

# 学 位 論 文 要 旨

(SUMMARY OF DOCTORAL THESIS)

氏 名(Name) SAHASHI, Yu

題 目(Title) : Studies on Therapeutic Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors for Pulmonary Hypertension in Dogs  
(犬の肺高血圧症に対するチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果に関する研究)

---

論文要旨(Summary) :

Pulmonary hypertension (PH) is defined as systolic pulmonary artery pressure (sPA) of >30 mmHg or mean pulmonary arterial pressure (mPAP) of >20 mmHg. The prognosis in dogs with PH is poor. It is caused by pulmonary arterial vasoconstriction and vascular remodeling. Several extracellular and intracellular signalling abnormalities including platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and c-Kit receptors have been implicated in this remodeling. Imatinib, tyrosine kinase inhibitor targeting PDGF and c-Kit receptors, reverse pulmonary vascular remodeling in PH model rats by inhibiting the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, and also have pulmonary vasodilatory effects. Using high doses of imatinib in humans with PH has yielded mixed results with side effects including nausea, thrombocytopenia and anemia. Similar adverse effects have been reported in dogs given antineoplastic doses. Imatinib reversed pulmonary arterial remodeling and right ventricular systolic pressure in PH model rats at a lower dose (approximately one-third of an antineoplastic dose). Low-dose imatinib therapy improved clinical symptoms and echocardiographic outcomes without noticeable adverse effects in dogs with PH. However, resistance to imatinib treatment occurs in PH patients. In cases of this type, imatinib therapy in combination with other agents specific, or with other agents for PH may be required.

Sildenafil is a selective phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor that relaxes vascular smooth muscle cells and lowers pulmonary vascular resistance. It decreases sPA, and improve clinical signs in PH dogs. However, it has also been reported that sildenafil did not significantly or only slightly reduce sPA in PH dogs, even though it improved clinical signs. Therefore, it may be important to further investigate combination therapies of sildenafil and other drugs to ensure that sPA in dogs with PH is reduced adequately. It has been reported that a combination of low-dosage imatinib and sildenafil was effective in treating PH in rats. Additive effects in improvement of PH may be caused by pharmacodynamic and pharmacokinetic drug-drug interactions between imatinib and sildenafil. A combination of low-dosage imatinib and sildenafil may be a better regimen for treating PH in dogs.

Masitinib is a veterinary drug that has been approved to treat canine mast cell tumors. Further, masitinib has a higher affinity for PDGF receptor beta and c-Kit receptors than imatinib, but it lacks activity against cardiotoxic breakpoint cluster region-Abelson kinase. Masitinib has also been reported to be safer than imatinib. Moreover, masitinib elicits stronger cardiopulmonary preventive properties than tadalafil, via dual inhibition of the MAPK pathway and PDE5, and long-term therapy with a lower dose of masitinib reduces PH severity

(和文 2,000 字又は英文 1,200 語程度)

(About 2,000 Japanese characters or 1,200 English words)

and improves survival. Therefore, a lower dose of masitinib could be used in PH therapy to target both cardiopulmonary remodeling and the increased vasoconstriction. However, no published reports on the therapeutic effect of masitinib for PH in dogs are available.

Therefore, this study was conducted to investigate the therapeutic effects of tyrosine kinase inhibitors, imatinib and masitinib for pulmonary hypertension in dogs. The study in chapter 1 aimed to investigate the therapeutic effects of low-dosage imatinib in combination with sildenafil in dogs with PH due to chronic degenerative mitral valve disease (CDMVD) or ventricular septal defect (VSD) with Eisenmenger's syndrome. In chapter 2, the study aimed to investigate the efficacy of low-dose masitinib therapy for canine PH caused by advanced mitral insufficiency and heartworm disease.

In chapter 1, the therapeutic effects of sildenafil combined with imatinib at low dosages on echocardiographic, cardiovascular, hematological and blood biochemical variables and clinical symptoms were evaluated in dogs with PH caused by advanced CDMVD or VSD with Eisenmenger's syndrome. Five client-owned dogs with PH were initially administered low-dose imatinib mesylate (3 mg/kg, orally, q24h). The low-dose imatinib improved the right ventricular (RV) function parameters including estimated sPA and mPAP, and improved clinical symptoms. However, beginning on day 53 to day 168 after imatinib administration, PH and clinical signs returned and worsened. Additionally, sildenafil at a low-dosage (0.5 mg/kg, orally, q12h) was administered in combination with low-dosage imatinib. The combined administration of low-dose imatinib and sildenafil greatly reduced the estimated sPA and mPAP values, improved RV function variables without worsening left ventricular function (LV) at 1 and 3 months with an improvement of clinical symptoms and resulted in longer survival times. This was the first study showing the effectiveness of a low-dose imatinib and sildenafil combination for treating PH dogs. This combination may be effective to prolong the survival of dogs with severe PH.

In chapter 2, the effects of long-term masitinib therapy at low doses on echocardiographic, cardiovascular, hematological and blood biochemical parameters and clinical symptoms were investigated in dogs with PH caused by advanced CDMVD or heartworm disease. Seven client-owned dogs with severe PH were recruited prospectively and given low-dose masitinib orally, 3 mg/kg (approximately one-fourth of the recommended antineoplastic dosage), q24h, for 123 days to 928 days. Examinations were performed prior to masitinib administration, as well as 1, 2, 3, 6, and 12 months later. At 1 month to 12 months, low-dose masitinib significantly reduced the estimated sPA, and dramatically improved clinical symptoms. Low-dose masitinib treatment improved RV function parameters such as right atrium/aorta ratio, maximum tricuspid regurgitation velocity, RV Tei index, and tricuspid annular plane systolic excursion, without worsening LV function parameters. These findings suggested that low-dose masitinib may be effective as an adjunctive therapeutic for chronic heart failure in dogs with PH and may increase the survival of PH dogs.

In conclusion, the present study revealed that the combined administration of low-dose imatinib and sildenafil markedly reduced the estimated sPA and improved RV function and clinical symptoms in dogs with severe PH caused by CDMVD and VSD. In addition, this study revealed that masitinib at low dosage significantly reduced the estimated sPA and improved RV function and clinical symptoms in dogs with severe PH caused by CDMVD and heartworm disease. Although larger, placebo-controlled, randomized, and blinded studies may be needed to determine the long-term efficacy of low-dose imatinib and sildenafil combination or low-dose masitinib in dogs with PH caused by a variety of etiologies, this study provided new information on the effectiveness of tyrosine kinase inhibitors, imatinib and masitinib for treating PH dogs.

(和文 2,000 字又は英文 1,200 語程度)

(About 2,000 Japanese characters or 1,200 English words)

肺高血圧症(PH)は、収縮期肺動脈圧(sPA)が 30mmHg 以上、または平均肺動脈圧(mPAP)が 20mmHg 以上と定義されており、イヌの PH は予後不良である。PH は肺動脈血管収縮と血管のリモデリングが原因である。このリモデリングには、血小板由来成長因子(PDGF)受容体や c-Kit 受容体を含むいくつかの細胞外・細胞内シグナル伝達異常が関与しているとされている。PDGF および c-Kit 受容体を標的とするチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブは、マイトジェン活性化蛋白質リン酸化酵素(MAPK)経路を阻害することにより PH モデルラットの肺血管リモデリングを抑制し、肺血管拡張作用も有する。ヒトの PH に高用量のイマチニブを使用した場合、吐き気、血小板減少、貧血などの副作用があり、様々な結果が出ている。同様の副作用は、抗悪性腫瘍剤を投与されたイヌでも報告されている。低用量のイマチニブ(抗腫瘍薬の約 3 分の 1 量)で、肺動脈リモデリングと PH モデルラットの右心室収縮期血圧を改善させた。低用量イマチニブ療法は、イヌの PH で顕著な副作用なしに臨床症状および心エコー結果を改善した。しかし、PH 患者にはイマチニブ治療に対する耐性が生じる。このような場合、イマチニブ治療と他の薬剤との併用、もしくは PH の他の薬剤との併用が必要な場合がある。

シルデナフィルは、選択的なホスホジエステラーゼ 5 型(PDE5)阻害薬であり、血管平滑筋細胞を弛緩させ、肺血管抵抗を低下させる作用があり、sPA を減少させ、イヌの PH の臨床症状を改善します。しかし、シルデナフィルはイヌの PH において、臨床症状を改善しても、sPA を有意に減少させないか、わずかに減少させるに過ぎないことも報告されている。そのため、PH のイヌの sPA を十分に低下させるために、シルデナフィルと他の薬剤の併用療法をさらに検討することが重要である。ラットの PH に対し、低用量のイマチニブとシルデナフィルの併用が有効であったことが報告されている。PH の改善における相加効果は、イマチニブとシルデナフィルの薬力学的および薬物動態学的な薬物間相互作用によって引き起こされる可能性がある。イヌの PH 治療には、低用量のイマチニブとシルデナフィルの併用がより良い治療法になる可能性がある。

マシチニブは、イヌの肥満細胞腫の治療薬として承認されている動物用医薬品である。さらに、マシチニブはイマチニブよりも PDGF 受容体  $\beta$  および c-Kit 受容体に高い親和性を有するが、心毒性 breakpoint cluster region-Abelson キナーゼに対する活性を欠く。また、マシチニブはイマチニブよりも安全性が高いことが報告されている。さらに、マシチニブは、MAPK 経路と PDE5 の二重阻害を介して、タダラフィルよりも強い心肺機能低下予防効果を発揮し、低用量マシチニブによる長期療法は、PH 重症度を下げ、生存率を向上させる。そのため、PH 治療では心肺リモデリングと血管収縮の亢進の両方をターゲットに、より低用量のマシチニブを使用することができると考えられる。しかし、イヌにおける PH に対するマシチニブの治療効果に関する公表された報告はない。

そこで、本研究ではイヌの肺高血圧症に対するチロシンキナーゼ阻害剤、イマチニブおよびマシチニブの治療効果を検討することを目的とした。第 1 章の研究では、慢性退行性僧帽弁疾患(CDMVD)もしくはアイゼンメンジャー症候群を伴う心室中隔欠損症(VSD)による PH のイヌを対象に、低用量のイマチニブとシルデナフィルの併用による治療効果を検討することを目的とした。第 2 章では、進行した僧帽弁閉鎖不全症とフィラリア症によるイヌの PH に対する低用量マシチニブ療法の有効性を検討することを目的とした。

第 1 章では、進行した CDMVD またはアイゼンメンジャー症候群を伴う VSD による PH のイヌを対象に、シルデナフィルとイマチニブの低用量併用による心エコー、循環器、血液生化学的項目および臨床症状への治療効果を評価した。5 頭の PH 患者に対し、まず低用量イマチニブメシル酸塩(3 mg/kg, po, q24h)を投与した。低用量イマチニブは、推定 sPA や mPAP などの右室(RV)機能パラメータを改善し、臨床症状も改善させた。しかし、イマチニブ投与後 53 日目から 168 日目にかけて、PH と臨床症状が再発・悪化した。さらに、低用量のシルデナフィル(0.5mg/kg、経口、q12h)を低用量イマチニブと併用投与した。低用量イマチニブとシルデナフィルの併用投与により、推定 sPA 値および mPAP 値が大幅に低下し、臨床症状の改善とともに 1 カ月および 3 カ月後の左室機能(LV)を悪化させずに RV 機能変数が改善し、生存期間の延長につながったのです。本試験は、イヌの PH に対する低用量イマチニブとシルデナフィルの併用療法の有効性を示した初めての試験である。この併用療法は、重症の PH 犬の生存期間を延長するために有効であると考えられる。

(和文 2,000 字又は英文 1,200 語程度)

(About 2,000 Japanese characters or 1,200 English words)

第2章では、進行した CDMVD や心原病に起因する PH の犬を対象に、低用量のマシチニブ長期投与が心エコー、循環器、血液生化学項目および臨床症状に及ぼす影響について検討した。重症の PH を有する飼主所有のイヌ7頭を前向きに募り、低用量のマシチニブを 3 mg/kg (抗腫瘍薬の推奨用量の約 4 分の 1)、q24h で 123 日から 928 日間経口投与した。検査はマシチニブ投与前と、その 1、2、3、6、12 ヶ月後に実施した。1 ヶ月から 12 ヶ月後において、低用量マシチニブは推定 sPA を有意に減少させ、臨床症状を劇的に改善させた。低用量マシチニブ投与により、右房/大動脈比、最大三尖弁逆流速度、RV Tei 指数、三尖弁輪面収縮期逸脱などの RV 機能パラメータが改善し、LV 機能パラメータの悪化は認められなかった。これらの結果から、低用量マシチニブは、PH 犬の慢性心不全に対する補助療法として有効であり、PH 犬の生存率を向上させる可能性があることが示唆された。

結論として、本研究は低用量のイマチニブとシルデナフィルの併用投与が、CDMVD と VSD に起因する重症 PH のイヌにおいて、推定 sPA を顕著に低下させ、RV 機能と臨床症状を改善することを明らかにした。さらに、本研究では、CDMVD および心筋梗塞に起因する重症 PH のイヌにおいて、低用量のマシチニブ投与が推定 sPA を有意に低下させ、RV の機能と臨床症状を改善することを明らかにした。様々な病因による PH のイヌにおいて、低用量のイマチニブとシルデナフィルの併用、または低用量のマシチニブの長期的な効果を明らかにするには、より大規模なプラセボ対照無作為化盲検試験が必要だが、本研究はチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブとマシチニブが、イヌの PH の治療に有効であるという新事実を提供するものである。

(和文 2,000 字又は英文 1,200 語程度)

(About 2,000 Japanese characters or 1,200 English words)