文から半年遅れて公表 (Gut. 55: 824-832 (2006)) された。

本研究の目的は、炎症性腸疾患の治療薬としての AM の有用性を基礎的および臨床的研究で明確にすることである。研究期間3年のうち、前半は臨床研究を行うための基礎研究を行い、後半に AM の炎症性腸疾患治療薬としての有用性を証明するための探索的臨床研究を主に行う計画とした。具体的には、次の4つのサブテーマで基礎研究と臨床研究を推進した。

【基礎研究】

- 1) AM の炎症性腸疾患 (IBD) 発症・増悪抑制効果およびその機序
- 2) AM の経静脈投与による炎症性腸疾患モデル動物の実験的治療

【臨床研究】

- 3) 健常人に対する AM 投与の臨床研究
- 4) 難治性潰瘍性大腸炎患者に対する探索的臨床研究

炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) は原因が不明の難治性疾患であり、現時点では根本治療はなく、様々な治療法の工夫にもかかわらず、治療に難渋し、入院を繰り返す症例も多い。また、食生活の欧米化により、近年我が国では炎症性腸疾患患者の急速な増加がみられており、特定疾患医療受給者数は 15 万

人の患者に達し、今後さらに増加が懸念されている。そのため、炎症性腸疾患に対しての、新たな治療法の開発が強く求められており、強力な抗炎症作用を有する AM による治療で新たな展開が期待できる。

炎症性腸疾患については、高薬価の免疫抑制剤や生物学的製剤が臨床応用されているが、特に生物学的製剤は自家抗体の形成による有効性の現弱が見られ、長期的には薬剤抵抗性（2次無効）を示す症例も多い。AM はこの点、ヒトの体内に存在する物質であり抗原性がないことから、長期にわたり安全に使用できることが期待される。

B. 研究方法

炎症性腸疾患の治療薬としての AM の有用性を基礎的および臨床的研究で明確にするため、次の 1) ～ 4) の 4 つのテーマで基礎研究と臨床研究を実施した。

【基礎研究】

1) AM の炎症性腸疾患 (IBD) 発症・増悪化抑制効果およびその機序

AM の IBD 発症・増悪化抑制効果およびその機序について明確にするため、1.8% dextran sulfate sodium

salt (DSS) マウス腸炎モデルを用い検討を行なった。対照群には生理食塩水、AM 投与群には 1 匹あたり $0.05 \mu\text{g}$ をそれぞれ 7 日間注腸投与し、同時に 1.8% DSS 水を自由摂取させ、次の 5 項目について検討した。

(1) 症状と病理学的所見：経時的な体重変化を測定し、症状を観察した。また、腸管の病理学的な変化をヘマトキシリンエオジン染色で観察した。

(2) 通性嫌気性菌数：IBD 患者で一部の常在菌が異常に増加し、宿主免疫反応の破綻を招き腸炎の発症・増悪化の原因になることが報告されている。本研究では、常在菌の大半を占める通性嫌気性菌数を調べた。

(3) 上皮間 T 細胞 (intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL) の検討：腸管粘膜上皮層には上皮細胞の他、上皮間 T 細胞 (intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL) が存在し、腸管粘膜上皮の恒常性維持に働くことが広く知られている。大腸 IEL を分離し FACS 解析を行なった。

(4) IEL からのサイトカイン産生：サイトカインバランスの破綻は腸炎の発症・増悪化に強く関与することが知られている。腸管上皮より単離した IEL からの各種のサイトカインを ELISA で定量した。

(5) ジャンクション分子発現：腸管バリアの破綻は炎症や感染症などさまざまな疾患を引き起こすことが知られている。バリア制御は宿主防御を考える上で重要であるので、上皮バリアの構築に不可欠な分子であるジャンクション分子の発現を RT-PCR で調べた。

2) AM の経静脈投与による炎症性腸疾患モデル動物の実験的治療

(1) dextran sulfate sodium salt (DSS)腸炎モデルラットの作成：DSS 溶液の自由飲水により wistar rat に腸炎を発症させた。DSS 溶液は、最初の 3 日間は 5%、以後は 1%とした。

(2) 頸静脈に AM 群は AM 5 μ g/hr、対照群は生理食塩水を入れた浸透圧ポンプを植え込み、14 日間持続投与する。

(3) 症状（下痢スコア、血便スコア）と体重変化および病理学的所見に関して検討した。また、tail-cuff 法にて血圧の測定を行った。

(4) DSSモデルよりも炎症が広範囲にわたるTNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) 腸炎モデルでも同様の検討を行った。

(5) 頸静脈に AM 群は高用量群 (AM 3 μ g/hr/匹) と低用量群 (AM 1 μ g/hr/匹)、対照群は生理食塩水を入れた浸透圧ポンプを植え込み、14

日間持続投与した。

(6) 症状（下痢スコア、血便スコア）と体重変化および病理学的所見に関して検討した。また、tail-cuff 法にて血圧の測定を行った。

【臨床研究】

3) 健常人に対する AM 投与の臨床研究

短時間投与は化学合成 AM (5pmol/kg/min)を 90 分間投与し、投与前と 60 分後に血行動態、各種液性因子の検討を行い、長時間投与では化学合成 AM (2.5pmol/kg/min)を 27 時間持続投与し、前、3、18、27 時間後と投与中止 15 時間後に血行動態、各種液性因子の検討を行った。

(倫理面への配慮)

事前に当大学の倫理委員会の承諾を得ており、患者には文書による十分な説明を行い、承諾書を得た。

4) 難治性潰瘍性大腸炎患者に対する探索的臨床研究

研究方法

別添えの臨床研究プロトコールに準じて実施した。主要な点を以下に記載する。

(1) 選択基準：下記①に加え、②または③を満たす。

- ① 難治性潰瘍性大腸炎患者
- ② 既存の治療では寛解導入が困

難な患者

- ③ 種々の理由により免疫抑制剤・生物学的製剤が使用困難と判断される患者

※難治性＝十分なステロイド治療によっても寛解が得られない（ステロイド抵抗例）、またはステロイド療法が奏効したが、減量中に再燃した例（ステロイド依存例）。

（２）除外基準：以下の項目を満たさない。

- ① 悪性腫瘍を有する患者
- ② 前癌病変（異型上皮）を有する患者
- ③ 重症で早期の手術が必要とされる患者
- ④ 全身状態が著しく不良である患者
- ⑤ 肝機能不全症を有する患者
- ⑥ 同意日 1 ヶ月以内に急性心筋梗塞、不安定狭心症、心筋炎、脳梗塞に罹患した患者
- ⑦ 活動性の感染症を有する患者
- ⑧ 妊婦または妊娠している可能性のある患者
- ⑨ その他、担当医師が不適当と判断した患者

（３）投与方法：AM 持続静注療法（AM 1.5 pmol/kg/min、8 時間/日、連続 14 日間）

（４）評価方法：

- ① 活動性評価：臨床症状（血便、

下痢、腹痛、発熱）と血液検査所見、内視鏡検査所見を基に、潰瘍性大腸炎の活動性評価指標である、① Disease activity index (DAI)および② Seo's index を用いて AM 投与前後で評価した。

② 内視鏡所見：AM 投与前と投与終了後での大腸内視鏡所見の変化を評価した。

③ 循環動態：AM 投与中は、血圧と脈拍を持続モニターを用いて評価した。

④ 有害事象：入院下での投与とし、投与中～投与後の臨床症状を厳重に観察した。

C. 結果

【基礎研究】

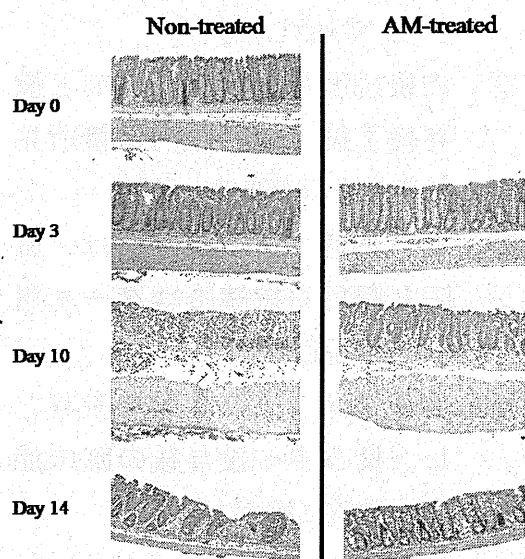
1) AM の炎症性腸疾患(IBD)発症・増悪抑制効果およびその機序

（１）症状と病理学的所見：

1.8% DSS を摂取させた結果、対照群では顕著な体重減少、下痢、血便などが示されたが、AM 投与群ではそれらの症状が著しく軽減した。組織病理学的解析では、対照群では好中球や炎症細胞の浸潤、粘膜上皮の糜爛、筋層の肥厚が顕著であり、これら炎症像の回復の遅延が認められた。一方、アドレノメデュリン投与群で

は筋層の肥厚は見られたが、炎症像は顕著に軽減した（図1）。

図 1



(2) 通性嫌気性菌数：

常在菌の大半を占める通性嫌気性菌数を調べた結果、対照群と比較しAM投与群では菌数が減少した。

(3) 上皮間 T 細胞 (intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL) の検討：

上皮間 T 細胞 (intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL) はその受容体(TCR)から $\alpha\beta$ 型 (炎症増悪作用) と $\gamma\delta$ 型 (抗炎症作用) に分けられる。大腸 IEL を分離し FACS 解析を行なった結果、対照群では病態の増悪化に伴い TCR $\gamma\delta$ IEL が減少するが、AM 投

与群では維持された。

(4) IEL からのサイトカイン産生：

炎症局所での IEL を分離し AM によるサイトカインの産生への影響を調べた。その結果、AM 投与群では IEL から産生されるサイトカインは、対照群と比較し AM 投与群で Th1(IFN- α)および炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- α)の産生が減少し、制御性サイトカイン(TGF- β)は増加した。

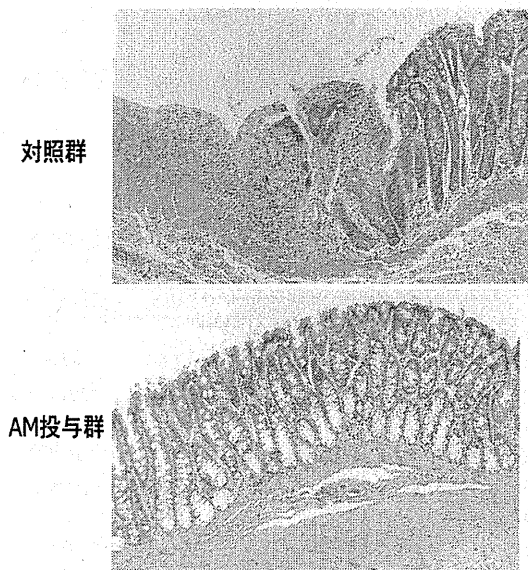
(5) ジャンクション分子発現：

上皮バリアの構築に不可欠な分子であるジャンクション分子の発現を調べた。その結果、tight junction; (ZO-1, occludin, JAM); adherens junction (β -catenin, E-cadherin); desmosomes (desmoglein-2) および gap junction (connexin26)の分子が、腸炎の増悪に伴い減少するが、AM 投与群ではジャンクション分子の減少が傾度であり、さらに発現の速やかな回復が示された。

2) AM の経静脈投与による炎症性腸疾患モデル動物の実験的治療 DSS を摂取させた結果、対照群では顕著な下痢、血便などが示され体重の増加が認められなかったが、AM 投与群ではそれらの下痢、血便など症状が軽減し、体重も増加した。組織病

理学的解析では、対照群では炎症細胞浸潤が多く、粘膜の再生・線維化が見られた。また、腺管構造がいびつで、goblet cell の減少が認められ、ヒト大腸炎に似た所見を呈した。しかし、AM 投与群では、炎症像は顕著に軽減した（図2）。炎症性腸疾患モデル動物に対する AM 投与の経静脈持続投与の有用性が明らかとなった。また、この濃度の AM 投与では有意の血圧低下は認められず、有害事象も認められなかった。

図2



TNBS を投与した結果、対照群では下痢、血便などが示され体重の増加が抑制されたが、AM 投与群ではそれらの下痢、血便など症状が軽減し、体重も増加した。特に、対照群では重症化して死亡する動物も約 1/3 に

見られたが、AM 投与群には死亡例が見られなかった。一方、組織病理学的解析では、対照群では炎症細胞浸潤が多く、粘膜の再生・線維化が見られた。また、腺管構造がいびつで、goblet cell の減少が認められ、ヒト大腸炎に似た所見を呈した。しかし、AM 投与群では、炎症像は顕著に軽減した（図3）。炎症性腸疾患モデル動物に対する AM 投与の経静脈持続投与の有用性が明らかとなった。興味深いことに、血圧が低下せず、血中レニンの増加が見られない低用量群（AM $1\mu\text{g/hr}$ ）群の方が AM 投与の効果が大きい傾向であることが判明した。

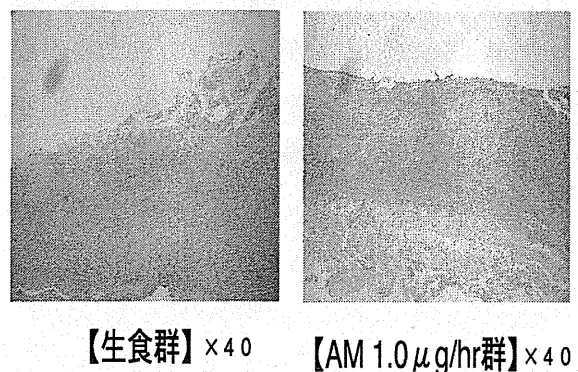


図3

【臨床研究】

3) 健康人に対するアドレノメデュリン投与の臨床研究

短時間投与試験：

既報の投与実験から、人体への最

大投与可能量は AM 50 ng/kg/min と推定し、予備試験として健常人に投与した。しかし、この量では著明な血圧低下が惹起され、早期に投与を中止した。次に、投与量を 30 ng/kg/min に減量して、予備試験を行ったところ、安全性が担保できると判断した。そこで、以下の対象者に AM 30 ng/kg/min と対象薬としてニカルジピン 1・1.5 μ g/kg/min (AM と降圧度を一致) を投与した。

正常血圧者 (NT, n=10, 40.4 $\pm$ 2.8 歳)
高血圧患者 (HT, n=10, 49.6 $\pm$ 2.4 歳)
糖尿病患者 (DM, n=8, 48.5 $\pm$ 3.3 歳)

全対象者をまとめて AM とニカルジピンの効果を比較すると、AM は拡張期血圧低下が大きく (収縮期血圧は両群で一致させてある)、心拍数増加、脈波伝播速度 (PWV、動脈硬度に指標) 低下、頸動脈弾性特性低下が有意に大きかった (図 4)

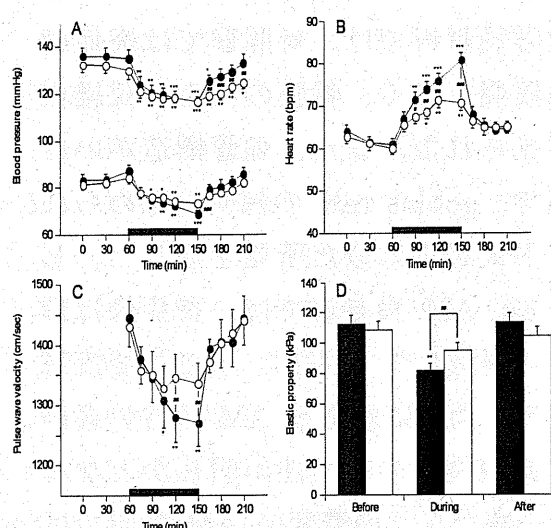


図 4 AM (黒) とニカルジピン (白抜き) の血行動態に与える効果

エコーによる総頸動脈血流(CAF)、腎動脈血流(RAF)、心拍出量(CO)を比較すると、AMの方がニカルジピンより頸動脈血流、心拍出量増加が大きいことが明らかとなった (表 1)

表 1 エコーによる各血流量の変化比較

	Before	During	After	P in trend
Peak CAF				
AM	84.0 $\pm$ 2.5	130.2 $\pm$ 3.0**.#	80.3 $\pm$ 2.5	<0.0001
Nicardipine	83.9 $\pm$ 2.6	107.2 $\pm$ 2.5**	84.2 $\pm$ 2.0	<0.0001
Mean CAF				
AM	37.2 $\pm$ 1.2	53.8 $\pm$ 1.4**.#	34.3 $\pm$ 1.1	<0.0001
Nicardipine	36.4 $\pm$ 1.1	42.7 $\pm$ 1.2**	34.7 $\pm$ 1.0	<0.0001
Peak RAF				
AM	45.9 $\pm$ 2.4	61.2 $\pm$ 3.3**	40.9 $\pm$ 2.1	<0.0001
Nicardipine	46.1 $\pm$ 2.5	56.9 $\pm$ 2.8**	45.0 $\pm$ 2.2 [#]	0.0017
Mean RAF				
AM	27.6 $\pm$ 1.3	34.0 $\pm$ 1.6**.#	24.8 $\pm$ 1.1	<0.0001
Nicardipine	27.7 $\pm$ 1.4	31.6 $\pm$ 1.6	27.3 $\pm$ 1.3 ^{##}	0.066
Cardiac output				
AM	4.59 $\pm$ 0.15	7.63 $\pm$ 0.25**.#	4.77 $\pm$ 0.14	<0.0001
Nicardipine	4.58 $\pm$ 0.14	6.18 $\pm$ 0.30**	4.90 $\pm$ 0.27	<0.0001

#P < 0.05, ##P < 0.01 ニカルジピン群と比較、

*P < 0.05, **P < 0.01 各群の基礎値と比較

各疾患群(NT, HT, DM)で比較したところ、AM の作用に大きな違いはみられなかった。ただし、HT 群では NT 群より収縮期血圧の低下が有意に大きかった(データ提示なし)

血中生理活性物質に対する効果では、両群ともにレニン活性、ノルアドレナリンの有意な上昇がみられたが、2 群間で差は認められなかった。本プロトコールによる AM 投与では、血中 AM (総量としての AM) は約 3 倍の上昇がみられ、second messenger である cAMP も上昇した(表 2)

表 2 各群における生理活性物質の変化血中

	Before	During	After	P in trend
total AM, fmol/ml				
AM	13.9 ± 0.8	32.8 ± 1.8**	15.9 ± 0.6	<0.0001
Nicardipine	13.1 ± 0.4	12.4 ± 0.4**	12.8 ± 0.5**	n.s
mature AM, fmol/ml				
AM	1.9 ± 0.1	12.2 ± .8**	2.6 ± 0.1	<0.0001
Nicardipine	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2**	1.7 ± 0.2**	n.s
cAMP, pmol/ml				
AM	11.8 ± 0.3	16.5 ± 0.5**	12.9 ± 0.4	<0.0001
Nicardipine	11.1 ± 0.4	11.0 ± 0.4**	11.1 ± 0.4**	n.s
cGMP, pmol/ml				
AM	3.5 ± 0.4	3.7 ± 0.3	3.4 ± 0.4	n.s
Nicardipine	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.0 ± 0.2	n.s
renin activity, ng/ml/min				
AM	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.3**	1.0 ± 0.1	0.006
Nicardipine	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.3**	1.1 ± 0.1	0.016
aldosterone, pg/ml				
AM	74.4 ± 5.2	69.7 ± 5.3	65.3 ± 3.7	n.s
Nicardipine	78.2 ± 4.7	77.2 ± 5.3*	71.0 ± 4.5	n.s
noradrenaline, pg/ml				
AM	245 ± 20	429 ± 33**	267 ± 21	<0.0001
Nicardipine	247 ± 19	423 ± 33**	346 ± 25**	<0.0001
adrenaline, pg/ml				
AM	27.6 ± 3.3	32.1 ± 3.8	25.8 ± 2.2	n.s
Nicardipine	21.8 ± 2.1*	24.4 ± 3.2**	31.8 ± 3.2*,**	0.04
ANP, pg/ml				
AM	21.8 ± 3.2	25.4 ± 4.1	22.7 ± 3.7	n.s
Nicardipine	17.0 ± 1.8	19.0 ± 2.0*	14.0 ± 1.2**	n.s
BNP, pg/ml				
AM	12.4 ± 2.0	11.4 ± 1.8	14.0 ± 2.2	n.s
Nicardipine	9.4 ± 1.6	10.0 ± 1.7	10.1 ± 1.6	n.s
IRI, µU/ml				
AM	7.2 ± 1.0	7.1 ± 0.9	6.0 ± 0.7	n.s
Nicardipine	8.0 ± 0.8	7.1 ± 0.7	6.4 ± 0.6	n.s
glucose, mg/dl				
AM	119 ± 6	116 ± 6	110 ± 5	n.s
Nicardipine	124 ± 8	121 ± 8	116 ± 7	n.s

ANP: 心房性 Na 利尿ペプチド、BNP: 脳性 Na 利尿ペプチド、IRI: インスリン

長時間投与試験:

長時間投与した場合、薬剤の蓄積効果によりより強い反応が起こると予測されるため、投与量を 15 ng/kg/min に半減して、健常人で予備試験を行った。この結果、安全性が担保できると判断し、高血圧患者 9 名 (65.2±2.5 歳) に対して、AM 15 ng/kg/min を 27 時間持続静注した。

本プロトコールにより、血圧は最大で収縮期血圧 30 mmHg、拡張期血圧 20 mmHg 低下したが、特に副作用は認められず、全員の対象者で試験を最後まで続行することができた(表 3)。なお、脈波伝播速度(PWV)、augmentation index (AI)、頸動脈弾性特性などの動脈硬化度(arterial stiffness)関連指標も有意に改善した。

表 3 アドレノメデュリン用時間投与による血行動態の変化

時間	SBP	DBP	HR	PWV	AI	弾性特性
前	152.7±5.6	95.2±3.4	64.0±2.2	1913±93	88.1±4.9	106.4±8.9
3時間後	135.2±6.0*	81.3±3.2**	77.8±2.8**	1645±85*	71.6±4.1*	83.6±6.7*
翌朝	120.0±4.8**	74.7±4.0**	78.8±3.5**	1514±77**	74.4±4.6*	69.6±5.8**
終了時	120.7±3.3**	71.4±2.5***	78.3±2.6**	1501±71**	73.0±3.7*	70.1±5.8**
回復期	151.0±7.9	92.0±3.8	66.6±3.8	1868±101	87.7±5.5	93.5±7.0
p in trend	0.0001	<0.0001	0.001	0.002	0.024	0.002

P<0.05, **P<0.01, ***P<0.0001

一方、血中液性因子の変化は表 4 に示すとおりであり、血中 AM 濃度は約 2.7 倍に上昇した。短時間試験との最大の相違点は、脳性 Na 利尿

ペプチド(BNP)が持続的に上昇している点であり、AM 長時間等よりよる心臓への負担増加が懸念された。つまり、AM は血管拡張による血圧低下を引き起こすため、代償的に心拍出量が増加し、さらに AM には直接的な心臓刺激作用もあるため、心仕事量の増加がおき、長時間持続すると心臓への負担になると考えられた。なお、表には示していないが、血中の ACTH、cortisol (早朝採血のみ)には有意な変化はみられなかった。また、酸化ストレスマーカーである尿中の 8-isoprostane と 8-OHdG には有意な変化はみられなかった (データ提示なし)。

AM は通常抗炎症的に作用すると考えられており、炎症性腸疾患の治療薬としての応用もこの抗炎症作用を期待するものである。しかし、AM は場合によっては炎症促進的に作用する場合があることは既に報告されており、炎症がほとんど存在しない状況下では、軽度ではあるが IL-6 を介した CRP 上昇反応を示すことが明らかとなった (表 4)。

表 4 アドレノメデュリン長時間投与による各種液性因子の変化

時間	t-AM	m-AM	cAMP	cGMP	ANP	BNP
前	14.3 ± 1.7	2.4 ± 0.4	14.2 ± 0.7	3.2 ± 0.2	15.0 ± 2.2	14.8 ± 2.8
3時間後	23.2 ± 1.3*	7.8 ± 0.9*	15.4 ± 0.5	4.0 ± 0.4	22.2 ± 5.3	11.3 ± 2.3*
翌朝	38.3 ± 2.8***	15.6 ± 2.2***	15.7 ± 0.7	4.3 ± 0.6	28.7 ± 5.7*	27.1 ± 6.3*
終了時	38.4 ± 5.5***	11.1 ± 2.1***	14.9 ± 0.7	3.7 ± 0.3	30.2 ± 6.9*	54.6 ± 12.6**
回復期	14.1 ± 1.1	2.0 ± 0.5	14.2 ± 0.5	3.1 ± 0.2	18.3 ± 3.4	47.7 ± 10.4**

時間	PRA	PAC	NA	IL-1β	IL-6	hsCRP
前	0.8 ± 0.3	92.8 ± 13.6	326 ± 43	12.3 ± 1.5	2.2 ± 0.4	122 ± 4.8
3時間後	1.1 ± 0.4*	61.9 ± 10.0	341 ± 17	13.8 ± 1.7	3.2 ± 0.4	9.9 ± 2.9
翌朝	1.2 ± 0.4*	61.5 ± 11.6*	395 ± 31	11.4 ± 0.9	7.2 ± 1.0***	30.4 ± 8.4
終了時	1.7 ± 0.9**	53.3 ± 10.1**	340 ± 36	11.4 ± 1.4	4.5 ± 0.7*	85.3 ± 23.5*
回復期	0.9 ± 0.3	89.3 ± 14.6	366 ± 49	13.8 ± 2.4	2.3 ± 0.3	101.9 ± 29.2***

t-AM: total AM (fmol/ml), m-AM: mature AM (fmol/ml), cAMP (pmol/ml), cGMP (pmol/ml), ANP (pg/ml), BNP (pg/ml), PRA : plasma renin activity (ng/ml/h), PAC: plasma aldosterone concentration (pg/ml), NA: noradrenalin (pg/ml), IL-1 β (ng/L), IL-6 (ng/L), hsCRP: high sensitive CRP (mg/L)

4) 難治性潰瘍性大腸炎患者に対する探索的臨床研究

1、患者背景 (表 5、表 6)

症例 : 7 症例※ (9 回)、年齢 : 57±10.6 歳 (37-68 歳)、性別 : 男性 4 名・女性 3 名、病型 : 全大腸型 3 名、左側結腸型 4 名、入院時重症度 : 重症 3 名・中等度 4 名、AM 療法直前の重症度 : 重症 1 名、中等症 6 名

※うち 1 症例は初回 AM 療法 1 年後に再燃し 2 回目の AM 療法を施行したため、別症例として扱った。

表 5

AM持続静注療法患者背景

症例 No.	年齢 性別	病型	病歴期間 (年)	ステロイド 感応性	ステロイド 依存性	CMV合併	入院時 重症度	AM前 重症度	AM投与中の併用療法				予後
									PSL	CAP	CSA/FMK	AZA	
1	68 女	全大腸型	3	あり	あり	あり	重症	中等症	あり	なし	なし	あり	1年後 寛解維持
2	63 男	左側結腸型	2	あり	なし	あり	重症	中等症	あり	なし	なし	あり	1年後 寛解維持
3	37 男	全大腸型	20	あり	なし	あり	中等症	中等症	あり	あり	なし	なし	1年後 寛解維持
4	60 女	全大腸型	5	あり	あり	なし	中等症	中等症	なし	なし	なし	あり	IPX導入
5	62 男	左側結腸型	1	あり	あり	あり	中等症	中等症	あり	なし	なし	あり	PSL中上至 5年後の 再発
6	51 女	左側結腸型	31	あり	なし	なし	重症	重症	あり	あり	なし	なし	PSL投与後 手術
7	64 男	左側結腸型	3	あり	あり	あり	中等症	中等症	あり	なし	なし	なし	PSL投与中

表 6

患者背景 (n=7)

患者数	7症例	(9回)
年齢	57.9±10.6歳	(37-68歳)
性別	男性	4
	女性	3
病型	全大腸型	3
	左側結腸型	4
入院時重症度	重症	3
	中等症	4
AM療法前重症度	重症	1
	中等症	6

2、評価項目

(1) 活動性評価 (図 5)

入院時 DAI は 10.6 ± 1.3 と重症であり、入院後の初期治療 (PSL 療法) では十分な治療効果が認められなかった (DAI 8.9 ± 1.3)。Seo's index においても、入院時は重症を示し (227.2 ± 23.2)、初期治療で若干の改善を認めた (201.9 ± 43.9) もものの、寛解導入は得られなかった。AM 療法導入後 2 週間の活動性評価はいず

れのスコアも有意な改善を認め (DAI 4.7 ± 2.3 、Seo's index 165.7 ± 49.3)、12 週後には更なる改善が認められた (DAI 1.0 ± 1.2 、Seo's index 111.4 ± 12.2)

活動指数の変化

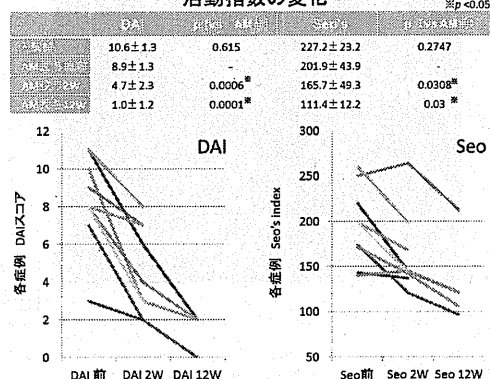


図 5

(2) 内視鏡所見 (図 6、7): 症例 No.1 の内視鏡経過を示す。PSL 療法後、改善傾向は示すものの、深掘れ潰瘍や広範囲の潰瘍が残存した (a,b)。2 週間の AM 療法施行後、深掘れ潰瘍は、依然潰瘍病変が残存しているものの、潰瘍辺縁には著明な再生粘膜が認められた (c)。また AM 投与前に浅い潰瘍にまで改善していた部位は、著明な線維化 (瘢痕化) と血管拡張を認めた (d)。瘢痕部位はネット上につながっており、蜘蛛の巣のような外観を呈した。さらに AM 投与 3 か月後の内視鏡では、すべての潰瘍が瘢痕化しており、2 週間目よりも粘膜全体が平坦・平滑に

改善していた (e,f)。1 年後にも寛解を維持していた (g,h)

他の症例に関しても、無効であった 1 例を除き概ね同様の傾向が見られた。

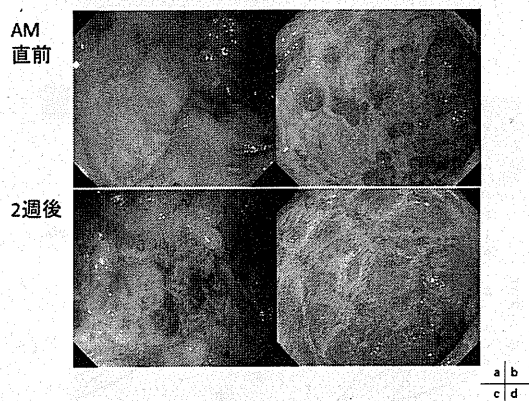


図 6

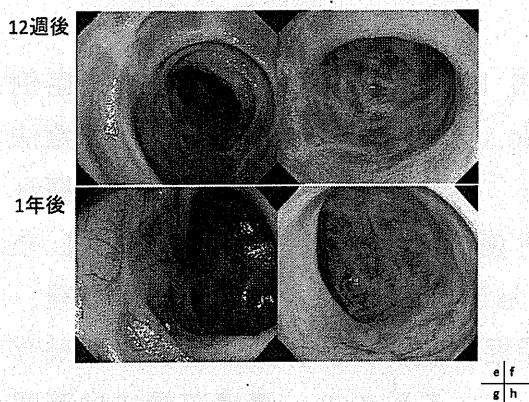


図 7

(3) 循環動態 (図 8)

7 症例 AM 投与時の血圧の動向を示す。AM 投与開始後、継続的に血圧低下傾向と心拍数の増加を認めた。フラツキ等の自覚症状は皆無であった。AM 投与中止後、循環動態は速やかに改善した。

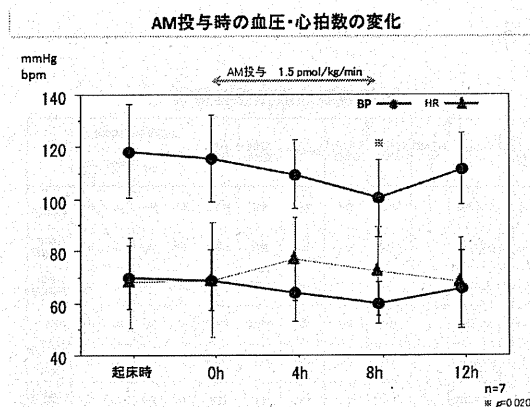


図 8

(4) 有害事象：軽度の血圧低下と心拍数上昇以外の明らかな有害事象は認めなかった。

D. 考察

AM の腸炎抑制効果について、酢酸腸炎モデルや TNBS 腸炎モデルで報告されている。しかし、AM が IBD を改善する機序に関しては不明である。今回は、AM の IBD 発症・増悪化抑制効果およびその機序について、IBD モデルである DSS 腸炎モデルマウスを用い、AM の効果発現機序の検討を行なった。まず、IBD の普遍的モデルである、DSS 腸炎モデルマウスでも AM 投与による体重減少の抑制や下痢、血便などの症状の改善が認められた。それに伴い、組織病理学的検討でも、AM 投与により炎症像は顕著に軽減し、筋層の肥厚は認められるものの上皮の脱落

(潰瘍)が軽減した。

一方、AM は強力な抗菌活性を示すことが報告されている。IBD 患者で一部の常在菌が異常に増加し、宿主免疫反応の破綻を招き腸炎の発症・増悪化の原因になることが報告されている。そこで、常在菌の大半を占める通性嫌気性菌数を調べた結果、対照群と比較し AM 投与群では菌数が減少しており、AM の抗菌作用も炎症性腸疾患改善に寄与している可能性が示された。

腸管粘膜上皮層には上皮細胞の他、上皮間 T 細胞 (intestinal intraepithelial T lymphocytes; IEL) が存在し、腸管粘膜上皮の恒常性維持に働くことが広く知られている。T 細胞はその受容体(TCR)から $\alpha\beta$ 型と $\gamma\delta$ 型に分けられる。これまでの研究により、TCR $\alpha\beta$ 細胞は制御性サイトカインを産生することにより抗炎症作用を示すことが報告されている。そこで、大腸 IEL を分離し FACS 解析を行なった結果、対照群では病態の増悪化に伴い TCR $\gamma\delta$ IEL が減少するが、AM 投与群では維持された。

サイトカインバランスの破綻は腸炎の発症・増悪化に強く関与することが知られている。AM 投与により IEL から産生されるサイトカインは、対照群と比較し AM 投与群で

Th1(IFN- α)および炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- α)の産生が減少し、制御性サイトカイン(TGF- β)は増加した。AM の投与により IEL から産生される炎症性サイトカイン産生が抑制されることが、炎症性腸疾患の病状改善に貢献している可能性が示唆された。

腸管バリアの破綻は炎症や感染症などさまざまな疾患を引き起こすことが知られており、そのバリア制御は宿主防御を考える上で重要である。病理学的観察により、AM 投与群で粘膜上皮層の脱落が軽減していることから、上皮バリアの構築に不可欠な分子であるジャンクション分子の発現を調べた。その結果、AM 投与群ではジャンクション分子発現の減少の抑制と速やかな回復が示された。

以上の結果より、AM は抗炎症および抗菌作用さらに上皮バリアの保護作用などの多彩な作用を示すことにより、有効な腸炎治療薬になりうる可能性が示された。

AM は循環器疾患治療薬としてはきわめて有望であり、特に急性心筋梗塞に関しては、ヒュービットジェノミクス株式会社が AM を急性心筋梗塞治療薬として開発するための準備を行っている。急性心筋梗塞治療に用いる AM は経静脈持続投与が予定されており、前臨床試験も AM を

経静脈持続投与することを想定して行われている。今回 AM の炎症性腸疾患モデル動物に対して、AM の経静脈持続投与の有用性が示されたことで、AM の炎症性腸疾患に対する臨床研究を経静脈持続投与で行うことが可能となり、ヒュービット社が行ってきた前臨床試験のデータを生かせることが期待できる。また、投与量に関しては血圧が低下する量を投与すると AM の抗炎症効果や抗潰瘍効果がむしろ減弱する傾向があり、臨床研究での用量設定は大容量は必要ないことが示唆された。

炎症性腸疾患患者に AM 投与治療を行う基礎となる臨床研究として、健常人（高血圧や糖尿病患者を含む）に対する AM 投与研究を実施した。投与量を 30 ng/kg/min にすることで、短時間投与であれば、認容性が担保できると判断した。実際に血圧低下以外の有害事象は認められなかった。対象薬としてニカルジピン 1-1.5 μ g/kg/min（AM と降圧度を一致）を投与したが、全対象者をまとめて AM とニカルジピンの効果を比較すると、AM は拡張期血圧低下が大きく（収縮期血圧は両群で一致させてある）、心拍数増加、脈波伝播速度（PWV、動脈硬度に指標）低下、頸動脈弾性特性低下が有意に大きかった。血中生理活性物質に対する効

果では、両群ともにレニン活性、ノルアドレナリンの有意な上昇がみられたが、2 群間で差は認められなかった。本プロトコールによる AM 投与では、血中 AM（総量としての AM）は約 3 倍の上昇がみられた。

長時間投与した場合、薬剤の蓄積効果によりより強い反応が起これと予測されるため、投与量を 15 ng/kg/min に半減して、健常人で予備試験を行った。この結果、安全性が担保できると判断し、高血圧患者 9 名（65.2 $\pm$ 2.5 歳）に対して、AM 15 ng/kg/min を 27 時間持続静注した。本プロトコールにより、血圧は最大で収縮期血圧 30 mmHg、拡張期血圧 20 mmHg 低下したが、特に副作用は認められず、全員の対象者で試験を最後まで続行することができた。AM は通常抗炎症的に作用すると考えられており、炎症性腸疾患の治療薬としての応用もこの抗炎症作用を期待するものである。しかし、AM は場合によっては炎症促進的に作用する場合があることは既に報告されており、炎症がほとんど存在しない状況下では、軽度ではあるが IL-6 を介した CRP 上昇反応を示すことが明らかとなった。そのため、より高い安全性を持って実施できる AM 投与方法として、炎症性腸疾患患者に対して投与する AM は、9 ng/kg/min、1 日

8 時間投与(9-17 時)、14 日間連続とした。実際に本プロトコルで、心疾患を有する患者に実際に AM 投与を行ったが、血圧低下は収縮期血圧で 10 mmHg 程度であり、特に有害作用は認められず、高い安全性を持って投与継続が可能であった。また、血中 AM 濃度は約 1.8 倍増加することが確認できた。この増加率は重症心不全や感染症では良く認められる値であり、日常臨床での AM 増加で治療効果が得られることは、AM 投与の安全性を示唆するデータと思われる。

以上の動物実験での基礎研究やヒトでの基礎的臨床研究を基盤として、難治性潰瘍性大腸炎患者に対する AM 持続静注療法を行った。現在までに、7 症例の難治性潰瘍性大腸炎患者に対し AM 持続静注療法を行った。AM が持つ血管新生作用、血流増加作用が悪性腫瘍の増大につながる可能性、循環動態への影響を念頭に、試験前に悪性疾患および心血管系基礎疾患を有さない事を確認した。投与量に関しては、前述の健常人への AM 投与のデータを元に、血圧低下が臨床的に問題とならないと予想された量(1.5 pmol/kg/min)を行い、また安全のため日中のみの投与とした。

7 症例に対し、9 回の AM 投与を行った。1 度の入院中に 5 症例は 1 コ

ース施行し、2 症例は 2 コース行った。2 コース施行の 2 例は、1 コース後に活動性の改善傾向を認めるものの内視鏡上粘膜修復が不十分であり、患者の希望を踏まえて 2 コース連続で行った。また、1 コース施行者のうち 1 例は AM 療法 1 年後に再燃し、患者の希望にて再度投与した。平均年齢が約 57 歳と比較的高齢であったのは、高齢や他の基礎疾患の存在のため免疫抑制剤や生物学的製剤の使用がはばかれ、AM 療法が選択されたためである。活動性評価においては、入院時から AM 療法導入直前の活動性スコアに有意な差がなく、入院初期治療の効果が不十分であった事が示された。AM 療法導入後、すべての症例において DAI スコアの改善を認めたが、うち 1 例は 1 ポイントのみの改善で AM 療法の効果なしと判断し、その後抗 TNF α 療法を導入した。ここで特記すべきは、同症例に関しては抗 TNF α 療法でも十分な結果が得られなかった。また、同内視鏡所見は、びまん性の浮腫や発赤を呈し、潰瘍がみられない所謂「慢性持続型」の様相を呈しており、潰瘍(粘膜欠損)を伴わない症例であった。このような症例は一般的に免疫抑制剤や生物学的製剤にも治療抵抗性を示す症例が多く、本症例においても AM だけでなく、その後の