

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460344

研究課題名(和文) スフィンゴシン1-リン酸受容体修飾薬による房室伝導ブロックの発生機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of onset mechanisms of a sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod-induced atrioventricular conduction block

研究代表者

杉山 篤 (SUGIYAMA, Atsushi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：60242632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1-リン酸受容体修飾薬による房室伝導ブロックの発生機序を検討するため、八口セン麻酔モルモットモデルを作成し、スフィンゴシン1-リン酸受容体修飾薬であるフィンゴリモドを静脈内投与したところ、再現性をもって完全房室ブロックが誘発された。その機序を解明するために房室結節の膜標本を作製し、酵素的蛍光法を用いて薬理学的分析を行った。フィンゴリモドはアデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に抑制した。スフィンゴシン1-リン酸受容体修飾薬は房室結節のS1P1受容体を介してGiタンパクを活性化することが示された。

研究成果の概要(英文)：Since a sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod induced complete atrioventricular conduction block, onset mechanisms of fingolimod-induced atrioventricular conduction block were analyzed. Fingolimod suppressed adenylate cyclase activity of the membrane preparation made of atrioventricular nodal tissue of guinea-pig hearts, suggesting that fingolimod may stimulate Gi protein in the atrioventricular node. Thus, S1P receptor subtype 1 in the atrioventricular node could be one of the candidates for fingolimod-induced atrioventricular conduction block.

研究分野：循環薬理学

キーワード：スフィンゴシン1-リン酸 フィンゴリモド 房室伝導ブロック Giタンパク

1. 研究開始当初の背景

Fingolimod (商品名: イムセラ(田辺三菱) ジレニア(ノバルティス); 適応疾患: 多発性硬化症; 2011年11月薬価収載) はスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体を標的とする免疫調節薬である。2012年5月に開催された 3rd DIA Cardiac Safety Workshop (東京) での Strnadova 博士 (Health Canada, Canada) の報告によれば、fingolimod (1.25 mg/day, n=366) の Phase 3 ヒト臨床試験でのホルター心電図における房室ブロックの発生頻度は、2度 (モビッツ 1 型および 2 型) 6.6%、2:1 ブロック: 3.4%、完全房室ブロック 0.3% であった。マウス、ラット、イヌ、サルなどの実験動物を用いた非臨床安全性評価において fingolimod が房室ブロックを誘発したという報告はなく、房室ブロックの発生はヒトに投与して初めて発見された有害作用であった。会議では、fingolimod による完全房室ブロックの発生頻度は稀であっても突然死の可能性があり解決すべき喫緊の課題であること、そのためには感度の高い薬物性房室ブロック発生予測モデルの開発が必要であることの 2 点が専門家の間で確認された。現在、fingolimod と同様に S1P 受容体を標的とする免疫調節薬の開発が国内外で盛んに進められているので、上記ニーズを満たすモデル開発を早急に行う必要があった。

2. 研究の目的

S1P 受容体修飾薬による房室ブロックの発生が S1P 受容体を標的とする免疫調節薬の開発を進める際の課題になっている。この現象は、従来の非臨床試験では予測できず、ヒトに投与して初めて発見された有害作用である。我々は予備検討においてハロセン吸入麻酔下のモルモット心が S1P 受容体修飾薬で誘発される房室ブロックを効率よく再現できることを見出した。今回の研究では、S1P 受容体修飾薬によるモルモットの房室伝導の抑制機序を薬理的、電気生理学および分子生化学的手法を用いて検討することによりヒトにおける房室ブロックの発生機序を推定した。今回の研究は S1P が関与する房室ブロックの病態生理学の解明に加え、S1P 受容体関連候補化合物の開発促進への寄与も期待できる。

3. 研究の方法

平成 25 年度は電気生理学的解析のためのハロセン麻酔モルモットモデルを作成し、fingolimod の房室伝導抑制機序を、薬理学的分析手段を用いて解析した。クリーンモルモット (Std: Hartley、日本エスエルシー株式会社) の腹腔内に thiopental (50 mg/kg) を投与して麻酔を導入し、人工呼吸器 (シナノ製作所) を用いて halothane を吸入 (1-2%) することで麻酔を維持した。血圧測定と薬液投与用のカテーテルを動静脈に挿入した。心

電図測定用の電極を四肢に装着した。右房内に刺激用電極カテーテルを留置し、洞調律および固定心拍数 (200-300 beats/min) における心電図を測定した。以上の測定項目はポリグラフシステム (日本光電、RM-6000) を用い、サーマルアレイレコーダー (日本光電) に波形を記録した。電気生理学的解析として洞調律拍動に加えて心房をプログラム電気刺激することにより fingolimod の房室伝導に対する作用をより詳細に評価した。

平成 26 年度～平成 27 年度は、モルモット心の房室結節を、組織化学的手法を用いて生理活性を保持したまま単離し、分子生化学的分析を行った。モルモット心の房室結節やヒス束などの心筋各組織を、組織化学的手法を用いて生理活性を保持したまま単離し、保存した。すなわち、クリーンモルモット (Std: Hartley、日本エスエルシー株式会社) をペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) で全身麻酔し、心臓を摘出した。ただちに摘出心をドライアイスで -80 度に保った chlorodifluoromethane 内で瞬間凍結した。厚さ 20 ミクロンの薄層切片を作製し、刺激伝導系を同定するために 10 枚おきに 1 枚に対し acetylcholinesterase 染色を行なった。残りの 9 枚は真空凍結乾燥した。平成 26 年度と平成 27 年度で合計 10 コの心臓に対して以上の作業を実施した。染色標本を指標に房室結節部分を実体顕微鏡下で切り出し、膜標本を作製し、酵素的蛍光法を用いて薬理学的分析を行った。

4. 研究成果

平成 25 年度: Fingolimod の房室伝導に対する用量反応性を検討したところ、予備検討の結果と同様に、洞調律拍動下において fingolimod (0.1 mg/kg, i.v.) で房室ブロックが観察された。次に、G_i タンパク阻害薬 (pertussis toxin; PTX, 10 μg/kg, i.v.) を用いて fingolimod による房室伝導の抑制機序を解析した。PTX は fingolimod による房室ブロックの発生に影響を示さなかった。Fingolimod による房室ブロックの発生は G_i タンパクを介さないのか、あるいは今回用いた PTX の用量では G_i タンパクを十分抑制できなかったのか、この点に関しては更なる検討が必要と考えられたため、以下の in vitro 実験を翌年度以降に実施した。

平成 26 年度～平成 27 年度: イソプロテレンールおよび NaF はアデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に刺激したが、カルバコールおよびフィンゴリモドはアデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に抑制した。スフィンゴシン 1-リン酸受容体修飾薬は房室結節の S1P1 受容体を介して G_i タンパクを活性化し、そのサブユニットがアデニル酸シクラーゼ活性を抑制することが示された。また、洞房結節と同様に、活性化したサブユニットが房室結節細胞の IKACH チャネルを開口させる可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

- 1 Cao X, Nakamura Y, Wada T, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Zhu B, Xu B, Takahara A, Saitoh M, Sugiyama A. Comparison of anti-anginal effect of cilnidipine with those of nicardipine and nifedipine in the vasopressin-induced angina model of rats. *Heart Vessels* (in press) DOI 10.1007/s00380-016-0848-4 (査読有)
- 2 Izumi-Nakaseko H, Nakamura Y, Cao X, Wada T, Ando K, Sugiyama A. Possibility as an anti-cancer drug of astemizole: evaluation of arrhythmogenicity by the chronic atrioventricular block canine model. *J Pharmacol Sci* DOI: 10.1016/j.jphs.(in press) (査読有)
- 3 Cao X, Nakamura Y, Wada T, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Sugiyama A. Electropharmacological effects of amantadine on cardiovascular system assessed with $J-T_{peak}$ and $T_{peak}-T_{end}$ analysis in the halothane-anesthetized beagle dogs. *J Toxicol Sci* 41 2016;41:439-447 https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/41/3/41_439/_pdf (査読有)
- 4 Nakamura Y, Sasaki R, Cao X, Wada T, Hamaguchi S, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Tanaka H, Takahara A, Sugiyama A. Intravenous anti-influenza drug oseltamivir will not induce torsade de pointes: Evidence from proarrhythmia model and action-potential assay. *J Pharm Sci* DOI 10.1016/j.jphs.(in press) (査読有)
- 5 Cao X, Nakamura Y, Aoki T, Wada T, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Sakata R, Sugiyama A. Coronary artery vasospasms in a *microminipig* occurred after placing an ameroid constrictor. *J Vet Med Sci*. 2016;78:1213-1216 DOI: 10.1292/jvms.16-0005 (査読有)
- 6 Matsukura S, Nakamura Y, Cao X, Wada T, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Sugiyama A. Anti-atrial fibrillatory versus proarrhythmic potentials of amiodarone: a new protocol for safety evaluation in vivo. *Cardiovasc Toxicol* 2016 (in press) DOI 10.1007/s12012-016-9369-8 (査読有)
- 7 Honda A, Nakamura Y, Ohara H, Cao X, Nomura H, Katagi J, Wada T, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Sugiyama A. Effects of a prostaglandin EP4-receptor agonist ONO-AE1-329 on the left ventricular pressure-volume relationship in the halothane-anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 2016;775:130-137 DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.02.029 (査読有)
- 8 Fukuda S, Nakamura Y, Egi K, Fujioka S, Nagasaka S, Minh PN, Toguchi K, Wada T, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Mizoue T, Takazawa K, Hosaka S, Sugiyama A. Comparison of direct effects of clinically available vasodilators; nitroglycerin, nifedipine, cilnidipine and diltiazem, on human skeletonized internal mammary harvested with ultrasonic scalpel. *Heart Vessels* 2016 (in press) DOI 10.1007/s00380-016-0797-y (査読有)
- 9 Matsukura S, Nakamura Y, Ohara H, Cao X, Wada T, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Akasaka Y, Sugiyama A. Feasible induction of coronary artery vasospasm occurred during cardiac catheterization in a *microminipig*. *J Vet Med Sci*. 2016;78:873-876 DOI: 10.1292/jvms.15-0426 (査読有)
- 10 Wada T, Nakamura Y, Cao X, Ohara H, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Nakazato Y, Sugiyama A. Antiviral drug vidarabine possessing cardiac type 5 adenylyl cyclase inhibitory property did not affect cardiohemodynamic or electrophysiological variables in the halothane-anesthetized dogs. *J Toxicol Sci*. 2016;41:115-122. DOI: 10.2131/jts.41.115 (査読有)
- 11 Katagi J, Nakamura Y, Cao X, Ohara H, Honda A, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Sugiyama A. Why can *d*-sotalol prolong the QT Interval in vivo despite its weak inhibitory effect on hERG K^+ channels in vitro? : electrophysiological and pharmacokinetic analysis with the halothane-anesthetized guinea-pig model. *Cardiovasc Toxicol*. 2016;16:138-146. DOI:10.1007/s12012-015-9322-2 (査読有)
- 12 Nomura H, Nakamura Y, Cao X, Honda A, Katagi J, Ohara H, Izumi-Nakaseko H, Satoh Y, Ando K, Sugiyama A. Cardiohemodynamic and electrophysiological effects of a selective EP4 receptor agonist ONO-AE1-329 in the halothane-anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol*. 2015;761:217-225. (査読有) DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.06.012
- 13 Yamazaki-Hashimoto Y, Nakamura Y, Ohara H, Cao X, Kitahara K, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Yamazaki H, Ikeda T, Yamazaki J, Sugiyama A. Fluvoxamine by itself has potential to directly induce long QT syndrome at supra-therapeutic concentrations. *J Toxicol Sci*. 2015;40:33-42. DOI:10.2131/jts.40.33

(査読有)

- 14 Watanabe Y, Nakamura Y, Cao X, Ohara H, Yamazaki Y, Murayama N, Sugiyama Y, Izumi-Nakaseko H, Ando K, Yamazaki H, Sugiyama A. Intravenous administration of apomorphine does not induce long QT syndrome: experimental evidence from in vivo canine models. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2015;116:468-475. DOI:10.1111/bcpt.12343 (査読有)
- 15 Yagi Y, Nakamura Y, Kitahara K, Harada T, Kato K, Ninomiya T, Cao X, Ohara H, Izumi-Nakaseko H, Suzuki K, Ando K, Sugiyama A. Analysis of onset mechanisms of a sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod-induced atrioventricular conduction block and QT-interval prolongation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;16:39-47 <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.09.006> (査読有)
- 16 Izumi-Nakaseko H, Nakamura Y, Cao X, Ohara H, Yamazaki Y, Ueda N, Ando K, Sugiyama A. Effects of selective I_{Kr} channel blockade by E-4031 on ventricular electro-mechanical relationship in the halothane-anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 2014;740:263-270 (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.064>
- 17 Takahara A, Suzuki S, Hagiwara M, Nozaki S, Sugiyama A. Electrophysiological effects of an anti-influenza drug oseltamivir on the guinea-pig atrium: comparison with those of pilsicainide. *Biol Pharm Bull.* 2013;36:1650-1652. DOI:10.1248/bpb.b13-00347 (査読有)

[学会発表](計14件)

- 1 Sugiyama A: Current situation and future plan in Japanese activity of Kirishima Meeting. Safety Pharmacology Society, 15th annual meeting, プラハ、チェコ共和国, 2015/10/01
- 2 杉山 篤: 薬物性不整脈-最近の話題-. 第51回日本小児循環器学会総会・学術集会, ホテル日航東京, 港区, 東京都, 2015/07/18
- 3 Sugiyama A: The current trends and issues on integrated cardiac safety. The 5th DIA cardiac safety workshop in Japan, KFC ホール両国, 墨田区, 東京都, 2014/10/23
- 4 Sugiyama A: Overview and raising issues. The 5th DIA cardiac safety workshop in Japan, KFC ホール両国, 墨田区, 東京都, 2014/10/23
- 5 灘みづき, 相本恵美, 八木啓太, 江沢亜耶, 杉山 篤, 高原 章: オセルタミビル

は高頻度刺激により誘発された心房細動を抑制する: ラット動静脈瘻心拡大モデルを用いた検討. 第87回日本薬理学会年会, 仙台国際センター, 仙台市, 宮城県, 2014/03/20

- 6 中瀬古(泉)寛子, 中村裕二, 曹 新, 上田直也, 小原 浩, 山崎有希子, 安東賢太郎, 杉山 篤: E-4031の電気生理学的特徴および催不整脈作用の評価: ハロセン麻酔および慢性房室ブロック犬モデルでの検討. 第87回日本薬理学会年会, 仙台国際センター, 仙台市, 宮城県, 2014/03/20
- 7 曹 新, 中村裕二, 小原 浩, 山崎有希子, 中瀬古寛子, 安東賢太郎, 杉山 篤: アマンタジンの電気薬理学的作用: ハロセン麻酔犬モデルでの評価. 第87回日本薬理学会年会, 仙台国際センター, 仙台市, 宮城県, 2014/03/20
- 8 小原 浩, 中村裕二, 曹 新, 横山浩史, 中瀬古寛子, 安東賢太郎, 村越伸行, 佐藤明, 青沼和隆, 高原章, 池田隆徳, 杉山 篤: 腎交感神経除去術の慢性房室ブロック犬の心血管系に対する作用: シルニジピンおよびアミオダロンとの比較. 第87回日本薬理学会年会, 仙台国際センター, 仙台市, 宮城県, 2014/03/20
- 9 中瀬古(泉)寛子, 中村裕二, 曹 新, 小原 浩, 山崎有希子, 上田直也, 安東賢太郎, 杉山 篤: Effects of selective I_{Kr} channel blockade by E-4031 on ventricular electro-mechanical relationship in the halothane-anesthetized dogs. 第5回安全性薬理研究会学術年会, 東京大学, 文京区, 東京都, 2014/02/15
- 10 杉山 篤: 不整脈心電図の読み方. 第5回安全性薬理研究会学術年会, 東京大学, 文京区, 東京都, 2014/02/15
- 11 中村裕二, 松尾純子, 宮本憲優, 小島敦子, 安東賢太郎, 諫田泰成, 澤田光平, 杉山 篤, 関野祐子: Assessment of testing methods of the drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS-derived cardiomyocyte sheet: multi-site validation study. 第5回日本安全性薬理研究会学術年会, 東京大学, 文京区, 東京都, 2014/02/14
- 12 小原 浩, 中村裕二, 安東賢太郎, 渡辺雄大, 曹 新, 山崎有希子, 池田隆徳, 杉山 篤: Azithromycinの血行動態および電気生理学的作用: ハロセン麻酔犬モデルでの評価. 第30回日本心電学会学術集会, リンクステーションホール青森, 青森市, 青森県, 2013/10/11
- 13 小原 浩, 中村裕二, 本川佳幸, 山崎有希子, 曹 新, 安東賢太郎, 池田隆徳, 杉山 篤: Aminodaroneおよびdronedaroneの心房・心室有効不応期に対する作用: bepridilおよびdl-sotalolとの比較. 第18回アミオダロン研究会, 経団連ホール,

千代田区, 東京都, 2013/09/28

- 14 萩原美帆子, 鈴木早苗, 野崎修平, 杉山 篤, 高原 章: 心房に対するオセルタミビルの電気生理学的作用: モルモット単離心房標本による検討. 第 128 回日本薬理学会関東部会, 早稲田大学国際会議場, 新宿区, 東京都, 2013/07/14

〔図書〕(計 2 件)

- 1 杉山 篤, 中村裕二: 薬物の心臓・循環器系に対する評価 2 .薬物性心機能毒性の評価. 動物の心電図・心エコー・血圧・病理学検査 増補改訂版 229-239. アドスリー, 東京, 2013
- 2 橋本敬太郎, 杉山 篤: 肺の薬理学. グッドマン・ギルマン 薬理書 -薬物治療の基礎と臨床-1321-1366. 廣川書店, 東京, 2013

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 房室ブロックモデル用ブタ、房室ブロックモデル用サル、房室ブロックモデル用モルモット、及びその利用
発明者: 杉山 篤
権利者: 学校法人東邦大学
種類: 特願
番号: 14/021,657
出願年月日: 2013 年 9 月 9 日
国内外の別: 米国

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://gyoseki.toho-u.ac.jp/thuhp/KgApp?kozac=22002900&year=2015>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 篤 (SUGIYAMA, Atsushi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号: 6 0 2 4 2 6 3 2