

学 位 論 文 要 旨

氏名 LEONG ZI PING

題 目 : Effects of tyrosine kinase inhibitors on cardiopulmonary remodeling and hemodynamics in animal models of pulmonary arterial hypertension
(肺高血圧症モデル動物における心臓と肺血管リモデリングおよび循環動態に対するチロシンキナーゼ阻害薬の効果)

論文要旨 :

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by pulmonary artery (PA) proliferation and constriction, resulting in a resting mean PA pressure ≥ 25 mmHg. Current treatment algorithm of PAH consists of vasodilators which do not potently reverse cardiopulmonary remodeling (CPR), an important aspect of the PAH pathobiology. Further, therapies with high-dose tyrosine kinase inhibitors (TKIs) which include imatinib and nilotinib as a reversal agent for CPR are hampered by their adverse effects. Therefore, using a monocrotaline (MCT)-induced PAH rat model, we investigated the lowest yet effective therapeutic dose of several TKIs: imatinib (5, 15, 50 mg/kg) versus sunitinib (0.3, 1, 3, 10 mg/kg) in chapter 1; toceranib (1, 3, 10 mg/kg) versus sorafenib (10, 30, 100 mg/kg) in chapter 2, and masitinib (5, 15, 50 mg/kg) versus tadalafil (5, 10 mg/kg) in chapter 3. A high dose was defined as an anti-cancer dose, whereas a 1/3 reduction of the preceding dose yielded lower doses. In chapter 4, we also examined the long-term effects of the low-dose imatinib therapy (3 mg/kg) in the dogs with pulmonary hypertension secondary to chronic degenerative mitral valve disease.

In chapter 1, imatinib exhibited potent cardiopulmonary reversal abilities at 15 and 50 mg/kg. Compared with sunitinib, imatinib significantly and dose-dependently normalized right ventricular (RV) hypertrophy, brain natriuretic peptide (BNP) mRNA level, and muscularization of 20–50 μ m PAs. At molecular levels, imatinib downregulated pulmonary platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR- β), leading to a significant inhibition of mitogen-associated protein kinase (MAPK) signaling. By contrast, although sunitinib antagonized PDGFR- β , fibroblast growth factor receptor 1, vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2, and VEGF-A mRNAs, the MAPK inhibition was unremarkable at lower doses. The increased pulmonary muscularization and significant VEGF inhibition, in line with an upregulation of nestin mRNA suggested that the equivocal reversal of sunitinib may be due to its potent VEGF inhibition in the lungs.

In chapter 2, sorafenib significantly normalized the RV hypertrophy and BNP mRNA level, and increased the non-muscularized PA percentage. These effects were only observed in rats receiving the highest toceranib dose, and neither toceranib dose reduced the fully muscularized PA percentage. Although both sorafenib and toceranib significantly reversed the RV hypertrophy at 10 mg/kg, a significant reduction of the RV systolic and mean pressures was only seen in rats on sorafenib 10 mg/kg. The greater reversal abilities of sorafenib compared with toceranib were believed to be due to its simultaneous inhibition on the MAPK signaling and the C-X-C motif chemokine receptor (CXCR) type 4/C-X-C motif chemokine (CXCL) 12 axis, and autophagy induction in the lungs.

In chapter 3, masitinib (15, 50 mg/kg) significantly reversed RV systolic pressure, RV hypertrophy, and pulmonary vascular remodeling, indicating potent effects of masitinib against CPR. Tadalafil at 10 mg/kg, a human equivalent dose for PAH treatment, significantly decreased the RVH and increased PA lumen diameter and area, but did not normalize vascular muscularization. Masitinib significantly suppressed mRNA expression of pulmonary PDGFR- β , stem cell factor receptor (C-KIT), CXCR4, Raf-1 proto-oncogene serine/threonine kinase, and protein phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2. However, tadalafil showed insignificant antagonism on the MAPK pathway, despite its significant PDGFR- β and C-KIT inhibition. Further, the high-dose masitinib (50 mg/kg) produced comparable pulmonary phosphodiesterase-5 mRNA and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels to those of tadalafil, implying a role of masitinib in the nitrogen oxide/cGMP pathway. Moreover, the long-term treatment with masitinib (15 mg/kg) improved the survival and RV hemodynamics in the rats, compared with those of tadalafil.

In chapter 4, the follow-up evaluations at 1, 3, 5 and 6 months post-imatinib therapy revealed substantial clinical and hemodynamic improvements in the dogs. One dog showed deterioration after the imatinib withdrawal to necessitate a restart therapy. No side effects were observed throughout the 6-month treatment course.

In conclusion, a low-dose imatinib (15 mg/kg), sorafenib (10 mg/kg), and masitinib (15 mg/kg) in MCP-induced PAH rat model potently reversed the CPR and improved the PAH severity via inhibition of the MAPK pathway. Imatinib conferred long-term benefits without causing observable side effects in the dogs while masitinib improved survival in the rats. Therefore, these TKIs may provide a novel reversal agent to target the CPR in the PAH. The results of our study may serve pivotal foundation for further clinical investigation on their use for the treatment of PAH in humans and dogs.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	LEONG ZI PING
審査委員	主 査： 鳥取大学 教授 日 笠 喜 朗
	副 査： 山口大学 教授 奥 田 優
	副 査： 鳥取大学 教授 竹 内 崇 師
	副 査： 鳥取大学 教授 山 野 好 章
	副 査： 鳥取大学 教授 森 田 剛 仁
題 目	Effects of tyrosine kinase inhibitors on cardiopulmonary remodeling and hemodynamics in animal models of pulmonary arterial hypertension (肺高血圧症モデル動物における心臓と肺血管リモデリングおよび循環動態に対するチロシンキナーゼ阻害薬の効果)
審査結果の要旨：	
<p>肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は肺血管リモデリング (PR) と血管収縮により平均肺動脈圧が 25 mmHg 以上に上昇する致死的な病態である。PR には血小板由来増殖因子 (PDGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体 (R) を含む様々な細胞外または細胞内シグナル伝達の異常が関与し、その一つとして分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 経路が重要である。現在の PAH 治療にはホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) 阻害薬などの血管拡張薬が主に使用され、本質的原因の PR 抑制を標的とした治療は確立されていない。幾つかのチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) には PR 抑制効果が報告されたが、抗がん剤用量の使用による副作用が懸念されている。本研究はモノクローリン誘発性 PAH モデルラットを用い、TKI のイマチニブ (Ima)、スニチニブ (Sun)、トセラニブ (Toc)、ソラフェニブ (Sor)、マシチニブ (Mas) および PDE5 阻害薬のタダラフィル (Tad) が心臓と肺血管リモデリングおよびその関連因子ならびに循環動態へ及ぼす影響を比較し、PAH に対する TKI の有効性を検討した。さらに、イヌの肺高血圧症 (PH) 症例に対する Ima の有効性を検討した。尚、本論文では TKI の抗がん剤としての用量を高用量、その 1/3 以下の用量を低用量と定義している。</p> <p>第一章では、PAH ラットにおける Ima (5、15、50 mg/kg) と Sun (0.3、1、3、10 mg/kg) 投与の影響を比較した。Ima 15 と 50 mg/kg 投与は PR を抑制し、Ima は Sun より右室肥大と脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 遺伝子発現の抑制および筋性肺細動脈 (FMPA) の減少が強かった。肺組織 PDGFR-β、FGFR-1、VEGFR-2 遺伝子発現および VEGF-A 蛋白発現の低下は Sun が Ima に比べ顕著であったが、Ima は Raf-1 遺伝子発現とリン酸化 ERK-1/2 蛋白発現を減少したのに対し、Sun では有意な減少がなかった。Nestin 遺伝子発現は Sun でのみ増加がみられた。Sun は</p>	

Ima に比べ右室肥大と PR の抑制が弱く、その原因として Sun の強い VEGF 経路阻害による新生血管増生の関与が示唆された。さらに、PAH 治療に対する低用量 Ima の有用性が示唆された。

第二章では、PAH ラットにおける Toc (1, 3, 10 mg/kg) と Sor (10, 30, 100 mg/kg) 投与の影響を比較した。Sor は全群で右室肥大指数と BNP 遺伝子発現を減少し、非筋性肺細動脈 (NMPA) を増加した。一方、Toc は 10 mg/kg 投与でのみ NMPA を増加した。Sor と Toc 10 mg/kg はいずれも右室肥大を抑制したが、収縮期右心室圧 (RVSP) の低下は Sor が顕著であった。肺組織 VEGF-A、VEGFR-2 蛋白発現、C-X-C ケモカイン受容体 4 (CXCR4) 遺伝子、Raf-1 遺伝子発現およびリン酸化 ERK 1/2 蛋白発現は、Sor が Toc より強い抑制を示した。Sor ではオートファジーマーカーの p-62 遺伝子および LC3-II 蛋白発現の増加傾向を認めた。以上より、Sor は Toc より右室肥大と PR の強い抑制効果を示し、低用量 Sor は PAH 治療に有効である一方、Toc は PAH 改善効果が低いことを示唆した。Sor の PAH 改善効果には MAPK 経路阻害に伴う CXCR4 阻害とオートファジー促進が関与することを示唆した。

第三章では、PAH ラットにおける Mas (5, 15, 50 mg/kg) と Tad (5, 10 mg/kg) 投与の影響を比較した。Mas 15, 50 mg/kg は RVSP、右室肥大指数および FMPA を減少、NMPA を増加した。一方、Tad は RVSP を低下し、FMPA の内腔断面積を増加したが、NMPA を増加しなかった。Mas は肺組織 PDGFR- β 、C-KIT、CXCR4、CXCL12、Raf-1 遺伝子発現およびリン酸化 ERK-1/2 蛋白発現を抑制した。Tad は PDGFR- β と C-KIT 遺伝子発現を抑制したが、CXCR4、CXCL12、Raf-1 遺伝子発現およびリン酸化 ERK-1/2 蛋白発現を抑制しなかった。Mas と Tad はともに肺組織 PDE5 遺伝子発現を抑制し、環状グアノシンーリン酸濃度は Mas 50 mg/kg と Tad 10 mg/kg で同程度を示したことから、Mas は一酸化窒素 (NO) 経路にも影響することを示唆した。長期投与の比較では、Mas 15 mg/kg は Tad 10 mg/kg より RVSP の強い低下を示した。以上より、Mas は MAPK 経路関連因子、CXCL12/CXCR4 発現の阻害による PR 抑制と PDE5 抑制による血管平滑筋弛緩の両方により右心負荷を軽減する一方、Tad は主に NO 経路の PDE5 阻害による血管弛緩作用により右心負荷を軽減することを示唆した。低用量 Mas は PAH 治療に有効であり、Tad に劣らない効果が期待できると考えられた。

第四章では、イヌ僧帽弁閉鎖不全症 (MI) に続発した PH 6 症例における 6 か月間の低用量 Ima (3 mg/kg, 1 日 1 回) の効果を調べた。心エコー検査では Ima 投与後、三尖弁最高逆流速度、推定収縮期肺動脈圧、右心房/大動脈径比および拡張早期波/僧帽弁輪部拡張早期波比の低下がみられた。Ima 投与後の心不全マーカー (血漿 ANP、血清 NT-proBNP 濃度) に増加はなく、一般血液および血液生化学所見上の副作用もなかった。以上より、イヌの PH に対する低用量 Ima 投与は PH と左心拡張機能を改善し、6 か月間は良好に維持されることを示唆した。

本研究は 5 種類の TKI が PAH ラットの心臓と肺血管リモデリングおよびその関連因子ならびに循環動態へ及ぼす影響を明らかにし、PAH 治療における低用量 Ima、Sor、Mas の有用性およびイヌ PH 症例における Ima の有効性を明らかにした。本研究で得られた新知見は、TKI を獣医学および医学の呼吸循環器病の治療へ応用する上で有用であり、PH の病態メカニズムを研究する上でも貴重であると判断された。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。