

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15013

研究課題名（和文）心臓型アデニル酸シクラーゼを治療標的とした新規抗不整脈薬の開発

研究課題名（英文）Development of anti arrhythmia drug targeting cardiac adenylyl cyclase.

研究代表者

中村 隆（Nakamura, Takashi）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30772371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害薬であるビダラビンは抗不整脈作用を有することが明らかになっている。しかし、ビダラビンは難水溶性かつ脂溶性という特性から、心不全の悪化や中枢神経に対する副作用の問題が生じる可能性が高く、臨床応用への弊害となっている。そこで、ビダラビンの構造を基に水溶性を高めた水溶性ビダラビン誘導体 V2Eを開発した。本申請では水溶性ビダラビン誘導体 V2Eの抗不整脈作用を動物実験にて検証した。その結果、水溶性ビダラビン誘導体 V2Eは心房細動に対する除細動効果および心室性不整脈に対する予防的抗不整脈効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の交感神経遮断薬であるベータ受容体遮断薬は抗不整脈効果を有するが、心機能抑制や糖尿病および喘息の悪化などの副作用があることが問題となる。そこで、我々はベータ受容体遮断薬に代わる、安全な抗不整脈薬の開発を目指している。その候補の一つが心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害薬である。臨床応用可能な心臓型アデニル酸シクラーゼを開発することで、ベータ受容体遮断薬が使用困難な患者に対しても安全に抗不整脈治療が可能になる可能性が高い。今後さらなる安全性の高い治療薬を開発することで、より多くの不整脈患者に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Vidarabine, which is cardiac adenylyl cyclase inhibitor, has been shown to have anti-arrhythmic effects. However, since vidarabine is poorly water-solubility, it is likely to cause worsening of heart failure and central nervous system damage. Therefore, it is an obstacle to clinical application. We have developed a water-soluble vidarabine derivate V2E, which is 3-5 times more soluble in water than vidarabine. In this application, we examined the effect of water-soluble vidarabine derivate V2E on atrial fibrillation and ventricular tachyarrhythmia. Water-soluble vidarabine derivate V2E showed anti-arrhythmic effect on atrial fibrillation and ventricular tachyarrhythmia model in mice.

研究分野：生理学

キーワード：抗不整脈薬 アデニル酸シクラーゼ 心房細動 心室性不整脈 水溶性誘導体 静脈内投与

1. 研究開始当初の背景

心房細動を含む様々な不整脈の発生率は高齢になるとともに増加することから、超高齢化社会を迎える日本において、不整脈の治療方法の開発は急務である。不整脈の発生および増悪には アドレナリン受容体シグナリングを主とする過度な交感神経の活性化が関与している。そのため、交感神経の活性抑制を目的として、アドレナリン受容体遮断薬(受容体遮断薬)は不整脈治療薬として用いられる。しかしながら、受容体遮断薬には陰性変時および変力作用による心機能抑制や、喘息や糖尿病などの他臓器疾患の増悪など、重大な副作用を引き起こすため、しばしば、その使用が困難となるケースが存在する。

横浜市立大学循環制御医学ではこれらの副作用の少ない交感神経遮断薬の開発を行ってきた。なかでも、アドレナリン受容体シグナリングの下流に存在するアデニル酸シクラーゼに着目しており、心臓型アデニル酸シクラーゼ抑制薬の心疾患治療薬としての有効性および安全性を明らかにしてきた^{1,2)}。アデニル酸シクラーゼは9つのサブタイプが存在しており、その5型および6型は心臓に強く発現していることから、心臓型アデニル酸シクラーゼとされている。5型アデニル酸シクラーゼを遺伝的に欠損させたマウスでは、通常時の心機能に違いを認めないものの、心臓へのストレスによる心不全発症が抑制されることが明らかにされている³⁾。このことから、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害薬は安静時の心機能抑制を示すことなく、心保護作用を示すことが期待された。そこで、心臓型アデニル酸シクラーゼの抑制作用を有する薬剤をコンピューター解析手法にて同定したところ、抗ウイルス薬として既に臨床応用されているビダラビンが同定された。

研究代表者はこれまでに、マウスおよびイヌの心不全モデルにおいて、ビダラビンが心臓型アデニル酸シクラーゼの抑制を介して心機能障害を抑制すること、および、心機能抑制に関連する有害事象を認めないことを明らかにした^{1,2)}。さらに、横浜市立大学循環制御医学ではマウスにおける不整脈モデルを用いた実験にて、ビダラビンが抗不整脈作用を有することを明らかにした⁴⁾。

しかしながら、ビダラビンを使用する際に問題となるのが、ビダラビンの難水溶性かつ脂溶性という特性である。難水溶性のため比較的少量の溶質に溶解して用いられるが、不整脈患者や心機能の低下している患者において過剰な水分の投与は心疾患を増悪させる可能性がある。また、ビダラビンはヘルペスウイルス性脳炎の治療薬として用いられており、脂溶性を保ち血液脳関門を通過する必要があったが、心臓への作用を目的として使用した場合、その作用は中枢神経障害や精神障害といった副作用となる可能性がある。我々はビダラビンの水溶性を高めることによりこれらの問題点を克服することを期待し、ビダラビンにジメチルグリシン保護基を付与し、水溶性を高めたビダラビン誘導体 V2E を開発した(日本、米国、欧州にて特許取得済み)。

2. 研究の目的

横浜市立大学循環制御医学では心房細動および心室性不整脈のモデルマウスを確立している。なかでも、従来の心房細動モデルに比較して長時間の心房細動を誘導可能なモデルを確立している⁵⁾。従来のマウスを用いた心房細動モデルでは、心房細動の持続時間が短いため、心房細動誘発中における薬物投与は困難であり、薬物の除細動効果を検証できなかった。しかしながら、長時間誘導可能な心房細動モデルと頸静脈カテーテル設置を組み合わせることにより、心房細動誘発中の薬物の静脈内投与が可能となることが期待される。また、当研究室ではカテコラミン誘発性多形性心室頻拍モデルであるカルセクエストリン遺伝子欠損マウスを保有しており、心室頻拍への薬物の効果を検討することが可能である。

当研究室ではこれまでにビダラビンの抗不整脈効果を検討してきた。その結果、ビダラビンは心房細動および心室頻拍を抑制することが明らかとなった⁴⁾。しかしながら、ビダラビンは難水溶性という性質により、十分量の薬剤濃度を静脈内投与することが不可能であった。そのため、上記結果はミニオスモティックポンプまたは腹腔内投与にてビダラビンを投与した後に不整脈を誘発することで得られた結果であり、ビダラビンの不整脈に対する予防的効果を検証することが出来なかった。一方、水溶性ビダラビン誘導体 V2E を用いた場合、静脈投与により十分量の薬用量を急速に投与することが可能であるとともに、早急に血中濃度を上昇させることが可能となる。さらに、上記の不整脈モデルを用いることにより、水溶性ビダラビン誘導体 V2E の静脈投与による不整脈に対する予防的効果のみならず、除細動効果を検討することが可能となる。そこで、本研究では、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害薬である水溶性ビダラビン誘導体 V2E の抗不整脈作用(除細動効果および予防的効果)を動物実験にて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 心房細動誘発方法

C57BL6/N マウスにイソフルラン麻酔を行った後、心電図の記録を開始した。その後、電極刺

激可能な経食道カテーテルを心臓直上に設置した後、ノルエピネフリン (1.5 mg/kg)を腹腔内投与した。ノルエピネフリン投与 10 分後に経食道カテーテルによるバーストペーシングを行うことで、心房細動を誘発した。誘発された心房細動の持続時間を計測した。

2) 心室頻拍誘発方法

カルセクエストリン遺伝子欠損マウスを使用する。イソフルラン麻酔を行い、心電図の記録を開始した。その後、イソプロテレノール (1.5 mg/kg)を腹腔内投与し、発生した心室性不整脈の数を計測した。

3) 心拍数の計測

C57BL6/N マウスにイソフルラン麻酔を行った後、心電図の記録を開始した。薬剤投与前および薬剤投与後より 10 分まで連続的に計測した。5 心拍の平均の心拍数をその時点での心拍数とした。

4 . 研究成果

1) 静脈投与可能な心房細動モデルの確立

心房細動誘発中の薬剤の抗不整脈効果を検討するため、頸静脈にカテーテルを設置した後、心房細動を誘発することが可能なモデルを確立することを検討した。まず、無麻酔下での投薬を目的として、麻酔下にて頸静脈にカテーテルを設置した後、麻酔より覚醒させ、1 週間後に心房細動を行う予定としたが、全てのマウスにて翌日までにカテーテルが抜去されていた。そのため、麻酔下にて投薬を行うこととした。イソフルラン麻酔を行った後、頸静脈カテーテルを設置し、その直後に心房細動誘発を行った。心房細動誘発後 1 分にて生理食塩水を投与した。その結果、生理食塩水投与後も 10 分程度持続する心房細動が持続された。次に、Epac1 阻害薬を用いて、抗不整脈作用の検討に使用できるモデルかどうかを検討した。Epac1 の抑制は心房細動の持続時間を短縮することが既に報告されている⁶⁾。そこで、Epac1 阻害薬を投与した後、心房細動を誘発したところ、顕著に心房細動持続時間が短縮されることが明らかとなった。このことから、本モデルを用いることで、心房細動に対する薬物の静脈内投与による抗不整脈効果が検討できるものと考えられた。

2) 水溶性ビダラビン誘導体 V2E の心房細動に対する除細動効果の検討

上記の静脈投与可能な心房細動モデルを用いて、水溶性ビダラビン誘導体 V2E の除細動効果を検討した。心房細動誘発後 1 分にて水溶性ビダラビン誘導体 V2E を静脈内投与したところ、生理食塩水投与と比較して顕著に心房細動持続時間が短縮されることが明らかとなった。このことから、水溶性ビダラビン誘導体 V2E は心房細動に対する除細動効果を有することが明らかとなった。

3) 静脈投与可能な心室頻拍モデルの確立

上記の心房細動モデル同様、頸静脈カテーテル設置後に、心室頻拍誘発実験を行ったが、全例において心室頻拍が認められなかった。そのため、尾静脈より生理食塩水を投与した後、心室頻拍誘発を行ったところ、無投薬と同程度の心室頻拍が認められた。このことから、本モデルを用いることで、心室頻拍に対する薬物の静脈内投与による予防的抗不整脈作用が検討できるものと考えられた。

4) 水溶性ビダラビン誘導体 V2E の心室頻拍に対する予防的抗不整脈作用の検討

上記の心室頻拍モデルを用いて、水溶性ビダラビン誘導体 V2E の予防的抗不整脈効果を検討した。水溶性ビダラビン誘導体 V2E を尾静脈より静脈内投与した 20 分後に、心室頻拍を誘導したところ、生理食塩水投与と比較して顕著に心室性不整脈の数が減少した。このことから、水溶性ビダラビン誘導体 V2E は心室頻拍に対して予防的抗不整脈効果を示すことが明らかとなった。

5) ビダラビン静脈内投与による心拍数への作用の検討

麻酔下にて頸静脈カテーテルを設置した後、ビダラビン、 受容体遮断薬であるメトプロロールおよび生理食塩水を静脈内投与した。その結果、ビダラビン投与後すぐに、一過性の心拍数の低下が認められ、その後急速に回復した。一方、メトプロロールでは徐々に低下認められた、投与後 10 分にて明らかな減少が認められた。このことから、心臓型アデニル酸シクラーゼ

阻害薬を急速に静脈内投与することで一過性の心機能の低下が認められることが明らかとなった。

6) ビダラビン代謝産物による抗不整脈作用の検討

上記の結果より、水溶性ビダラビン誘導体 V2E において心機能抑制が認められることが示唆されたことから、より安全性の高い抗不整脈薬を探索するためビダラビン代謝産物にて検討した。その結果、心房細動の持続時間を顕著に減少させるとともに、心拍数に影響を及ぼさなかった。このことから、ビダラビン代謝産物は安全性の高い抗不整脈薬になりうるものと考えられた。

<引用文献>

1. Iwatsubo K, Bravo C, Uechi M, Baljinnyam E, Nakamura T, Umemura M, Lai L, Gao S, Yan L, Zhao X, Park M, Qiu H, Okumura S, Iwatsubo M, Vatner DE, Vatner SF, Ishikawa Y. (2012): Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 302, H2622-H2628.
2. Nakamura T, Fujita T, Kishimura M, Suita K, Hidaka Y, Cai W, Umemura M, Yokoyama U, Uechi M, Ishikawa Y. (2016): Vidrabine, an anti-herpes virus agent, protects against the development of heart failure with relatively mild side effects on cardiac function in canine model of pacing-induced dilated cardiomyopathy. *Circ J.*, 80, 2496-2505.
3. Okumura S, Vatner DE, Kurotani R, Bai Y, Gao S, Yuan Z, Iwatsubo Km Ulucan C, Kawabe J, Ghosh K, Vatner SF, Ishikawa Y. (2007): Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cycle adenosine monophosphate signal and increase Akt signal with chronic catecholamine stress. *Circulation.*, 118, 1776-1883.
4. Suita K, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Jin H, Prajapati R, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Knollmann BC, Okumura S, Ishikawa Y. (2018): Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents catecholamine-induced arrhythmias without adverse effect on heart function in mice. *Pflugers Arch.*, 470, 923-935.
5. Suita K, Fujita T, Hasegawa N, Cai W, Jin H, Hidaka Y, Prajapati R, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y. (2015): Norepinephrin-induced adrenergic activation strikingly increased the atrial fibrillation duration through 1- and 1-adrenergic receptor-mediated signaling in mice. *Plos One.*, 10, e0133664.
6. Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Ishikawa Y. (2014): Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest.*, 124, 2785-2801.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Prajapati R, Fujita T, Suita K, Nakamura T, Cai W, Hidaka Y, Umemura M, Yokoyama U, Knollmann BC, Okumura S, Ishikawa Y.	4. 巻 83
2. 論文標題 Usefulness of Exchanged Protein Directly Activated by cAMP (Epac)1-Inhibiting Therapy for Prevention of Atrial and Ventricular Arrhythmias in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation journal	6. 最初と最後の頁 295-303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-18-0743.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----