

平成21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19390220  
 研究課題名（和文）アデノシンによる心不全診断・治療におけるトランスレーショナル研究  
 研究課題名（英文）Translational research of adenosine aiming for diagnosis and treatment of heart failure.

研究代表者  
 北風 政史（MASAFUMI KITAKAZE）  
 国立循環器病センター・臨床研究開発部・部長  
 研究者番号：20294069

研究成果の概要：心不全・心臓虚血障害の形成に至る過程に深く関与する生体物質アデノシンに着目し、その病態における役割・治療への応用を検討した。結果、アデノシンが複数あるアデノシン受容体を介して、別個に心不全の病態改善に関与することが明らかになった。さらにアデノシンの心保護作用を臨床応用すべく、心不全患者でのアデノシンおよびその合成酵素量の測定を行い不全心筋での発現上昇を確認し、心臓からのアデノシン産生の重要性を明らかにした。さらにリポゾーム化アデノシンによる心筋虚血障害改善作用を示し、アデノシン産生増強剤とあわせてアデノシンの心不全治療にむけた臨床応用への基盤を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：循環器内科

科研費の分科・細目：心臓病態学

キーワード：アデノシン・心不全診断・心不全治療・トランスレーショナル研究・臨床試験

## 1. 研究開始当初の背景

疫学的（臨床医学的）背景：心臓は生命機能を維持するのに必要不可欠な臓器であり、心血管疾患は生命に直接脅かすことから、その克服は特に重要である。慢性心不全は、かかる心血管疾患の共通した病態として知られており、心ポンプ機能低下を基礎病態とする。その原因は多岐にわたり、冠動脈硬化に起因する虚血性心疾患を始め、力学的（高血圧・弁膜症）、遺伝学的（心筋症）、免疫学的（心筋炎）破綻に代表される非虚血性心

疾患など、その罹患者数は現在既に25万人を超え、2010年には30万人に増加するものと推定されている。現在、本邦において慢性心不全は死亡原因第2位を占めており、米国では、約500万人が慢性心不全に罹患しており、その5年生存率は50%であることから、今後本格的な高齢化社会を迎える本邦において慢性心不全の克服は、医学・医療のみならず社会的観点からも非常に重要な課題であるものと認識されている。1990年代以降、心不全予後の改善に大きく寄与する新たな治療

法の開発が待たれ (McMurray J. et al. *Lancet*. 2005, Jessup M. et al. *N Engl J Med*. 2003) しており、その実現に向けて国際的に注目が集まっている。

分子生物学的 (基礎医学的) 背景: アデノシンは、交感神経・神経体液因子の改善作用を持つだけでなく、より幅広くサイトカイン、フリーラジカル、エンドセリン作用を抑制しNO合成を促進する作用を併せ持つ (Ely S, *Circulation*. 1992, Khakh B. *Nature*. 2006) ことが本研究代表者らを含めて、これまでに行われた研究により広く認められるようになった。特に近年、アデノシンの虚血心筋保護作用がプレコンディショニング現象に密接に関与することが国内外を通じて注目を集めている。アデノシンは、冠血流量低下、心筋Ca<sup>2+</sup>過負荷、微小循環障害、好中球・血小板活性化、カテコラミン遊出などの多岐にわたる心筋障害因子を全て抑制しうる。さらにアデノシンはレニン-アンジオテンシンII産生、サイトカイン産生、βアドレナリン受容体刺激など慢性心不全増悪因子を抑制することから、アデノシンが単に虚血心筋保護効果にとどまらず、虚血性・非虚血性に限らず慢性心不全の全般の、多岐にわたる病原因子を抑制し、病態を改善することが期待される。また、アデノシンはVEGF、NO合成酵素を誘導し、逆にエンドセリン合成酵素を抑制するため、心臓・冠血管リモデリングに対しても良好な効果を及ぼすことが考えられる。さらにアデノシンはLDL酸化抑制、インスリン抵抗性改善、肥満細胞活性抑制、リンパ球細胞活性抑制を惹起するため、動脈硬化自体をも抑制しうる。このようにアデノシンの役割は極めて多岐にわたり、各作用が全て心血管保護効果をもたらすことが報告されている。

以上の背景を有する中で、現在に至るまで、このアデノシンの作用の多岐性に注目して基礎医学から臨床に至るまで系統立てて慢性心不全治療薬の開発を意図して検討がなされた研究はなく、本研究は新規性に富みかつ実現性の高いもの

として評価される。心不全形成にいたる過程の中で、新たに解明された分子機序に介入できる標的分子としてアデノシンに着目し、心不全予後を改善する breakthrough となるべき診断・治療法の開発を行うことができる可能性について検討すべく、アデノシンおよびその関連分子に関する心不全の診断・治療への応用へ向けた研究計画を立てるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究においては慢性心不全の臨床病態における心筋細胞・心臓組織に対するアデノシンの保護作用について、これまで本研究者らが明らかにしてきた基礎的検討結果を礎とし、その発展的研究を行う。アデノシンはその心不全治療への応用が今後大きく期待されている薬剤の一つであり、特にアデノシン受容体刺激は、強力な心血管保護効果を有することから大きく注目されているが、更に近年免疫・サイトカイン系の抑制作用など新たな役割を担うことが明らかになり、その臨床応用による幅広い治療効果が期待されている。

アデノシン受容体活性化が慢性心不全の病態において果たす新たな役割・分子機序を明らかにし、従来の心不全治療薬に付加的価値を有する新規治療法としての可能性について検討する。これまでに、本研究者が積み重ねてきたアデノシンに関する基礎・臨床の研究成果を踏まえて、

(1) アデノシン及びその受容体遺伝子の発現を *in vitro*, *in vivo* で修飾し細胞レベル、個体レベルでの機能解析を行うこと

(2) 実際の臨床応用を見据えてアデノシン、その誘導体及び、アデノシン受容体作動薬・阻害薬を用いた検討により細胞レベルから大動物に至るまで、系統立ててその有効性を確認することの2点を中心に、慢性心不全治療薬として本格的な臨床応用に向けて必要とされる科学的根拠を確立することを目的とした検討を行う。

さらに、実際ヒト慢性心不全治療への応用を見据

えて、

(3)既に構築したヒト慢性心不全診療施設の協力、蓄積データおよびサンプルを活用してアデノシン関連遺伝子群のSNP解析、遺伝子発現変化プロファイルを作成して慢性心不全の診断・治療に関わる情報を解析することによりアデノシン及びその関連遺伝子の診断的・治療的価値を明確にすることを目的とした検討も行う。上記基礎的・臨床的検討のもとに、アデノシンおよび関連遺伝子・蛋白の心不全における役割を明らかにし、アデノシンの有効性を検討するための臨床前向き介入試験の実施を行い、実際の臨床における診断・治療への応用のおよびその普及・治療法の確立に向けての最終ステップとしてアデノシンの有効性を検討するための薬剤介入大規模臨床試験を実施する素地を確立することを目標とした。慢性心不全治療薬としてアデノシンの有用性が実証出来れば、我が国から世界へ先駆けて新しい心不全の診断・治療オプションを提示することが出来るものとする。

### 3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変動物を用いたアデノシン受容体機能解析

アデノシン受容体の遺伝子過剰発現および遺伝子欠損マウスを作成し、圧負荷および心筋梗塞による心不全において、アデノシン受容体を介した作用がいかなるものかを検討する。さらに Adenosine A1 receptor および Adenosine A2a receptor ノックアウトマウスを用いて圧負荷による非虚血性心不全もしくは心筋梗塞による虚血性心不全を作成し、心行動態 (LV pressure, dP/dt など)、心エコーによる心機能解析、組織学的検討、を行う。これらの検討により、如何なるアデノシン受容体調節が心機能の改善に必要であるかを検討する。

(2) 心不全動物モデルにおけるアデノシ

ン受容体活性化に伴う心機能解析

ラット心筋梗塞モデルを用いて、アデノシン受容体活性化もしくは抑制による心不全病態に及ぼす影響を検討する。使用可能な薬剤である 1. アデノシン前駆物質 (AP4A、ATP)、2. アデノシン誘導体 (2-Cl-adenosine)、3. アデノシン受容体刺激剤 (CPA、YT146、CGS21680、NECA、IB-MECA)、4. アデノシン再吸収抑制剤 (dipyridamole、dilatep)、5. アデノシン産生酵素 ecto-5' -ヌクレオチダーゼ賦活剤 (vesnarinone) を投与して検討する。更にこれらの作用が ecto-5' -ヌクレオチダーゼ阻害剤、中和抗体、アデノシン受容体遮断薬 (DPCPX、8SPT) にて消失するか検討する。

さらにイヌ心筋虚血再還流モデルを用いてリポゾームに封入し全身への影響を抑え心筋への集積特異性をあげたアデノシンによる心筋保護効果を検討する。

(3) ヒト心筋及び血液を用いたアデノシン関連遺伝子発現レベルおよび遺伝子多型の検討

拡張型心筋症、虚血性心筋症、肥大型心筋症、弁膜性心不全の患者にインフォームドコンセントを行った上、ヒト心筋組織サンプルおよび血液サンプルを収集する。

ヒト心筋はバイオプシーまたは手術時に摘出する。得られた心筋および血液から RNA を抽出し、血液からは genome DNA を抽出する。心筋および血液中のアデノシン関連遺伝子の発現レベルを定量 PCR にて検討する。アデノシン関連遺伝子発現レベルと臨床データの間に相関が認められるかを検討する。また、移植症例においては、VAS を挿入する際に得られる心筋と移植時に得られる心筋を比較することにより、アデノシン関連遺伝子発現レベルの変化を検討する。

アデノシン関連遺伝子の中から心不全感受

性候補遺伝子を選択し、遺伝子多型解析を行う。

(4) ヒト血中でのアデノシン濃度および心筋組織でのアデノシン合成酵素の濃度測定

心不全の重症度と血中のアデノシン濃度を相関させヒト心不全での役割を明らかにする。さらに冠静脈からのアデノシン濃度の測定及び心筋におけるアデノシン産生酵素の濃度を測定を行い、心不全組織そのものからのアデノシン産生の臨床的意義を検討する。

(5) アデノシン再吸収抑制剤を用いた心不全治療の開発

ジピリダモール投与による慢性心不全患者についてプローブ法を用いた大規模臨床介入試験を開始するための準備を行う。

本臨床試験は文章によるインフォームドコンセントを取得できた NYHA 分類 III 度、心臓超音波検査上 EF40%以下、3ヶ月以上の病状が安定して処方変更の無い慢性心不全症例（対象年齢：20歳以上、同種薬剤以外の処方や原疾患不問、重篤な臓器障害（心原性も含む）や服薬履歴不良の症例は除外）に対して、従前処方に加えジピリダモール 75mg/日処方群及び、従前処方による経過観察群に分けて 12ヶ月間投与を行いフォローアップする。前後での諸検査成績や自覚症状、運動耐容能、心不全予後を比較検討する。一次エンドポイントは心血管イベントの発症、心不全悪化による入院とする。目標エントリー患者数は 200 症例とする。

#### 4. 研究成果

(1) 遺伝子改変動物を用いたアデノシン受容体機能解析

A1 receptor および Adenosine A2a receptor ノックアウトマウスを用いて圧負荷による非虚血性心不全もしくは心筋梗塞

による虚血性心不全を作成し、心行動態 (LV pressure, dP/dt など)、心エコーによる心機能解析、組織学的検討を行った。結果、アデノシン A1 受容体刺激は心肥大抑制効果があること、A2a 受容体は EGF 受容体リン酸化を介して心肥大促進効果があること、A2b 受容体は線維化抑制、不全心筋左室リモデリング抑制を持ち心行動態を改善することが明らかとなった。

(2) 心不全動物モデルにおけるアデノシン受容体活性化に伴う心機能解析

さらに、ラット心筋梗塞モデルを用いた実験においては、長期間の A2B 受容体刺激は心筋梗塞後の繊維化を抑制し心機能を改善するが明らかとなった (図 1)

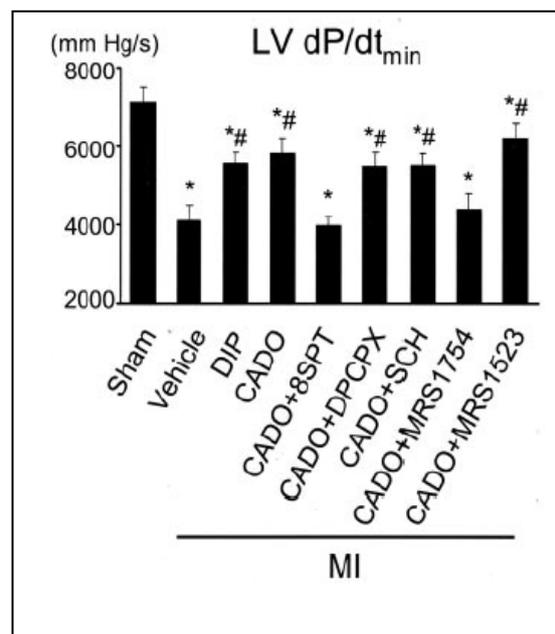


図 1、不全改善効果は A2B 阻害剤 MRS1754 により特異的に阻害された。

これらのことより、アデノシンは異なる受容体を介して心筋に作用を及ぼすことが明らかとなり、特異的な阻害剤や促進剤による治療応用に際しての重要性が示唆された。

さらにイヌ心筋虚血再還流モデルを用いてリポゾームに封入し全身への影響を抑え

心筋への集積特異性をあげたアデノシンによる心筋保護効果を検討したところ、これまでの報告どおりアデノシンの心不全改善効果が観察されたと共にリポゾーム化されていないアデノシンを投与したときより血圧の低下等の副反応が出現しにくかった。この事実はリポゾーム封入がアデノシンの生体内投与に適していることを示唆し、今後の臨床応用が期待される (Takahama H et al *J Am Coll Cardiol* 2009)。

(3) ヒト心筋及び血液を用いたアデノシン関連遺伝子発現レベルおよび遺伝子多型の検討

拡張型心筋症、虚血性心筋症、肥大型心筋症、弁膜性心不全の患者にインフォームドコンセントを行った上、ヒト心筋組織サンプルおよび血液サンプルを収集する。

ヒト心筋はバイオプシーまたは手術時に摘出する。得られた心筋および血液から RNA を抽出し、血液からは genome DNA を抽出した。これらの解析によりアデノシン受容体刺激に関わる遺伝子発現変化を検討し、A2a、A2b、A3 の各受容体、および ADA が発現減少していること (*Hypertens Res.* 2007;30:781.) を示した。遺伝子多型解析に関しては現在まで心不全の病態と関連したアデノシン関連遺伝子の多型は同定されていない。

(4) ヒト血中でのアデノシン濃度および心筋組織でのアデノシン合成酵素の濃度測定

36 例の心不全患者から血液を採取し、血中のアデノシン濃度および心筋組織でのアデノシン合成酵素の血中濃度の測定を行った。結果、心不全患者においてはその重症度に応じて、冠静脈アデノシン濃度が有意に高値を示した。さらに組織でのアデノシン合成酵素の蛋白量が心不全心筋で増加していた (Fujita M et al *J Card Fail* 2008)。このことは心不全の病態におけるアデノシンの

重要性を示唆すると共に、これらを測定することが心不全の重症度の指標となることを示唆する。現在は抗体を使用した方法でアデノシンの測定を行っているが、今後質量分析計などを利用したより高感度で多検体を処理できるシステムを構築し、心不全診断・治療の指標とする予定である。

(5) アデノシン再吸収抑制剤を用いた心不全治療の開発

一年間の prospective, open randomized clinical trial においてジピリダモール投与群で心機能の改善等が見られた (*Hypertens Res.* 2007;30:913.)。

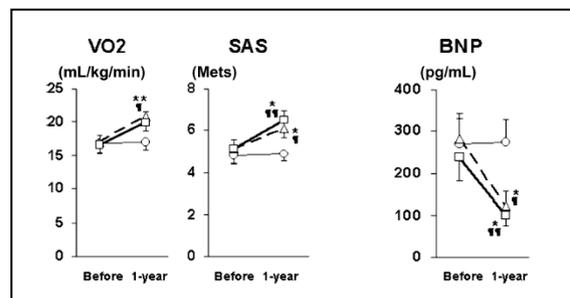


図2、ジピリダモール投与群(△75mg/day, □300mg/day、○コントロール)では最大酸素消費量 VO2, 運動指標 SAS の改善、BNP の低下が観察された。

さらに、従来アデノシンが虚血再灌流障害に対して心保護的に働き心筋梗塞サイズ縮小効果をもたらすことを我々は示しているが、このアデノシンと同様の ATP 感受性カリウムチャンネル開口作用を持つ硝酸薬であるニコランジルと、心不全治療薬であるヒト心房性利尿ペプチド(hANP)を用いて、急性心筋梗塞患者に対する大規模臨床試験を行い梗塞サイズ縮小効果および左室機能改善効果を評価した。慢性期ニコランジル投与において左室機能改善効果が、急性期 hANP 投与において梗塞サイズ縮小効果および左室機能改善効果が得られることを報告した

(*Lancet*. 2007;370:1483)。引き続き本研究を推し進めアデノシン受容体系賦活による心不全治療への介入を行うことにより、新たな心不全治療の開発に取り組む予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

全て査読有。

1. Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, Sasaki H, Kikuchi H, Hashimoto K, Oku N, Asakura M, Kim J, Takashima S, Komamura K, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. Prolonged Targeting of Ischemic/Reperfused Myocardium by Liposomal Adenosine Augments Cardioprotection in Rats. *Journal of the American College of Cardiology*. 53(8):709-717.2009
2. Fujita M, Asakura M, Sanada S, Funaya H, Tsukamoto O, Komamura K, Asanuma H, Taketani S, Isomura T, Nakamaru K, Furukawa H, Sawa Y, Hori M, Kitakaze M. Activation of ecto-5'-nucleotidase in the blood and hearts of patients with chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 14(5):426-430.2008
3. Sanada S, Asanuma H, Koretsune Y, Watanabe K, Nanto S, Awata N, Hoki N, Fukunami M, Kitakaze M, Hori M. Long-term oral administration of dipyridamole improves both cardiac and physical status in patients with mild to moderate chronic heart failure: A prospective open-randomized study. *Hypertension Research*. 30(10):913-919.2007
4. Fujita M, Asanuma H, Hirata A, Wakeno M, Takahama H, Sasaki H, Kim J, Takashima S, Tsukamoto O, Minamino T, Shinozaki Y, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 292(4):H2004-H2008.2007
5. Asakura M, Asanuma H, Kim J, Liao Y, Nakamaru K, Fujita M, Komamura K, Isomura T, Furukawa H, Tomoike H, Kitakaze M. Impact of adenosine receptor signaling and metabolism on pathophysiology in patients with chronic heart failure. *Hypertension Research*. 30(9):781-787.2007
6. Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, Fujita M, Asanuma H, Kim J, Komamura K, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation*. 114(18):1923-1932.2006
7. Kinugawa T, Fujita M, Ogino K, Kato M, Osaki S, Igawa O, Shigemasa C, Hisatome I, Kitakaze M. Catabolism of adenine nucleotides favors adenosine production following exercise in patients with chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 12(9):720-725.2006

〔学会発表〕（計 10 件）

米国心臓協会年次学術集会 2008

1. Zhao H, Liao Y, Minamino T, Asano Y, Asakura M, Kim J, Asanuma H, Takashima S, Hori M, Kitakaze M. Inhibition of Cardiac Remodeling by Pravastatin is Associated with Amelioration of Endoplasmic Reticulum Stress, 2008.
2. Utsunomiya H, Nakatani S, Okada T, Kanzaki H, Kyotani S, Yamamoto H, Nakanishi N, Kihara Y, Kitakaze M. Tricuspid E/Ea is a Powerful Predictor of Cardiac Events in Patients with Chronic Pulmonary Hypertension, 2008.
3. Takahashi A, Ueda HI, Satake M, Matsuyama TA, Ikeda Y, Yanase M, Kato TS, Kitakaze M, Nakatani T, Tomoike H. Histopathological Analysis as Predictive Markers of Recovery from End-Stage Heart Failure in Patients with Left Ventricular Assist Device, 2008.
4. Sasaki H, Asanuma H, Fujita M, Takahama H, Asakura M, Kim J, Minamino T, Takashima S, Sanada S, Ito S, Min K, Komamura K, Mochizuki N, Kitakaze M. Activation of Myocardial AMP-activated Protein Kinase by Metformin Prevents Progression of Heart Failure in Dogs; Involvement of eNOS Activation, 2008.
5. Me J, Minamino T, Asano Y, Liao YL, Kitakaze M, Wang SW. Distinct Regulation of Cardiac Function by Histone Deacetylase Inhibitors in Response to Pressure Overload, 2008.
6. Ito S, Asakura M, Liao YL, Min K, Ogai A, Asanuma H, Takahama H, Sasaki H,

Kim J, Kitakaze M. Usefulness of Exon Array Analysis for Elucidation of Pathogenesis of Heart Failure - Alterations of Splicing Patterns In Murine Failing Hearts, 2008.

7. Asanuma H, Asakura M, Kim J, Takahama H, Sasaki H, Sanada S, Ohara T, Min K, Ito S, Fujita M, Asano Y, Takashima S, Minamino T, Komamura K, Kitakaze M. Management of Hyperphosphatemia Is an Important Novel Therapeutic Target In Chronic Heart Failure, 2008.
8. Asano Y, Takashima S, Liao YL, Kitakaze M. Paradigm Shift to Epigenetic Memory for the Pathological Understanding of Chronic Heart Failure, 2008.

米国心臓協会年次学術集会 2007

9. Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Asakura M, Kim J, Takashima S, Komamura K, Hori M, Mochizuki N, Kitakaze M. Polyethylene-glycol coated liposomal adenosine attenuates hypotension and bradycardia and augments cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in rats - Nano-size drug delivery system targeted to infarcted myocardium, 2007.
10. Asakura M, Kim J, Asanuma H, Myoishi M, Seguchi O, Shintani Y, Tomoike H, Kitakaze M. Usefulness of carperitide as an adjunctive therapy for acute myocardial infarction in patients with chronic kidney disease - Subgroup analysis of J-WIND-ANP trial, 2007.

〔図書〕(計2件)

1. 北風政史

心不全をどうとらえるか

医学書院 2007年

2. 浅沼博司、北風政史

心筋虚血

日本臨床社 2007年

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北風 政史 (KITAKAZE MASAFUMI)

国立循環器病センター研究所・臨床研究開発部・部長

研究者番号：20294069

(2) 研究分担者

朝倉 正紀 (ASAKURA MASANORI)

国立循環器病センター研究所・心臓血管内科・医長

研究者番号：80443505

金 智隆 (KIM JIYOONG)

国立循環器病センター研究所・臨床研究開発部・客員研究員

研究者番号：30393226

小粥 章子 (OGAI AKIKO)

国立循環器病センター研究所・疫学部・室員

研究者番号：90359274

友池 仁暢 (TOMOIKE HITONOBU)

国立循環器病センター研究所・病院・院長  
研究者番号：90112333

(3) 連携研究者

高島 成二 (TAKASHIMA SEIJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90379272

南野 哲男 (MINAMINO TETSUO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30379234

中谷 敏 (NAKATANI SATOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80393221

駒村 和雄 (KOMAMURA KAZUO)

兵庫医療大学・薬学部・教授

研究者番号：90311448

