

201128132B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発

平成22年度～23年度 総合研究報告書

主任研究者 石川 義弘

平成24年5月

201128132B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発

平成22年度－平成23年度 総合研究報告書

主任研究者 石川義弘

平成24（2012年）年5月

目 次

I. 総合研究報告

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発 ----- 1

石川 義弘

II. 分担研究報告

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発（臨床応用に向けた薬理効果の検討） -- 12

岩本 眞理

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発（動物実験による検討） -----32

横山 詩子

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発（細胞実験による検討） -----92

押川 仁

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発（薬理実験による検討） -----114

市川 泰広

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----140

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----145

[I]

# 総括研究報告

内臓錯位症候群に対する新規治療薬の開発

主任研究者 石川義弘 横浜市立大学大学院・教授

研究要旨

内臓錯位症候群は文字通り、内臓の錯位と複雑な心奇形を合併する稀な疾患であり、多彩な症状が単一の症候群を形成することが1950年代から注目されていた。先天的に脾臓を欠損、または複数の脾臓を有する状態に加えて、様々な心奇形や内臓異常、免疫低下をともなう。複雑な心奇形によるチアノーゼと心不全症状を認め、体重増加不良や易疲労などの症状を呈する。複雑心奇形の治療は機能的根治手術に尽きるが、特に動脈管依存性心疾患の循環動態においては、肺動脈と大動脈間のシャントが必須である。そのために正常児では閉鎖するはずの動脈管を、開存させなければならない。動脈管は生後まもなく閉鎖してしまうため、これらの患児においては動脈管拡張作用をもつプロスタグランジンの点滴によって、閉鎖を強制阻止する必要がある。内臓錯位症候群にともなう、動脈管依存性先天性心疾患の患児にとって、動脈管を開存させておくプロスタグランジンの点滴は不可欠である。ところが、プロスタグランジンには動脈管内膜肥厚作用があり、さらに半減期はきわめて短い(数分)のために、点滴用カテーテルからの漏れや詰まり、あるいはカテーテルの差し替え作業中の動脈管の閉鎖がある。また脾臓欠損により免疫能が低下している為、持続点滴による感染リスクが極めて高い。

プロスタグランジンは数十年前から使用されている薬であるが、成人に比して患者数が圧倒的に小さいため、この分野の新しい研究開発は進んでいない。我々の研究結果から、プロスタグランジンの動脈管拡張作用は、下流のアデニル酸シクラーゼの活性化に依存することが解った。したがって動脈管アデニル酸シクラーゼサブタイプを直接活性化すれば、プロスタグランジンに比してはるかに効果的で長時間作用性に動脈管を開存させることが出来る。本助成研究において、我々はそのような薬剤候補化合物 (FD1) を同定し、長時間作用性で、内膜肥厚を起こさないなど、プロスタグランジンを上回る効果を示すことを報告した (*Circ Res*, 2010)。さらに市販のホスホジエステラーゼサブタイプ阻害剤に、FD1と同様の有益な動脈管拡張作用がある事を実証した。とりわけホスホジエステラーゼサブタイプは、内臓錯位症候群の患児の動脈管にも高発現することを見出した (*Circ J*, 2012)。また患児の酸素投与(論文投稿中)や輸液成分の調節(学会発表済)によって動脈管の開存が制御できる可能性を見出した。このことは本症候群の患児の動脈管制御に、早期臨床応用が可能であることを意味する。この発見は内臓錯位症候群の新規治療法として有望な可能性を示すと共に、他の難治性疾患における複雑心奇形の患児にも同様の可能性を示し、今後の関連研究の方向性を強く示すものである。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

岩本真理 横浜市立大学 准教授

横山詩子 横浜市立大学 講師

押川仁 横浜市立大学 助教

市川泰広 横浜市立大学 助教

A. 研究目的

内臓錯位症とは、「本来は非対称の発育を示す臓器や臓器系が、左右対称性に発育してしまったもの」である。そのため本来は左側にしかない脾臓が両側で欠損する（無脾症）あるいは左右両方にある（多脾症）。消化管も左右分化しないため回転障害をおこす。もっとも重篤なのが、左右分化が必須である心臓であり、このため様々な心奇形を合併する。肺動脈が閉鎖されている例も多く、この場合は体肺動脈シャントを外科的に作る必要がある。形態的根治はできないが、体肺循環だけを機能的に修正することは可能であり（機能的根治手術）、これが治療の主体をなす。

動脈管は胎児期に「肺動脈の血液」を「大動脈に短絡」させる「連結管」である。正常児では生直後に閉鎖するが、内臓錯位症の患児では心奇形と共に肺動脈が閉鎖されていることが多く、根治手術を行うまで動脈管を開存させておかねばならない。このため動脈管拡張作用のあるプロスタグランジンを用いる。

プロスタグランジンは数十年前から現在も使用されている、「唯一の動脈管拡張剤」であるが、その後の研究開発は進んでいない。本薬剤の対象となる患児数が、成人疾患に比べて少なく、研究者数も少なく、多くの研究助成の対象になっていないことも一因である。

プロスタグランジンの最大の欠点は「持続時間が短い」ことと、動脈管血管平滑筋の遊走による「内膜肥厚作用」である。このため持続点滴が必要であるが、長期間投与すると血管内膜が厚くなり、内腔が狭くなる。そのために点滴が途切れると、動脈管の閉鎖を起しやすくなってしまふ。プロスタグランジンは留置ラインで持続点滴するが、内臓錯位症では免疫能が低下していることがあり、ライン感染を起しやすいく。ライン交換の度に患児は動脈管閉塞の危険にさらされ、小児循環器医の日常の重要

課題となっている。

本申請では上記の「プロスタグランジンの欠点を無くした動脈管拡張薬」あるいは治療法の開発を目指した。プロスタグランジンと同様の動脈管拡張作用を持つが、作用時間が長く、一方で平滑筋遊走や内膜肥厚作用を持たない薬の開発をおこなった。とりわけ我々のこれまでの研究成果を活用し、患児に早期臨床応用できる可能性を検討した。

プロスタグランジンは受容体を活性化し、下流の「アデニル酸シクラーゼ」を活性化して cAMP 産生を促して動脈管を拡張する。そこでプロスタグランジン受容体ではなく、下流のアデニル酸シクラーゼを直接刺激する薬剤、あるいは「ホスホジエステラーゼ阻害」によって動脈管平滑筋細胞内の cAMP を上昇させる薬剤を検討した。

更に我々は、一層の早期の臨床実現化を目指して、「既存の治療法の改善」によって動脈管を制御する方法を検討した。一般に内臓錯位症候群など複雑心奇形の患者は全身状態が悪く、「酸素投与と輸液」などが重要となる。しかるに酸素投与や輸液は補助療法であり、積極的な治療法として考えられておらず、研究開発は進んでいなかった。逆に酸素や輸液であれば、複雑な薬事申請を経ることなく早期に実用化が可能である。

本申請では、循環器分野の基礎研究者（代表者）と、小児循環器専門医である基礎研究者、日常多数の患児を診察する臨床小児循環器専門医が共同して、わが国から新しい内臓錯位症の治療薬を開発することを目指した。特に臨床家の立場からは、内臓錯位症候群は複雑心奇形が合併し、血行動態を修正するために手術が必要となるが、その術前の患児の状態が術後の経過に大きく影響を及ぼす。動脈管依存性の心疾患が合併することが多く、手術までは動脈管

の安定した開存が求められた。

また研究の一部において有望な研究成果を上げたことから、早期臨床応用を目的として、**臨床試験および薬事申請**の専門家の助言を求めることとなった。

## B. 研究方法

申請の目的は内臓錯位症の患児に「**副作用の少ない治療薬**」を開発することである。そのためにプロスタグランジンを超える長時間の血管拡張作用を持ち、内膜肥厚作用を持たない拡張薬を開発する。このような薬は、分担研究者をはじめとする小児循環器医にとって、日常的に極めて重要な事項である。

プロスタグランジンは受容体を活性化し、「**アデニル酸シクラーゼ**」を活性化する。アデニル酸シクラーゼはcAMPを産生し、セカンドメッセンジャーとしてプロスタグランジンの細胞作用を引き起こす。アデニル酸シクラーゼには9種類のサブタイプがあるが、動脈管にはそのうちの6種類が発現する。なかでも2型と6型が多いことが、これまでの研究でわかった。我々は2型と6型サブタイプをそれぞれ選択的に刺激する化合物(FD1およびFD6)を合成した。FD1とFD6は、植物抽出化合物のフォルスコリンから我々の研究室で誘導合成された。フォルスコリンはアデニル酸シクラーゼのサブタイプをすべて刺激するが、FD1とFD6はアデニル酸シクラーゼの特定のサブタイプだけ刺激するようにした誘導體である。

しかるにFD1およびFD6は新規化合物であり、臨床実用化に至るまでには長期にわたる前臨床・臨床試験が必要である。そこで平滑筋細胞内cAMP濃度制御を目的として、「**市販のホスホジエステラーゼ・3型サブタイプ特異的阻害剤**」(ミルリノンおよび近年発売となったオルプリノン)の動脈管開存への応用を検討した。とりわけ内膜肥厚の誘発があるかを検討した。また内臓錯位症候群における有効性を検討するため、同疾患の患児より得られた動脈管組織において、標的となるホスホジエステラーゼ・3型サブタイプが発現するかの検討を行った。

更に一層の早期臨床応用を目指して、一

般療法である「**酸素投与や輸液**」が動脈管の開存に及ぼす影響について検討した。酸素や輸液は補助療法として一般的であり、**改良および実用化が容易**と考えられたためである。とりわけ近年では栄養補給目的でアミノ酸輸液が用いられているが、その成分の持つ意義については新しい検討はなされていない。

実験に当たっては、「**ラット胎児瞬間凍結法**」を用いた。我々の研究室では長年確立されている手法であり、胎児を瞬間凍結し、病理切片を作成して動脈管の開存状態を客観的に評価できる手法である。また動脈管平滑筋の培養細胞や動脈管の器官培養、プロスタグランジン(EP4)受容体欠損動物やアデノウイルスなどによる遺伝子導入実験をおこなった。また患者検体については附属病院および関連施設における手術検体を使用させていただいた。

## C. 研究結果

### 1. アデニル酸シクラーゼサブタイプ刺激剤の開発 (Circ Res 2010)

我々の開発したアデニル酸シクラーゼサブタイプの特異的刺激剤であるFD1とFD6は共に**動脈管を開存**させることがわかった。これはEP4刺激の下流にアデニル酸シクラーゼサブタイプがあるため、その刺激作用であることが推察された。しかるにFD1はヒアルロン酸産生能を変えないが、FD6はヒアルロン酸合成酵素の発現を大幅に上げ、ヒアルロン酸を増やすことがわかった。このことはアデニル酸シクラーゼの直接刺激効果が、サブタイプ別に異なることを意味する。つまり特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプの活性化により(FD1)、プロスタグランジンの副作用である**内膜肥厚作用を起こさず**に、**動脈管開存**を維持できる。

我々はさらに動物モデルで、アデニル酸シクラーゼサブタイプ刺激剤の効果時間を検討したところ、動物実験では、FD1の作用時間はプロスタグランジンの十数倍であることがわかり、またFD1はプロスタグランジンの重篤な副作用である**無呼吸発作**を誘発しなかった。

これらの効果はアデノウイルス発現系を



用いた実験やアデニル酸シクラーゼ 6 型欠損動物等において確認された。とりわけ後者において内膜肥厚が減少しており、6 型が内膜肥厚に重要な役割を果たすことが解った。また前者においては 2 型サブタイプがヒアルロン酸産生を引き起こさずに拡張作用を示すことから、本薬効に主体をなすと考えられた。

## 2. ホスホジエステラーゼ阻害薬の動脈管拡張薬としての開発 (*Circ J* 2012)

アデニル酸シクラーゼ刺激と同様な細胞内 cAMP 濃度の上昇は、cAMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼ阻害でも可能である。ホスホジエステラーゼ・3 型サブタイプ阻害剤は、すでに心奇形児の心不全に臨床応用されており、FD1 より早期実用

化が可能と考えられた。そこでミルリノンおよび最近認可となったオルプリノンについて、動脈管開存作用を調べた。心不全児における使用量では、拡張作用はプロスタグランジンより強く、また持続時間は 4-6 時間と長期であった。また内膜肥厚のメカニズムであるヒアルロン酸産生、細胞遊走、細胞増殖能を検討したが、いずれの亢進も見られなかった。

ミルリノン、オルプリノンはホスホジエステラーゼ・3 型サブタイプの選択的阻害剤であるが、この標的サブタイプが内臓錯位症候群（図中の無脾症）の患児動脈管組織に高発現することを免疫組織染色で見出した。同様の高発現は大動脈離断症、完全大血管転位症、総肺静脈還流異常症などの複雑心奇形においても得られた（図 1）。

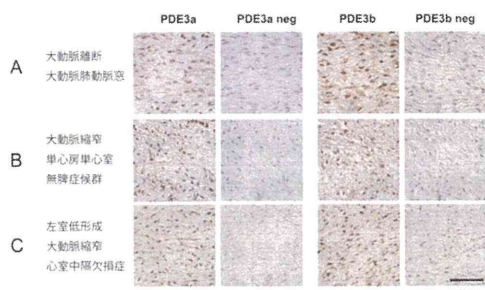


図1. 内臓錯位症候群(無脾症候群)を含めた様々な先天性疾患のヒト動脈管組織においてPDE3a, PDE3bのタンパク発現を検討し、いずれの症例も動脈管平滑筋層および内膜肥厚部でPDEは高発現していた。(Ichikawa et al. FEBS Lett. Submitted)

## 3. 酸素による動脈管の制御 (論文改訂中, *Nature Medicine*)

心奇形児をはじめとする未熟児には酸素投与が行われるが、未熟児網膜症や肺障害の為に、血中の「酸素飽和度」は、従来よりも低く目標設定される。しかし酸素飽和度に関して、臨床的なエビデンスやと循環動態に基づく実証検定は行われていない。そのため各施設によって、飽和度設定にばらつきがある。

我々は出生後の酸素化による ROS の産生が引き金となって、動脈管平滑筋細胞から成長因子 (bFGF) の分泌を促し、これが動脈管の平滑筋細胞の遊走と、内膜肥厚による閉鎖を引き起こすことを発見した。この現象は動脈管に特徴的であり、同時期の大動脈の平滑筋細胞には見られない。胎盤から分泌されるプロスタグランジンが出

生により途絶し、プロスタグランジンのもつ内膜肥厚作用を引き継ぐ形で、酸素による bFGF 分泌が内膜肥厚を継続させると考えられる。従って「酸素飽和度を上げれば、内膜肥厚は促進する」と推測される。このことはヒト患児において、動脈管閉鎖の場合は、酸素飽和度を高めに設定する必要がある。臨床現場では、十分な客観的理由がない状態で、飽和度設定には施設間に違いがあるが、動脈管開存を目的とした設定をすることで、設定理由を明らかにできると考えられる。

## 4. 輸液 (浸透圧) による動脈管の制御 (平成 23 年度日本未熟児新生児学会学術集会など 5 件発表)

酸素投与と並んで、一般的かつ普遍的に行われるのが輸液である。しかし輸液、特に「輸液中の浸透圧」に、動脈管制御の治



療的な意義があるとは、考えられていない。

我々は、動脈管平滑筋細胞に**浸透圧感受性イオンチャンネル (TRPM) 発現**が高い事を見出した。そこでラット新生仔における出生後の血清浸透圧変化を調べたところ、動脈管閉鎖前に一過性の浸透圧の低下が確認された。ラット胎児瞬間凍結法を用いて、高張輸液にてラット新生仔の浸透圧の低下を阻止したところ、動脈管閉鎖の抑制が見られた。また動脈管摘出標本でも浸透圧を低下させると、動脈管張力が低下した。このような所見は大動脈では見られない。このことは「**浸透圧の低下が、動脈管閉鎖を引き起こす**」ことを意味する。出生後の浸透圧低下はヒト正常児でもみられたが、動脈管開存症児では、逆にこの低下が見られなかった。つまりヒトにおいても、血清浸透圧を高いままにすると動脈管が開存する可能性がある。

一方で血清浸透圧は輸液中の**アミノ酸組成**によって強い影響を受けることが解った。現在のヒト新生児に使用されているアミノ酸輸液組成は、80年代に母乳や未熟児の血清データに基づいて作成されたものである。当時は1000g以下の超低出生体重児や複雑心奇形児は生存が困難であったため、対象となっていない。

我々は味の素イノベーション研究所と共同で、正常及び(超)低出生体重児の**血清アミノ酸分析**を施行したところ、低出生体重児には特徴的なパターンがあることが解った。これは従来考えられたいよりも、いわゆる未熟児におけるアミノ酸代謝が複雑であることが推測され、この結果を取り入れたアミノ酸組成が必要と考えられる。

さらにアミノ酸組成によって浸透圧を変換することが出来、動物実験からは「**アミノ酸組成の変更で動脈管制御**」ができる可能性が得られた。

これまでアミノ酸補給という、単に栄養代謝的に考えられてきたアミノ酸輸液が、実は動脈管開存には重要な役割と果たすと考えられる。このことは複雑心奇形を伴う内臓錯位症候群をはじめとする、難治性疾

患患児のアミノ酸輸液において、とりわけ重要な発見であると考えている。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び横浜市立大学医学部で定めた倫理規定等を遵守し行った(承認番号10-14)。動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させた。本研究における全ての遺伝子組換え実験ならびに遺伝子組換え生物等の譲渡、移動等は、カルタヘナ議定書、遺伝子組換え生物等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、ならびに研究施設の属する自治体の条例等を遵守し、遺伝子組換え実験安全委員会等において審議され大臣承認または機関承認された実験計画書にもとづいて、遺伝子組換え実験登録施設において適切な拡散防止措置のもと実施された。アデノウィルスベクターやプラスミドを用いた遺伝子組み換え操作、遺伝子改変動物使用(承認番号57, 58, 59)に関する承認も同大学から受けており、適切な拡散防止措置のもと実験が行われた。

ヒト検体使用に関しても横浜市立大学附属病院(承認番号B100107034:平成21年3月20日承認)および神奈川県立こども医療センターの倫理委員会の承認を得て、個人情報の取り扱いその他倫理規定を遵守した上で実験を行っている。

## E. 結論

内臓錯位症候群では合併する主たる奇形としての心奇形があり、このため患者は根治的な手術を待たねばならない。この際に重要なことは、通常の未熟児における場合と異なり、動脈管が閉塞してはいけない。これには血管拡張薬であるプロスタグランジンを用いて、動脈管を拡張させるが、プロスタグランジンにはヒアルロン酸分泌を介した動脈管血管平滑筋細胞の遊走の亢進と、それに引き続く動脈管内膜の肥厚が起こる。これが内臓錯位症候群の患者では問題点となる。根治手術までに、内膜肥厚が進みすぎると、内膜肥厚の為に動脈

管が閉塞してしまうためである。従って、プロスタグランジンと同様の血管拡張作用を有するが、動脈管の内膜肥厚を起こさない薬物が必要である。

本研究成果では、プロスタグランジン受容体の下流にあるアデニル酸シクラーゼの特定のサブタイプを標的にした新規化合物 (FD1) によって、長時間作動性で、内膜肥厚を起こさない動脈管拡張が達成できる可能性が示された。

さらにホスホジエステラーゼ3型サブタイプ阻害剤であるミルリノン、オルプリノンによっても同様の治療効果が得られることが解った。ホスホジエステラーゼ3型サブタイプは、内臓錯位症候群をはじめとして、大動脈転位症などの複雑心奇形児の動脈管にも高発現することから、**早期の臨床応用**が可能であろう。特に後者は既に未熟児の心不全治療に使われていることから、適応外使用としての臨床応用が考えられる。

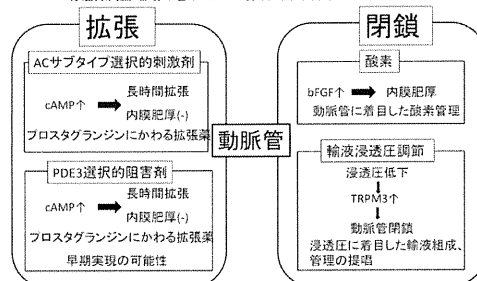
また、これまでは積極的な治療法と考えられていなかった酸素投与や輸液が、動脈管制御に重要な役割を果たすことが解った。これは新薬ではなく、一般的な補助療法である。このため治療ガイドラインの一部の改訂で、動脈管制御に適切な酸素投与や輸液を設定できる。迅速な実用化が可能と考えられる。

我々の実験結果は完結したものではないが、臨床応用の重要性から、**引き続き今後の検討が必要な事項**であると考えられる。特に内臓錯位症候群だけでなく、コストロ・CFC 症候群関連疾患群のように、シグナル系に遺伝子異常が解っている、他の難治性疾患における心奇形患児においても、浸透圧と酸素は適応が容易で、かつ有効性が高いと考えられる。内臓錯位症候群をはじめとする複雑心奇形を伴う難治性疾患の患児は、症例数も少ないため、治療法の開発も困難である。

しかるに臨床上的問題点や遺伝子変異などの原因をしっかりと踏まえた上で、本研究成果にみられるような基本的な治療戦略が可能になると考えられる。

図2に今回の助成研究で開発研究された可能性をまとめる。

図2 助成研究成果としての内臓錯位症候群 (難治性心疾患)での動脈管制御の新規治療法



我々はこの可能性を早期に実現するため、**臨床試験** (本学臨床試験センター) および **薬事申請 (PMDA)** の専門家との協議を開始した。これまで研究開発の遅れている難治性疾患患児の動脈管制御法の改善により、治療予後の改善と、安心安全の新しい治療法を開発する一助となればと願っている。

(付記)

なお本研究成果は平成23年9月18日に**厚生労働省成果発表会**として「内臓錯位症候群の疫学と治療実態に関する研究」班と合同で、横浜市立大学附属病院にて発表会を行い、一般の参加者とともに熱心な討議が行われた。また共同研究者の横山詩子は本功績により第52回日本平滑筋学会にて**栗山照賞**を受けた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

英文投稿中

Jin M-H, Yokoyama U, Akaike T, Shioda A, Ishiwata R, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, and Ishikawa Y : Oxygenation-induced remodeling of postnatal ductus arteriosus with basic fibroblast growth factor signaling. Nature Medicine in revision (引用論文)

英文発表

Ichikawa Y, Yokoyama U, Okumura S, Sato M, Iwasaki S, Iwamoto M, Yokota S, Masuda M, Aso T, Ishikawa Y : Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Forming Intimal Thickening. Circ J, 2012, in press.

Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, and Ishikawa Y : Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. Circ. Res, 106: 1882-1892, 2010 (引用論文)

Suzuki S, Yokoyama U, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kurotani R, Sato M, Okumura S, and Ishikawa Y : Differential roles of Epac in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. J. Biol. Chem, 285: 24248-24259, 2010.

Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, and Ishikawa Y : Caveolin gene transfer improves glucose metabolisms in diabetic mice. Am. J. Physiol. Cell Physiol, 298:C450-456, 2010.

Guellich A, Vatner DE, Gao S, Hong C,

Yan L, Wagner TE, Dhar S, Ghaleh B, Hittinger L, Iwatsubo K, Ishikawa Y, and Vatner SF: Effect of cardiac overexpression of type 6 adenylyl cyclase affects on the response to chronic pressure overload. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol, 299:H707-712, 2010.

Kheirbek MA, Beelerl JA, Chi W, Ishikawa Y, and Zhuang X: A molecular dissociation between cued and contextual appetitive learning. Lern. Mem, 17:148-154. 2010.

Sato M and Ishikawa Y: Accessory proteins for heterotrimeric G protein: Implication in the cardiovascular system. (Review). Pathophysiology, 17:89-99. 2010.

Yokoyama U, Minamisawa S, and Ishikawa Y : Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. (Review). J. Smooth Muscle Res, 46: 77-87, 2010.

Oshikawa J, Toya Y, Umemura S, and Ishikawa Y : The role of caveolae, lipid rafts and caveolin in insulin signaling. Trends in Cell & Mol. Biol, 5: 23-33, 2010.

Oshikawa J, Urao N, Kim HW, Kaplan N, Razvi M, McKinney RD, Poole LB, Fukai T, Ushio-Fukai M: Extracellular SOD-Derived H2O2 Promotes VEGF Signaling in Caveolae/Lipid Rafts and Post-Ischemic Angiogenesis in Mice. PloS ONE 5, 5: e10189, 2010.

Asino T, Sudhakar V, Urao N, Oshikawa J, Chen GF, Wang H, Finney L, Vogt S, McKinney RD, Maryon EB, Kaplan JH, Ushio-Fukai M, Fukai T: Unexpected role of the copper transporter ATP7A in PDGF-induced vascular smooth muscle cell migration. Circ Res, 107:

787-799, 2010.

Urao N, Razvi M, Oshikawa J, McKinney RD, Chavda R, Bahou WF, Fukai T, Ushio-Fukai M: IQGAP1 is involved in post-ischemic neovascularization by regulating angiogenesis and macrophage infiltration, *Plos ONE* 5, 5: e13440, 2010.

Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Yunze B, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, and Ishikawa Y : TFE3 is an activator of G protein signaling for nuclear Galp ha16 subunit in the cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem*, 286:17766-17776, 2011.

Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, and Kimura S : Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation. *J. Biol. Chem*, 286:19682-19692, 2011.

Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y and Minamisawa S: DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J. Physiol. Sci*, 61:167-179, 2011.

Matsusaki M, Kadowaki K, Adachi E, Sakura T, Yokoyama U, Ishikawa Y, and Akashi M: Morphological and Histological Evaluations of 3D-Layered Blood Vessel Constructs Prepared by Hierarchical Cell Manipulation. *J. Biomaterials Sci*, in press, 2011.

Sato M, Yokoyama U, Fujita T, Okumura S, and Ishikawa Y: The roles of cytochrome P450 in ischemic heart disease. *Current Drug Metabolism*, 12: 526-532, 2011.

Jiao Q, Takeshima H, Ishikawa Y, and Minamisawa S: Sarcalumenin plays a

critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium*, in press, 2011.

Umemura M, Ho D, Nozawa N, Balginnyam E, Iwatsubo K, Saito T, Endo T, Ishikawa Y, Umeura S, and Kimura K: Acute pulmonary embolism induced by renal obstruction with benign prostatic hyperplasia; Case Report. *J. Cardiol. Cases*, in press, 2011.

Fujita T and Ishikawa Y : Apoptosis in heart failure. The role of the beta-adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes. *Circ J*, 75: 1811-1818, 2011.

Iwamoto M: Idiopathic ventricular tachycardia in children. *Circulation Journal*, 75: 672-676, 2011.

Horigome H, Ishikawa Y Shiono J, Iwamoto M, Sumitomo N, and Yoshinaga M: Detection of extra components of T wave by independent component analysis congenital long-QT syndrome. *Circulation Arrhythmia and Electrophysiology*, 4: 456-464, 2011.

Hokosaki T, Mori M, Nishizawa T, Nakamura T, Imagawa T, Iwamoto M, and Yokota S: Long-term efficacy of plasma exchange treatment for refractory Kawasaki disease. *Pediatric International*, in press, 2011.

Ishikawa Y, Iwamoto M, Yanagi S, and Masuda M: Intrapericardial and Retrocardial Implantation of Implantable Cardioverter Defibrillator Lead in a Child with Type 3 Long QT Syndrome. *Pediatric Cardiology*, 32:1048-1052, 2011.

Matsusaki M, Kadowaki K, Adachi E, Sakura T, Yokoyama U, Ishikawa Y, and Akashi M: Morphological and

Histological Evaluations of 3D-Layered Blood Vessel Constructs Prepared by Hierarchical Cell Manipulation. J Biomater Sci Polym Ed, 23: 63-79, 2012.

## 和文

岩本真理、西澤崇、渡部重朗、市川泰宏、志水直、山口和子、赤池徹、横山詩子、瀧間浄宏、佐近琢磨、安井清、柴田利満、新村一郎、横田俊平：運動誘発性発作を呈する QT 延長症候群の運動負荷心電図の特徴について. 日本小児循環器学会雑誌, 第 26 巻第 1 号: 67-72, 2010.  
岩本真理：不整脈—最新主要文献と解説—. 総合小児科診療のための小児科学レビュー2010, 49-53, 2010.

住友直方、岩本真理、吉永正夫、堀米仁志、他：小児不整脈の診断・治療ガイドライン. 日本小児循環器学会雑誌, 別冊, 2010.

石川義弘：心不全の治療標的としてのアデニル酸シクラーゼ. 医学の歩み, 232: 577-581, 2010.

石川義弘：cAMP シグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究 コスメトロジー研究振興財団研究業績中間報告集, 19: 68-81, 2010.

石川義弘、佐藤元彦、奥村敏、横山詩子、岩坪耕策：cAMP シグナルとニコチン受容体. 平成 21 年度喫煙科学研究財団研究年報, 109-114, 2010.

## 2. 学会発表

市川泰広、山口和子、渡辺重朗、西澤崇、岩本真理：胎児期・新生児期に治療に難渋した胎児水腫合併持続性胎児頻拍の 1 例. 第 15 回日本胎児心臓病学会, 大阪, 2010, 2. 一般口演

市川泰広、咲間裕之、渡辺重朗、西澤崇、岩本真理、益田宗孝、三浦倫一、柳貞光：薬剤抵抗性の先天性 QT 延長症候群 (LQT3) にたいして植え込み型徐細動器 (ICD) を植え込んだ 1 女児例, 第 46 回日本小児循環器学会, 千葉, 2010, 7. ポスター

渡辺重朗、岩本真理、西澤崇、市川泰広、咲間裕之：小児肥大型心筋症における運動負荷心電図所見の検討. 第 46 回日本小児循環器学会, 千葉, 2010, 7. ポスター

笠間啓一郎、松木佑介、南智行、鈴木伸一、磯松幸尚、益田宗孝、咲間裕之、市川泰広、渡辺重朗、西澤崇、岩本真理：動脈スイッチ手術の遠隔成績—最近 10 年間の検討. 第 46 回日本小児循環器学会, 千葉, 2010, 7. ポスター

笠間啓一郎、松木佑介、南智行、鈴木伸一、磯松幸尚、益田宗孝、咲間裕之、市川泰広、渡辺重朗、西澤崇、岩本真理：三尖弁への介入が必要であった心室中隔欠損症に合併した活動期感染性心内膜炎の外科治療. 第 46 回日本小児循環器学会, 千葉, 2010, 7. ポスター

松木佑介、南智行、笠間啓一郎、鈴木伸一、磯松幸尚、益田宗孝、咲間裕之、市川泰広、渡辺重朗、西澤崇、岩本真理：未破裂で診断された Valsalva 洞動脈瘤 4 症例の外科的検討, 第 46 回日本小児循環器学会, 千葉, 2010, 7. ポスター

南智行、松木佑介、笠間啓一郎、鈴木伸一、磯松幸尚、益田宗孝、咲間裕之、市川泰広、渡辺重朗、西澤崇、岩本真理：大動脈弁輪拡張症, 大動脈弁閉鎖不全症を伴う小児 Marfan 類似疾患に対する外科治療経験, 第 46 回日本小児循環器学会, 千葉, 2010, 7. ポスター

市川泰広、咲間裕之、渡辺重朗、西澤崇、岩本真理、益田宗孝、三浦倫一、柳貞光：メキシレチンで心室細動のコントロールをしきれず,  $\beta$  ブロッカーを併用した ICD 植え込み後の LQT3 女児例. 第 15 回小児心電学研究会, 福岡, 2010, 11. 一般口演

横山詩子：Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A. 第 52 回日本平滑筋学会総会 栗山熙 受賞記念講演, 仙台, 2010, 7.

Shioda A, Yokoyama U, Kato Y, Asou T,

Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y : Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 33<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biological Society of Japan , Kobe , 2010, 12.

Yokoyama U, Shioda A, Kato Y, Asou T, Aoki H, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y : Prostaglandin EP4 Signaling Negatively Regulates Vascular Elastic Fiber Assembly. The 84<sup>th</sup> Scientific Session, American Heart Association (AHA), Chicago, USA , 2010, 11.

青木理加, 横山詩子, 岩崎志穂, 西巻滋, 横田俊平, 石川義弘: ラット動脈管閉鎖における低浸透圧センサー Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) チャネルの役割. 第55回未熟児新生児学会・学術集会, 神戸, 2010, 11. (引用発表)

岩崎志穂, 青木理加, 西巻滋, 横田俊平, 南沢亨, 横山詩子: ラット動脈管内膜肥厚におけるアデニル酸シクラーゼA1イソフォームの役割の検討. 第46回日本周産新生児医学会, 神戸, 2010, 7. Minamisawa S, Yokoyama U, Akaike T, Hammond K, Ishikawa Y : Counteracting regulation of vascular remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus. The 16<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, Los Angeles , 2010. 6.

Jin MH, Yokoyama U, Akaike T, Qibin J, Yokota S , Minamisawa S , Ishikawa Y : The Role of basic Fibroblast growth factor in Vascular Remodeling in Rat Ductus Arteriosus. The 113<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Pediatric Society, Morioka, 2010. 4.

市川泰広, 金晶恵, 咲間裕之, 西澤崇, 岩本真理: 大量気管出血に対してコイル塞栓を施行した HLHS, Norwood 術後の症例 . 第 22 回日本 Pediatric

Interventional Cardiology 学会, 岡山 , 2011, 1. ポスター

Ichikawa Y : Hypoosmolarity induces contraction of the rat ductus arteriosus using a wire myograph system . Yokohama Waseda Cardiovascular Collaborative Meeting , 東京, 2011, 1. 口演

市川泰広, 青木理加, 岩本真理, 南沢亨, 横山詩子, 石川義弘: 出生後の血清浸透圧の変化が動脈管収縮に及ぼす作用の検討, 日本小児循環器学会, 福岡, 2011, 7. ポスター (引用発表)

市川泰広, 横山詩子, 石川義弘: PDE3 阻害薬の動脈管拡張薬としての検討. 厚生労働省科学研究費成果発表会, 横浜, 2011, 9. 口演

Yokoyama U, Shioda A, Ishiwata R, Suzuki S, Masuda M, Asou T, Aoki H, Sugimoto Y, Nakamura T, Minamisawa S, Ishikawa Y : Molecular mechanism of the regulation of vascular elastic fiber formation. The 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan , Matsumoto , 2011 , 3. (symposiast)

Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y : Regulation of vascular remodeling of the ductus arteriosus. The 88<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Yokohama, 2011, 3. (symposiast)

青木理加, 横山詩子, 市川泰広, 南沢亨, 石川義弘: 動脈管閉鎖における低浸透圧センサー Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) チャネルの役割. 心血管イオンチャネル・トランスポーター研究の新展開 --基礎研究と臨床研究の融合--, 生理学研究所研究会, 岡崎, 2011, 11. (引用発表)

青木理加, 横山詩子, 岩崎志穂, 関和男, 西巻滋, 横田俊平, 石川義弘: 動脈管収縮における出生後の血清浸透圧低下の役割. 第56回日本未熟児新生児学会学術集会, 東京, 2011, 11. (引用発表)



横田知大, 劉孟佳, 前川峻, 加藤尚志, 横山詩子, 南沢享: 動脈管内皮細胞の遺伝子プロファイリング. 第10回心臓血管発生研究会, 郡山, 2011, 10.

金美花, 横山詩子, 石渡遼, 南沢享, 石川義弘: 酸素による動脈管リモデリング. 第10回心臓血管発生研究会, 郡山, 2011, 10.

Minamisawa S, Yokoyama U: Prostaglandin EP4 Signaling Plays a Critical Role in Vascular Elastic Fiber Disruption in the Ductus Arteriosus. The 7th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, Taipei, 2011, 9.

加藤 優子, 横山詩子, 奥村 敏, 南沢 享, 佐田 政隆, 宮島 栄治, 石川義弘: Epacl は血管障害時の内膜肥厚形成を促進する. 第53回日本平滑筋学会, 東京, 2011, 8.

Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S: Three dimensional cellular multi-layer technology utilized evaluation of elastic fiber formation and phenotype of rat vascular smooth muscle cells. The 7th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum, Fukuoka, 2011, 7.

市川泰広, 青木理加, 横山詩子, 岩本真理, 南沢享, 石川義弘: 出生後の血清浸透圧低下は動脈管収縮を促進させる. 第47回日本小児循環器学会総会・学術集会, 福岡, 2011, 7. (引用発表)

Yokota T, Aida T, Yokoyama U, Minamisawa S: Thromboxane A2 receptor stimulation induces closure of the rat ductus arteriosus. The 114th Annual Meeting of the Japan Pediatric

Society, Tokyo, 2011, 4.

Kato Y, Yokoyama U, Okumura S, Minamisawa S, Sata M, Miyajima E, Ishikawa Y: Epacl promotes vascular remodeling upon vascular injury *in vivo*. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Yokohama, 2011, 3.

Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S: Serum depletion and three-dimensional multilayer composition induce elastic fiber formation and a contractile phenotype of rat vascular smooth muscle cells. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Yokohama, 2011, 3.

Liu N, Yokota T, Maekawa S, Yokoyama U, Kato T, Minamisawa S: Successful Isolation of Vascular Endothelial Cells from the Rat Ductus Arteriosus. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Yokohama, 2011, 3.

Jin MH, Yokoyama U, Akaike T, Shioda A, Ishiwata R, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Ishikawa Y: Oxygen-induced basic fibroblast growth factor contributes to anatomical closure of the rat ductus arteriosus. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, 2011, 3.

## G. 知的財産の取得状況

なし

[ II ]

## 分坦研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

臨床応用に向けた薬理効果の検討を中心とした内臓錯位症候群に対する  
新規治療薬の開発に関する研究

研究分担者 岩本 眞理 横浜市立大学医学部小児科 准教授

研究要旨

内臓錯位症候群は複雑心奇形が合併し、血行動態を修正するために手術が必要となるが、その術前の患児の状態が術後の経過に大きく影響を及ぼす。動脈管依存性の心疾患が合併することが多く、手術までは動脈管の安定した開存が求められる。本研究では、現在の治療薬であるプロスタグランディンEの問題点を症例から検討し、より動脈管選択的な効果的な治療薬の開発に携わった。

**A.研究目的**

先天性心疾患の中で血行動態が動脈管開存によって安定が保たれる組み合わせがみられる。それらは大きく2種類のパターンに分けられる。まず体循環が動脈管依存性である場合と肺循環が動脈管依存性である場合で

ある。いずれも重症な先天性心疾患であるが、前者は左心低形成症候群・大動脈離断複合・大動脈縮窄複合に代表される左心系全体の低形成をきたしている疾患群で順行性血流が少ないために動脈管を介して肺動脈の一部の血流を体血管に補うために動脈管

開存が必要となる。後者は肺動脈閉鎖・重症肺動脈狭窄に代表される肺血流が極端に少ないために動脈管を介して肺血流を補うために動脈管開存が必要となる。内蔵錯位症候群では大部分で複雑心奇形を伴い、上記に示したような動脈管依存性の血行動態を呈することは少なくない。循環動態を維持するうえで動脈管を開いておくために臨床の間ではプロスタグランジン E1 の持続点滴を施行するが、このほかに肺動脈圧と体血圧のバランスも血行動態に大きく影響する。体循環を維持するために動脈管を開いている場合には肺血圧は高めに維持しておかないと肺への血流が増大して低心拍出と肺血流増大による心不全の進行をきたすし、逆に肺血流を保つために動脈管を開いている場合には肺動脈圧が高すぎると肺への血流は十分に流れない。このような場合に循環動態を安定させるために補助療法として NO 吸入療法・低酸素換気療法を併用することがある。

また内蔵錯位症候群では2心室修復が不可能なこともしばしばみられ、最終的に肺動脈は心室を経由せず体静脈を直接肺動脈に吻合する Fontan 型の手術での修復となる。術後早期には肺への血流がスムーズに流れるようになるまで肺動脈圧を下げる工夫が必要になる。この場合に NO 吸入療法が著効することが少なからずみられ、まだ保健適応となっていないこの治療についての臨床的検討を行っている。

複雑心奇形で最終的に Fontan 型手

術を終了した後も長期予後についてさまざまな問題がある。術後遠隔期の不整脈はそのうちのひとつであり、頻脈発作の程度によっては生命に関わる問題になることもある。私たちは小児循環器医師を対象として先天性心疾患および不整脈の診断・治療のガイドライン作成を行った。先天性心疾患・基礎心疾患のある不整脈（とくに上室性）の部分について報告する。最後に実際に施行された臨床での心臓カテーテル検査・心臓手術数を紹介する。

## **B.研究方法**

### **1. NO 吸入療法**

2008年10月から2012年3月までの3年5カ月でNO吸入療法を施行した46例について検討した。

### **2. 低酸素換気療法**

3例に対して低酸素換気を施行した。これらの症例および低酸素換気療法をスタンバイした症例について検討した。

### **3. 先天性心疾患の学校管理区分**

児童生徒に見られる先天性心疾患においても以前から運動部（クラブ）活動の可と禁との判定の目安が示されていたが、予後も明らかにされ、治療法や手術成績も改善されてきた。そこで学校生活管理指導の指針を改正することが必要になった先天性心疾患について、外の文献や専門医の経験などを参考にしながら一部を改正した。

### **4. 不整脈治療**

先天性心疾患において不整脈は頻発する合併症である。近年、予後も明らか

かにされ、治療法や治療成績も改善されてきた。そこで先天性心疾患に合併する不整脈ガイドラインを作成することが必要になった。外の文献や専門医の経験などを参考にしながら一部を改正した。

### **C.およびD. 研究結果と考察**

#### **1.NO 吸入療法**

NO は強力な血管拡張作用をもち内因性にも血管内皮より分泌されることも知られている。NO 吸入療法は吸気ガス内への投与によって体血管には作用させずに肺血管に選択的に NO を供給することにより体血圧を下げずに肺血管抵抗を下げる効果がある<sup>1</sup>。46 例のうち 44 例は先天性心疾患の心臓術後でそのうち 10 例は体静脈一肺動脈吻合 (グレン手術・T C P C 手術)

にたいして施行。34 例は術後肺高血圧にたいして施行。あと拡張型心筋症の肺高血圧合併の 1 例と先天性心疾患で気管出血後の肺高血圧の 1 例に施行。37 例で血行動態の改善が得られた。9 例では効果みとめず中止した。有害現象・副作用はみられていない。【課題】P P H N にたいしては他社の製品で保険適応となっているが、新生児以外での適応なくいまだに承認の動きがない。【見通し】日本での新生児 P P H N 以外の疾患 (特に心臓手術後に需要が多いが) 適応拡大のため小児循環器学会で調整中であるが、まだ適応承認の時期は不明である。【課題】P P H N にたいする NO 吸入療法は先天性心疾患術後の小児における保健適応はまだ認められていない。ヨーロッ