

令和元年6月24日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18973

研究課題名(和文) 遮断薬にかわる新規不整脈治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new antiarrhythmic drugs alternative to beta blocker therapy

研究代表者

吹田 憲治 (Suita, Kenji)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：90569542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：交感神経 アドレナリン受容体 (β -AR) シグナルの過剰および慢性的な活性化は不整脈の誘因となる。本研究では、 β -ARシグナルを仲介するアデニル酸シクラーゼ (AC) と cAMP 標的タンパク質である Epac の心臓型サブタイプに焦点をあて、不整脈における両因子の役割を、それぞれの遺伝子ノックアウトマウスを用いて解析した。また、心臓型 AC および Epac1 サブタイプに選択的な阻害剤の抗不整脈作用および心機能への副作用を、遮断薬と比較検討した。心臓型 AC5 および Epac1 のノックアウトマウスでは不整脈発症が顕著に抑制された。また、両分子の阻害剤は、遮断薬のような心機能低下をきたすことなく不整脈を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遮断薬は交感神経の過剰亢進による不整脈の治療に使用されてきたが、心機能を低下させる副作用は特に高齢者にとって問題である。超高齢社会をむかえたわが国において、副作用が少なく高齢者に安心して処方できる不整脈治療法の開発は重要な課題である。本研究の結果から、 β -AR 受容体シグナル伝達経路を仲介する細胞内因子である心臓型 AC5 や Epac1 をターゲットとした治療薬が、上記の要求を満たす有望な候補であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Excessive and chronic activation of sympathetic beta-adrenergic receptor (β -AR) signal are known to be a trigger of arrhythmias. In this study, we focus on the cardiac subtype of adenylate cyclase (AC) and exchanged protein directly activated by cAMP (Epac), a cAMP target protein, that mediates the β -AR signaling. We used the gene knockout mice to determine the role of both factors in arrhythmogenesis. Further, antiarrhythmic effect and adverse effects on cardiac function of inhibitors selective for cardiac AC and Epac1 subtypes were compared with a β -blocker. As a result, arrhythmia onset was significantly suppressed in AC5 and Epac1 knockout mice as compared to control mice. In addition, it has been clarified that inhibitors of both molecules prevented arrhythmias without deteriorating heart function as observed in β -blocker-treated mice.

研究分野：生理学

キーワード：不整脈 分子標的薬 β -アドレナリン受容体 アデニル酸シクラーゼ cAMP Epac

1. 研究開始当初の背景

心臓の機能調節におけるベータアドレナリン受容体 (β -adrenergic receptor: β -AR) シグナルの重要性はよく知られている。 β -AR の $G\alpha$ サブユニットを介して活性化されたアデニル酸シクラーゼ (adenylyl cyclase: AC) によって産生された cAMP は、プロテインキナーゼ A および Epac (exchanged protein directly activated by cAMP) を介して興奮・収縮関連タンパク質のリン酸化等を調節し、心臓の収縮力および心拍数を上昇させる。一方、 β -AR シグナルの過剰および慢性的な活性化は心筋細胞内のカルシウムホメオスタシスの破綻や心筋細胞の傷害をまねき、心不全や不整脈の誘因となることが知られているが、その分子機構の詳細はいまだ不明な点が多い。交感神経系が過剰に亢進した心不全や不整脈の治療においては β -AR アンタゴニスト (β 遮断薬) が有効であるが、 β 遮断薬には導入時の心機能抑制や持続的な肺機能抑制が副作用として認められる。特に、もともと心機能が低下している高齢の心疾患患者に対して、さらなる心臓収縮機能の低下や徐脈を誘発するリスクは重大である。また、 β 遮断薬などの受容体制御剤を用いた薬物治療においては、ターゲットの受容体レベルで見られる脱感作やダウンレギュレーションにより、内服治療の時間的経過とともに治療効果が減弱することも問題となっている。例えば、カテコラミンの長期投与患者や重症心不全患者においては心臓における β 受容体のダウンレギュレーションが著しい。したがって、心機能や肺機能への副作用が少なく高齢者にも安心して長期使用できる不整脈治療薬は、わが国を含めた高齢化する社会の医療にとって非常に有益であると考えられる。

AC5 サブタイプならびに Epac1 サブタイプは心臓に優位に発現する。これまでの先行研究において、AC5 遺伝子欠損 (AC5KO) マウスは定常時の心機能が野生型と変わらないが、慢性カテコラミン負荷や慢性圧負荷などの心不全誘発ストレスに対しては野生型よりも高い耐性を示すことが証明された。また、Epac1KO マウスは野生型と比べて軽微な心機能低下を認めたものの、AC5KO マウスと同様に心不全誘発ストレスに対して野生型よりも強い抵抗性を示した。これらのことから、過剰かつ慢性的な交感神経活性化による心筋障害ならびに心不全の発症において、AC5 と Epac1 の両者が重要な役割を果たしていることが推測された。AC5KO は定常時の心機能が低下しないこと、および AC5 は肺ではなく心臓選択的に発現するサブタイプであることから、AC5 を標的とした阻害薬は β 遮断薬よりも上記の副作用が少ないことが予想された。一方、細胞内酵素では受容体に認められるようなダウンレギュレーションが起こりにくいことが知られている。すなわち心臓型 AC5 や Epac1 活性調節剤では治療効果の減弱が起こりにくいことを推測され、これは長期に渡る薬物治療を考慮した場合に有利な特徴であると考えられた。さらに我々は、AC5 の阻害に必要なファルマコフォアを元にしたバーチャルスクリーニングにより、心臓型 AC 選択的阻害剤の候補として抗ヘルペス薬のピダラビン (商品名: アラセナ A, 持田製薬) を見出した。

β 遮断薬は Vaughan Williams 分類 II 群に属する不整脈治療薬であり、心房細動 (atrial fibrillation: AF) や心室性不整脈の治療に使用されてきた。つまり心不全と同様、AF や心室性不整脈の発症および病態の増悪においても β -AR シグナルの異常な活性化が原因であると考えられているが、AC5 や Epac1 の役割は証明されていない。

2. 研究の目的

不整脈発症における心臓型 AC5 および Epac1 の重要性を明らかにし、当該分子を標的とした不整脈治療法の有効性を証明する。さらに、両分子の阻害剤による抗不整脈作用ならびに心機能に与える副作用を β 遮断薬と比較検討し、心臓型 AC5 および Epac1 阻害剤が β 遮断薬にかわる新規不整脈治療薬として有用であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究では、C57BL/6N マウス、心臓型 AC5 遺伝子欠損マウス (AC5KO)、Epac1KO マウス、Calsequestrin 2 遺伝子欠損マウス (Casq2KO) および Casq2KO-Epac1KO (ダブルノックアウト) マウスを用いた。

(2) 薬剤投与

本研究では、ピダラビン、Epac1 選択的阻害剤である CE4F、および β 1 受容体選択的アンタゴニストであるメトプロロールを用いた。各種薬剤はジメチルスルホキシドまたは生理的食塩水に溶解し、微小浸透圧ポンプを用いてマウスに皮下投与 尾静脈からの Bolus 静注 頸静脈からの持続静注 腹腔内投与を行った。

(3) 心房細動モデルによる解析

これまでに研究代表者は、持続時間の長い AF を発症させるマウス実験系を確立した。既存の方法ではマウスに数秒から数十秒程度の AF を発症させる程度であったが、事前

に交感神経物質ノルアドレナリンを腹腔内投与したマウスに心房バーストペーシング刺激を与えると10分程度の一過性AFが発症する。持続時間の長いAFを誘発可能なため、遺伝子のAFにおける役割や薬剤のAF抑制作用の検討に有用である。本研究では、以下の項目について解析を行った。

イソフルラン吸引麻酔下、ノルアドレナリン投与/非投与の両方について、AC5KOマウスおよびEpac1KOマウスのAF持続時間を野生型マウスと比較した。ビダラビン、CE4F、およびメトプロロールのAF持続時間短縮効果を解析した。

(4) 心室性不整脈モデルによる解析

心室性不整脈の解析には、Vanderbilt大学のKnollmann博士らが確立したCasq2KOマウスを用いた。イソフルラン吸引麻酔下において、体表面心電図をモニターしながらCasq2KOマウスに1.5 mg/kg イソプロテレノール(isoproterenol: ISO)を腹腔内投与することにより一過性に心室性不整脈(premature ventricular contraction: PVC)を誘発し、ISO投与後20分間に出現したPVCの数を計測した。本研究では、以下の項目について解析を行った。

Csq2KO-Epac1KOマウスのPVC数をCasq2KOマウスと比較した。ビダラビン、CE4F、およびメトプロロールのPVC抑制効果を解析した。

(5) 心機能測定

イソフルラン吸引麻酔下、以下の方法により各種薬剤の心機能への影響を調べた。心臓エコー検査によりマウスの左室駆出率(Left ventricular ejection fraction: LVEF)および心拍数を測定した。頸静脈から挿入したカテーテルを用い、最大および最小左心室圧立ち上がり速度(max dP/dTおよびmin dP/dT)ならびに心拍数を測定した。

(6) 心筋細胞のカルシウム動態測定

定法に従い、マウスの心臓から心房および心室の心筋細胞を単離した。単离心筋細胞をカルシウム指示薬であるFluo-4 AMで処理した後、蛍光顕微鏡下で細胞内のカルシウム動態を測定した。本実験系により、ISOおよび各阻害剤の影響を解析した。また、Epac1KOマウスのカルシウム動態を野生型と比較した。

(7) 心筋細胞の酸化ストレス評価

単离心筋細胞を活性酸素種の指示薬であるDCFH-DAで処理し、顕微鏡下で蛍光強度を観察することにより細胞内の酸化ストレスを評価した。本実験で、ISOおよびビダラビンの影響を解析した。

4. 研究成果

(1) AC5はAFの発症に重要である

AC5KOマウスでは、野生型と比較してノルアドレナリン投与後に発症させたAFの持続時間が有意に短縮していた。AC5は、日中に発症するAFや心臓手術の周術期に高頻度で発現する術後心房細動など、交感神経系が亢進した状態で発症すると考えられるAFにおいて特に重要であることが示唆された。

(2) ビダラビンは心房細動および心室性不整脈を抑制する

ビダラビンとメトプロロールは、臨床で許容されるそれぞれの一日最大投与量において、マウスに誘発したAFの持続時間を同程度に短縮した。また、ビダラビンはISO投与によりCasq2KOマウスに誘発したPVCの数を、容量依存的に減少させた。

(3) ビダラビンは定常時の心機能を低下させない

ビダラビンとメトプロロールで同程度のAF抑制効果が認められた投与量において、両薬剤が心機能に与える影響を解析した。その結果、メトプロロール投与群ではLVEF、dP/dT max、dP/dT minおよび心拍数が有意な低下を認めたが、ビダラビン投与群ではいずれのパラメーターも有意な変化を示さなかった。これらのことから、ビダラビンはβ遮断薬で問題となる定常時の心機能低下をきたすことなく不整脈を抑制することが示唆された。

(4) ビダラビンは心筋細胞における催不整脈性イベントを抑制する

心筋細胞内の筋小胞体からのカルシウムリークの増加や自発的カルシウム放出頻度(SCR)の増加は、心筋細胞の異常な興奮を評価する指標の一つと考えられている。心

房および心室の両方で、単離心筋細胞におけるカルシウムリークならびに SCR は ISO 刺激によって有意に増加した。ビダラビンは ISO によるカルシウムリークと SCR の増加を有意に抑制したが、ベースライン (ISO 非刺激下) には影響を与えなかった。これらのことは、動物実験で得られたビダラビンの不整脈抑制作用と合致する。

- (5) ビダラビンは心筋細胞内の酸化ストレスを低減する
心筋細胞内の酸化ストレスは ISO 刺激によって有意に亢進するが、ビダラビンは ISO 刺激依存的な酸化ストレスの増加を抑制した。ビダラビンによる不整脈の抑制において、本薬剤による抗酸化作用が重要であることが示唆された。
- (6) Epac1 は心房細動と心室性不整脈の発症に重要である
Epac1KO マウスおよび Casq2KO-Epac1KO マウスでは、野生型と比較してそれぞれ AF の持続時間および PVC が有意に減少していた。また、Epac1 阻害剤である CE3F4 は、マウスに発症させた AF および心室性不整脈を抑制した。また、CE4F は抗不整脈作用を示した投与量においてマウスの心機能を低下させなかった。さらに、Epac1KO マウスや CE3F4 で処理した心筋細胞においては、ISO 刺激による SR カルシウムリークならびに SCR 頻度を有意に抑制されていた。これらのことは、Epac1 を標的とした不整脈治療の有効性を強く示唆する。
- (7) 総括および今後の展望
本研究の結果から、 β 受容体シグナル伝達経路を仲介する細胞内因子である心臓型 AC5 や Epac1 を標的とした不整脈治療法の有効性が明らかとなった。とりわけビダラビンはヘルペス治療薬として長年臨床で使用されてきた実績をもつため、ヘルペス治療で許容される投与方法、投与量を用いて、比較的スムーズに臨床試験を進行させることが期待できる。例えば術後心房細動においては、ビダラビン製剤 (アラセナ A) の点滴静注による AF 予防効果や停止効果を判断することが可能である (UMIN000006026)。我々が明らかにしたビダラビンの心臓型 AC 阻害作用や酸化ストレス阻害作用により、この抗ヘルペス剤が将来的に不整脈の治療薬として適応されることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

- Ito A, Ohnuki Y, Suita K, Ishikawa M, Mototani Y, Shiozawa K, Kawamura N, Yagisawa Y, Nariyama M, Umeki D, Nakamura Y, Okumura S: Role of β -adrenergic signaling in masseter muscle. *PLOS ONE*, **14**, e0215539, 2019. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0215539
- Kawamura N, Ohnuki Y, Matsuo I, Suita K, Ishikawa M, Mototani Y, Shiozawa K, Ito A, Yagisawa Y, Hayakawa Y, Nariyama M, Umeki D, Ujiie Y, Gomi K, Okumura S: Effects of chronic Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide infusion on skeletal muscles in mice. *J Physiol Sci*, **69**, 503-511, 2019. 査読有.
DOI: 10.1007/s12576-019-00670-z
- Prajapati R, Fujita T, Suita K, Nakamura T, Cai W, Hidaka Y, Umemura M, Yokoyama U, Knollmann BC, Okumura S, Ishikawa Y: The usefulness of exchanged protein directly activated by cAMP (Epac)1-inhibiting therapy for prevention of atrial and ventricular arrhythmias in mice. *Circ J*, **83**, 295-303, 2019. 査読有.
DOI: 10.1253/circj.CJ-18-0743
- Shiozawa K, Mototani Y, Suita K, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Matsuo I, Hayakawa Y, Nariyama M, Umeki D, Saeki Y, Onuki Y, Okumura S: Relationship between bite size per mouthful and dental arch size in healthy subjects. *J Physiol Sci*, **69**, 159-163, 2018. 査読有.
DOI: 10.1007/s12576-018-0630-8
- Mototani Y, Okamura T, Goto M, Shimizu Y, Yanobu-Takanashi R, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Umeki D, Nariyama M, Suita K, Ohnuki Y, Shiozawa K, Sahara Y, Kozasa T, Saeki Y, Okumura S: Role of G-protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3 (GRIN3) in β -arrestin 2-Akt signaling and dopaminergic behaviors. *Pflügers Arch*, **470**, 937-947, 2018. 査読有.
DOI: 10.1007/s00424-018-2124-1
- Suita K, Fujita T, Cai W, Jin H, Prajapati R, Hidaka Y, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Knollmann BC, Okumura S, Ishikawa Y: Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents catecholamine-induced arrhythmias without adverse effect on heart function in mice. *Pflügers Arch*, **470**, 923-935, 2018. 査読有.
DOI: 10.1007/s00424-018-2121-4
- Jin H, Fujita T, Jin M, Kurotani R, Hidaka Y, Cai W, Suita K, Prajapati R, Liang C, Ohnuki Y, Mototani Y, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y: Epac activation inhibits

IL-6-induced cardiac dysfunction. *J Physiol Sci*, **68**, 77-87, 2018. 査読有.

DOI: 10.1007/s12576-016-0509-5

吹田憲治：抗ヘルペス剤の心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害効果に着目した新しい心不全治療。循環制御，第38巻，第2号，126-132，日本循環制御医学会，2017。査読無。

https://www.jstage.jst.go.jp/article/ccm/38/2/38_126/_article/-char/ja

Jin H, Fujita T, Jin M, Kurotani R, Namekata I, Hamaguchi S, Hidaka Y, Cai W, **Suita K**, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Prajapati R, Liang C, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Tanaka H, Okumura S, Ishikawa Y: Cardiac overexpression of Epacl in transgenic mice rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and inhibits Jak-STAT pathway. *J Mol Cell Cardiol*, **108**, 170-180, 2017. 査読有.

DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.05.014

Nakamura T, Fujita T, Kishimura M, **Suita K**, Hidaka Y, Cai W, Umemura M, Yokoyama U, Uechi M, Ishikawa Y: Vidarabine, an anti-herpes virus agent, protects against the development of heart failure with relatively mild side effects on cardiac function in canine model of dilated cardiomyopathy. *Circ J*, **80**, 2496-2505, 2016. 査読有.

DOI: 10.1253/circj.CJ-16-0736

Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, **Suita K**, Liang C, Prajapati R, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y: Disruption of Epacl protects the heart from adenylyl cyclase type 5-mediated cardiac dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, **475**, 1-7, 2016. 査読有.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.123

Suita K, Fujita T, Hasegawa N, Cai W, Jin H, Hidaka Y, Prajapati R, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y: Norepinephrine-induced adrenergic activation strikingly increased the atrial fibrillation duration through β 1- and α 1-adrenergic receptor-mediated signaling in mice. *PLOS ONE*, **10**, e0133664, 2015. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0133664

Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, **Suita K**, Fujita T, Nakamura Y, Saeki Y, Okumura S: Protective effects of clenbuterol against dexamethasone-induced masseter muscle atrophy and myosin heavy chain transition. *PLOS ONE*, **10**, e0128263, 2015. 査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone

[学会発表](計6件)

Suita K, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: Usefulness of anti-arrhythmic drug therapy targeting cardiac adenylyl cyclase. FAOPS 9th Congress (The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan), 2019.

Suita K, Okumura S, Ishikawa Y: New antiarrhythmic drug therapy targeting cardiac adenylyl cyclase. 第57回日本生体医工学会大会，オーガナイズドセッション「医工学と循環治療薬」，2018年。

吹田憲治，奥村敏，石川義弘：抗ヘルペス剤ビダラビンによる酸化ストレスの低減を介した不整脈抑制作用。第27回日本病態生理学会大会，2018年。

Suita K, Ohnuki Y, Okumura S: Effect of enforced bite-opening on heart in mice. 第95回日本生理学会大会，2018年。

吹田憲治，八木澤由佳，大貫芳樹，梅木大輔，石川美佐緒，伊藤愛子，川村直矢，中村芳樹，奥村敏：開口負荷がマウスの心房に与える影響。第59回日本歯科基礎医学会学術大会，2017年。

Suita K, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: Inhibition of cardiac adenylyl cyclase suppresses catecholamine-induced arrhythmias without deteriorating heart function. 第94回日本生理学会大会，日本病態生理学会連携シンポジウム「自律神経研究の新しい流れと病態生理学」，2017年。

[図書](計1件)

吹田憲治：「学会関連印象記 第57回日本生体医工学会大会」。循環制御，第39巻，第3号，194-196，日本循環制御医学会，2018。

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：9- β -D-アラビノフラノシルヒポキサンチン(Ara-Hx)による不整脈治療

発明者：藤田孝之、石川義弘、中村隆、奥村敏、**吹田憲治**

権利者：横浜市立大学

種類：特許

番号：特許願 2017-250478

出願年：平成29年

国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：ピダラピンによる心房細動治療
発明者：石川義弘，奥村敏，吹田憲治
権利者：横浜市立大学
種類：特許
番号：特許第 6028983 号
取得年：平成 2 8 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/>（横浜市立大学大学院・医学研究科・循環制御医学）
<https://tsurumi-univ-seiri.jimdo.com/>（鶴見大学歯学部・生理学）

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石川 義弘

ローマ字氏名：(ISHIKAWA, Yoshihiro)

研究協力者氏名：奥村 敏

ローマ字氏名：(OKUMURA, Satoshi)