

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790534
 研究課題名（和文）コリンエステラーゼ阻害剤（ドネペジル）による新しい心不全治療標的の検討
 研究課題名（英文）New target of chronic heart failure treatment by cholinesterase inhibitor (donepezil)
 研究代表者
 半田 武巳（HANDA TAKEMI）
 高知大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：00437716

研究成果の概要（和文）：

コリンエステラーゼ阻害剤（ドネペジル）による心不全治療の作用機序として 1. PI3K/Akt/HIF/VEGF の細胞生存シグナル経が活性化される、2. 心不全という環境下ではドネペジル経口投与により HIF の誘導が促進され、HIF の誘導に伴う心筋内 ANPmRNA の発現が活性化されナトリウム利尿効果が継続的に出現することが分かった。本研究の結果はドネペジル投与によって誘導される ANPmRNA の活性化が低酸素下での心筋保護作用を発現している可能性を強く示唆していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We reported that the mechanism of cholinesterase inhibitor (donepezil) for chronic heart failure (CHF) treatment. 1. Donepezil activated PI3K/Akt/HIF/VEGF cell survival pathway. 2. Donepezil induced HIF under CHF condition, and HIF activated myocardial ANPmRNA expression which induced natriuretic effects.

This study suggested that ANPmRNA expression induced by donepezil protected myocardium under hypoxic condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、循環器・心不全、心筋梗塞、リモデリング抑制、ANPmRNA 活性化、アセチルコリン

1. 研究開始当初の背景

申請者らの所属するグループでは新たな治療法として迷走神経刺激による心筋保護作用について研究を行っている。心筋梗塞モデル動物を使用した実験では、迷走神経刺激

が心臓のリモデリングの予防と心機能の改善効果を示し、その生命予後を劇的に改善する事を証明している（Circulation, 2004）。この結果より、虚血心筋に対して細胞生存シグナルを指標にした実験が行われ、その結果、

迷走神経刺激により細胞生存シグナルの一つである Akt (protein kinase B) の増強や抗アポトーシス作用を持つ Bcl-2 のリン酸化シグナルが増強されること、心筋梗塞モデルにおいて迷走神経刺激により梗塞領域が減少すること、また、心筋由来の培養細胞系 (HL-1) でアセチルコリン (ACh) の前処理により低酸素条件下での細胞生存率の悪化が劇的に改善される事などが分かり、ACh は低酸素条件下での心筋細胞に対して抗アポトーシス作用を有する事が分かってきた。この結果より、迷走神経刺激を介した ACh による心筋保護作用が生じることが示唆されるが、迷走神経刺激では侵襲的な治療となるため、申請者らのグループは非侵襲的な方法として神経伝達物質である ACh に注目し、Cholinesterase inhibitor (Donepezil) を使用し in vitro, in vivo で ACh を介した心筋保護効果、血管新生作用についても解析を行ってきた。申請者は HL-1 細胞を使用した in vitro の予備実験で ACh 及び Donepezil 投与が ANP 合成を促進するが、BNP 発現には影響を与えていない事を確認し、in vivo 動物実験の過程においても Donepezil により心室心筋細胞内の ANP 合成を促進し、BNP の発現には影響を及ぼさない事を確認しているため、心不全治療の新たなターゲットとして Donepezil を介した心筋細胞内での ANP 合成促進系に着目した。

現在進行している容量負荷心不全マウスモデルでは、Donepezil 投与により構造的、機能的リモデリングが抑制され、心不全マーカーとしては BNP が著明に低下し、生存率の有意な改善も認められている。心筋内での ANP 増加により容量負荷心不全のリモデリングが抑制されていると考えられるため、今回の研究では心筋梗塞心不全マウスモデルを使用して Cholinesterase inhibitor (Donepezil) を介した ACh によるリモデリング抑制、心機能改善効果について検討し、そのメカニズムの一つとしてとして Donepezil による心室心筋細胞内での ANP 発現増強効果の影響を検討していく。

2. 研究の目的

申請者らのグループでは新しい心不全治療ターゲットを検討するために ACh を介した心筋保護効果について研究を行い、コリンエステラーゼ阻害剤 (ドネペジル) を使用した実験を行ってきた。その過程でドネペジルの効果として心筋内 ANP を直接的に合成を促進する可能性を見出し、ANP 合成促進の結果、容量負荷心不全マウスモデルでは心室リモデリングが抑制され生存率も改善されると

いう結果を得ることが出来た。この結果を踏まえて、心筋梗塞心不全マウスモデルに対象を変更してドネペジルの心筋保護作用、リモデリング抑制作用、メカニズムとして ANP の関与について検討を行う。

3. 研究の方法

容量負荷心不全モデルでの心機能解析、左室心筋内での ANP, BNP, pAkt, VEGF 等の発現様式の解析は前述の通りすでに進行しているため、同様の投薬条件で虚血性心不全における構造的、機能的リモデリング抑制作用、ANP 等の発現効果を確認する。過去の容量負荷心不全モデルでの各種実験を文献検索すると、大多数が術直後から内服薬の投与を行っているため、心不全が成立する以前に治療薬を使用するという臨床の現場では考えにくいプロトコールが採用されていた。

今回先行してマウス容量負荷心不全モデルで実験を行っているが、シャント術後 4 週間目にランゲンドルフ還流心装置、形態学的な変化で軽症心不全が進行している事を確認してから Donepezil 投与を行っている。

臨床の現場で使用される条件を想定してプロトコールを作成する為には、心筋梗塞モデルでは急性心筋梗塞モデルに対しての急性実験系と陳旧性心筋梗塞に対しての慢性実験系を分けて考える必要があるため、平成 20 年度の実験は心筋梗塞作成直後より Donepezil 投与を開始する急性心筋梗塞心不全マウスモデルに対する実験プロトコールを作成した。平成 21 年度は陳旧性心筋梗塞心不全マウスモデルに対する実験プロトコールを作成した。

(1) 心筋梗塞心不全マウスでの Donepezil によるリモデリング抑制作用のメカニズムの解析

方法: LAD ligation 心筋梗塞モデルを作成し、無治療での術後 2 週間、4 週間、12 週間での形態学的、機能的な心室リモデリングの変化を解析していく。心機能解析はランゲンドルフ還流心装置を用いて測定する。心筋サンプリングは全例で行い、ANP, BNP, pAkt, VEGF 等の解析を行う。無治療でのコントロールとなるリモデリングの進行を解析した後に、術直後より Donepezil 内服を開始したグループを作成し、無治療と同様のタイムコースで心機能解析等を行っていく。(ラットによる予備実験では内服 2 週間の時点で機能的リモデリング抑制効果が観察されている。)

(2) Donepezil 長期投与による生存率の解析

方法：心筋梗塞モデルでの生存率を Kaplan-Meier 法で解析する。

(3) 陳旧性心筋梗塞に対する Donepezil の効果解析

方法：LAD ligation 心筋梗塞モデルを前年度と同様に作成し、陳旧性心筋梗塞に対しての実験系を確立するために今年度は術後 2 週間後から Donepezil 内服を開始し内服 2 週間、4 週間 で心機能測定等を行っていく。心機能解析はランゲンドルフ還流心装置を用いて測定する。心筋サンプリングは全例で行い、ANP, BNP, pAkt, VEGF 等の解析を行う。生存率は前年度と同様に Kaplan-Meier 法で解析を行う。

4. 研究成果

容量負荷心不全モデルをベースとして、Donepezil 投与による心筋リモデリングの作用機序の解明が進んでいる。Donepezil の作用機序として PI3K/Akt/HIF/VEGF の細胞生存シグナル経路が活性化され、さらに心不全という環境下では Donepezil 投与により HIF の誘導が促進され、HIF の誘導に伴う心筋内 ANP mRNA の発現が活性化されナトリウム利尿効果が継続的に出現することが分かった。

心筋梗塞モデルにおいても治療 4 週間の観察期間で PI3K/Akt/HIF/VEGF の細胞生存シグナル経路が活性化される事を確認したが、心筋梗塞モデルにおいては容量負荷モデルと比較して心不全進行の時間経過が異なり、ANP mRNA の活性化に伴うナトリウム利尿作用による心筋リモデリングの抑制効果及び心筋保護効果は容量負荷モデルと比較して出現しにくい事が予想された。しかし、ランゲンドルフ還流心による心機能測定では無治療群と治療群での左室機能は長期的には有意差が認められるため、Donepezil 投与によって誘導される ANP mRNA の活性化は低酸素下での心筋保護作用が強く発現されている可能性が考えられた。また、心筋梗塞モデルでは投与容量を減少した群においてもリモデリング抑制作用が観察されている。

Donepezil 投与により細胞生存シグナル経路の活性化及び ANP mRNA 発現の活性化は両モデルで共通しているため、実験系としては心筋梗塞モデルでの治療開始時期の再検討を予定している。

心筋梗塞マウスモデルでのランゲンドルフ還流心装置による心機能測定方法はほぼ確立され、再現性を持った測定が可能となった。

急性実験系では心筋梗塞モデルにおいて治療 4 週間の観察期間で PI3K/Akt/HIF/VEGF の細胞生存シグナル経路が活性化される事を確認し、心筋梗塞モデルマウスでのランゲンドルフ還流心による心機能測定では無治療群と治療群での左室機能は長期的には有意差が認められ、心筋梗塞モデルでは投与容量を減少した群においてもリモデリング抑制作用が観察されている。

慢性実験系では一定レベル以上の心筋梗塞領域リモデリングがすでに進行しているため、形態学的には梗塞領域の被薄化が進行しているが、急性期実験系と同様に PI3K/Akt/HIF/VEGF の細胞生存シグナル経路が活性化され、ランゲンドルフ還流心による心機能測定では無治療群と治療群での左室機能は長期的には有意差が認められた。

この結果から、心筋梗塞境界領域に対して何らかの心筋保護作用が発現される可能性が考えられた。Donepezil 投与による ANP mRNA 活性化は今回の実験系のタイムコースでは統計学的有意差は検出できなかったが、ANP mRNA 活性化傾向は認められており、心筋サンプリングのタイミングを再検討する必要性が認められた。しかし、前年度の結果と本年度の結果は Donepezil 投与によって誘導される ANP mRNA の活性化が低酸素下での心筋保護作用を発現している可能性を強く示唆していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG, Sato T. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有、2010、印刷中
- ② Handa T, Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Ando M, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T. Anti-Alzheimer's Drug, Donepezil, markedly improves long-term survival after chronic heart failure in mice. *J Card Fail*、査読有、15 巻、2009、805-811.
- ③ Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thorac Cardiovasc Surg*、査読有、137 巻、2009、223-231.
- ④ 半田武巳, カタレ, ラジェシュ G, 柿沼由彦, 有川幹彦, 安藤元紀, 山崎文靖, 佐藤隆幸, 笹栗志朗. Donepezil を利用した容量負荷心不全マウスにおける心機能改善効果、生存

率改善効果の検討. 心臓、査読有、41 巻、
2009、115-123.

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Kakinuma Y. Effects of a non-neuronal acetylcholine synthesis system equipped for cardiomyocytes, as a molecular brake, on overshooting cardiac energy metabolism. 第 74 回日本循環器病学会総会・学術集会、2010 年 3 月 6 日、京都府 国立京都国際会館.
- ② Handa T. Donepezil: An acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, prevents remodeling and improves survival in volume overload heart failure mice. American college of cardiology 58th Annual Scientific Session, 2009 年 3 月 29 日、Orland, USA
- ③ 半田武巳. Donepezil: an Acetylcholinesterase Inhibitor Against Alzheimer's Dementia, Prevents Remodeling in Volume-Overload Heart Failure Mice: Local and Central effect of Donepezil. 第 73 回日本循環器病学会総会・学術集会、2009 年 3 月 21 日、大阪市 大阪国際会議場.
- ④ Kakinuma Y. Cardiomyocytes produces acetylcholine in response to muscarinic receptor stimulation: A possible mechanism for amplification of cardioprotective effects of cardiac vagal nerve. American Heart Association Scientific sessions 2008、2008 年 11 月 12 日、New Orleans, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半田 武巳 (HANDA TAKEMI)
高知大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：00437716

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし