

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790219

研究課題名(和文)不整脈発症に重要なベータアドレナリン受容体シグナル経路の解析と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Analysis of potential molecular targets in the beta-adrenergic receptor signal pathway for new drug therapy of catecholamine-induced arrhythmias

研究代表者

吹田 憲治 (SUITA, KENJI)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助手

研究者番号：90569542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アデニル酸シクラーゼ(AC)およびcAMPの標的分子Epacは心臓のβアドレナリン受容体(β-AR)シグナル経路の主要な構成因子である。β-ARシグナル経路の異常亢進を誘因とする心房細動(AF)や心室性不整脈の治療にはβ遮断薬が有効であるが、導入時の心機能低下が副作用として問題となる。本研究では、我々が心臓型AC阻害剤として見出したピダラビン(抗ヘルペス薬)の抗不整脈作用を解析した。

ピダラビンは心機能を低下させることなくβ遮断薬と同等の抗不整脈作用を示した。一方、Epac1の遺伝子欠損マウスでは野生型よりAFの持続時間が短縮されていたことからAF発症におけるEpac1の重要な役割が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Adenylyl cyclase (AC) and Epac, a target molecule of cAMP, play critical roles in beta-adrenergic receptor (β-AR) signaling in heart. The usefulness of β-AR antagonist (β-blocker) for the treatment of catecholamine-induced AF and ventricular arrhythmias is established. However, even low dosage of β-blockers exert negative-inotropic effect and may cause a deterioration of heart function. We found that vidarabine, an anti-herpesvirus agent, is a selective inhibitor of cardiac AC subtype. Here, we evaluated the anti-arrhythmic effect of vidarabine using our AF model, in which the duration of AF is strikingly elongated by noradrenaline, and a previously established model of ventricular arrhythmias.

Results indicate that vidarabine prevents catecholamine-induced AF and ventricular arrhythmias without deterioration of heart function. On the other hand, the AF duration of Epac1 gene-knockout mice was shorter than that of wild-type mice, suggesting that Epac1 plays an important role in AF.

研究分野：分子細胞生物学

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

交感神経ベータアドレナリン受容体 (-adrenergic receptor: -AR) シグナルは心臓の機能調節に極めて重要な役割を果たす。

-AR は 3 量体 G タンパク質の サブユニットを介してアデニル酸シクラーゼ (adenylyl cyclase: AC) を活性化する。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 (exchange 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、心臓の変時性および変力性を増強させる。一方、-AR シグナルの過剰および/または慢性的な活性化は心筋細胞を傷害し、不整脈や心不全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依然として不明な点が多い。

本研究では、心臓に優位に発現する AC5 サブタイプならびに Epac1 サブタイプに着目した。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有することが明らかとなった。また、Epac1KO マウスも 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高い抵抗性を示した。これらのことから、過剰な交感神経活性化等による心筋障害ならびに心不全の発症において、AC5 と Epac1 の両者がリンクして重要な役割を果たしている可能性が推測された。心不全のみならず、心房細動 (atrial fibrillation: AF) や心室性不整脈の発症においても -AR シグナルの異常な活性化が原因になると考えられているが、AC5 や Epac1 の役割については不明である。

交感神経活性の異常亢進を誘因とする心不全や不整脈の治療における -AR アンタゴニスト (遮断薬) の有効性はよく知られているが、遮断薬に認められる導入時の心機能抑制や持続的な肺機能抑制が問題となる。とりわけ、心機能が低下しており、肺気腫などの合併症が多い高齢者に対する遮断薬の処方が困難であった。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遮断薬よりも上記の副作用が少ないことが予想される。我々は心臓型 AC 阻害に必要なフ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、約 85 万種類の化合物から抗ヘルペス薬のビダラビン (商品名: アラセナ A, 持田製薬) を心臓型 AC 選択的阻害剤の候補の 1 つとして発見した。

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について検討する。本研究では、マウスを用いた実験系により、心臓型 AC 選択的阻害剤であるビダ

ラビンの抗不整脈作用を解析する。また、Epac1 遺伝子欠損マウスを用いて不整脈における Epac1 の役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 心房細動モデルによる解析

これまでに、経食道心房バーストペーシングによりマウスに一過性の AF を誘発する実験法が報告されている。我々は既存の方法に改変を加えて、より持続時間の長い AF を発症させるマウス実験系を確立した。すなわち、事前に交感神経物質ノルアドレナリンを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ことにより 10 分程度の一過性 AF が発症するモデルを構築した。本実験系を用い、以下の 2 項目について解析を行った。

ノルアドレナリン刺激下 / 非刺激下の両方について、ビダラビンの AF 持続時間短縮効果を解析した。

Epac1KO マウスのノルアドレナリン非存在下での AF 持続時間を野生型マウスと比較検討した。

(2) 心室性不整脈モデルによる解析

Calsequestrin2 (Casq2) は心臓の筋小胞体内に存在するカルシウム結合タンパク質の 1 つであり、心筋の興奮収縮連関において重要な役割を果たすことが知られている。Vanderbilt 大学の Knollmann 博士らは、Casq2 遺伝子欠損 (Casq2KO) マウスを確立し、心室性不整脈のモデルマウスとして報告した。我々は既報に従い、Casq2KO マウスにイソプロテレノール (isoproterenol: ISO) を投与することにより心室性不整脈 (premature ventricular contraction: PVC) を誘発し、ISO 投与後 20 分間に出現した PVC 数を計測した。本実験系を用い、ビダラビンによる PVC 抑制効果を検討した。

(3) 心臓エコー検査による解析

心臓エコー検査によりマウスの心機能 (左室駆出率) を評価し、心機能に与えるビダラビンの影響を検討した。

(4) AC アッセイによる解析

我々は、AC5 サブタイプが心室と脳の線条体に優位に発現していることを既に報告している。今回、マウスの各臓器の AC 活性に対するビダラビンの阻害効果を比較検討した。野生型マウスの各臓器 (線条体、肺、心房、心室、肝臓、腎臓、膀胱) から、膜タンパク質を精製した。続いて精製した各臓器の膜タンパク質標品を用い、フォルスコリン刺激下でビダラビンの AC 活性阻害効果を解析した。

4. 研究成果

ビダラビンは遮断薬であるメトプロロールと同様、マウスに誘発した AF の持続時

間を有意に短縮した。また、ピダラピンは ISO により Casq2KO マウスに誘発した PVC 数を有意に減少させた。ピダラピ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、ピダラピン投与群では心機能の低下が認められなかった。これらのことから、ピダラピンは 遮断薬に見られる心機能低下をきたすことなく AF や心室性不整脈を抑制しうる可能性が示された。

ピダラピンは心臓（心房および心室）の AC 活性を他の臓器（肺、肝臓、腎臓、膀胱）よりも強く阻害した。このことから、ピダラピンは 遮断薬で認められる肺への副作用が少ないことが予想された。

超高齢社会を向かえるわが国において、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使用できる不整脈治療薬の開発は医療における急務の課題の1つであると考えられる。本研究の結果から、ピダラピンに代表される心臓型 AC 選択的阻害剤は上記の要求を満たす有望な不整脈治療薬の候補となりうる事が明らかとなった。

一方、Epac1KO マウスでは AF の持続時間が野生型と比較して有意に短縮されており、AF 発症において Epac1 が重要な役割を担っていることが示唆された。このことから、Epac1 が不整脈治療の新たな分子標的となる可能性が考えられた。

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5件)

Tsunematsu T, Okumura S, Mototani Y, Ohnuki Y, Jin H, Cai W, Suita K, Sato I, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Fujita T, Ishikawa Y

Type 5 adenylyl cyclase is preferentially coupled to β_1 -adrenergic receptor subtype in cardiac myocytes.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, **458**, 531-535, 2015.

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.149.

Kamide T, Okumura S, Ghosh S, Shinoda Y, Mototani Y, Ohnuki Y, Jin H, Cai W, Suita K, Sato I, Umemura M, Fujita T, Yokoyama U, Sato M, Furutani K, Kurachi Y, Kitano H, Ishikawa Y

Oscillation of cAMP and Ca^{2+} in cardiac myocytes: a systems biology approach. *J. Physiol. Sci.*, 査読有, **65**, 195-200, 2015.

doi: 10.1007/s12576-014-0354-3.

Ohnuki Y, Umeki D, Mototani Y, Jin H, Cai W, Shiozawa K, Suita K, Saeki Y, Fujita T, Ishikawa Y, Okumura S

Role of cyclic AMP sensor Epac1 in masseter muscle hypertrophy myosin

heavy chain transition induced by β_2 -adrenoceptor stimulation.

J. Physiol., 査読有, **592**, 5461-5475, 2014.

doi: 10.1113/jphysiol.2014.282996.

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, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, and Ishikawa Y

Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stresses. *J. Clin. Invest.*, 査読有, **124**, 2785-2801 2014.

doi: 10.1172/JCI64784.

Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Jin M, Cai W, Jin H, Fujita T, Ichikawa Y, Suita K, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, and Okumura S Pharmacological stimulation of type 5 adenylyl cyclase stabilizes heart rate under both microgravity and hypergravity induced by parabolic flight.

J. Pharmacol. Sci., 査読有, **119**, 381-389, 2012.

<http://doi.org/10.1254/jphs.12102FP>

〔学会発表〕(計8件)

吹田憲治、藤田孝之、奥村敏、石川義弘
抗ヘルペス薬による心房細動抑制。

第131回日本薬理学会関東部会，横浜市立大学福浦キャンパス（神奈川），2014年10月11日。

Suita K, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Jin H, Jin M, Okumura S, Ishikawa Y

Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents catecholamine-induced atrial fibrillation in mice.

Annual Congress of European Society of Cardiology, Barcelona, Spain, 2014年8月30日-9月3日。

吹田憲治、藤田孝之、蔡文倩、金慧玲、奥村敏、石川義弘

心臓型アデニル酸シクラーゼの選択的阻害剤ピダラピンによる心房細動抑制。第35回日本循環制御医学会総会，九州大学医学部百年講堂（福岡），2014年7月4-5日。

Suita K, Cai W, Jin H, Jin M, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y

Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, attenuates Ca^{2+} leak from sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes and

prevents atrial fibrillation in mice.
第 78 回日本循環器学会学術集会, 東京
国際フォーラム (東京), 2014 年 3 月
21-23 日.

Suita K, Fujita T, Jin H, Cai W,
Okumura S, Ishikawa Y
Vidarabine, a selective cardiac
adenylyl cyclase inhibitor, prevents
ventricular arrhythmias in
Calsequestrin 2 knockout mice.

第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島大学
郡元キャンパス (鹿児島), 2014 年 3 月
16-18 日 (優秀ポスター賞).

吹田憲治, 藤田孝之, 石川義弘
心臓型アデニル酸シクラーゼの選択的
阻害剤ビダラビンによる不整脈治療の
可能性.

生理学研究所研究会, 生理学研究所 (愛
知), 2013 年 11 月 27-28 日.

Suita K, Cai W, Jin H, Jin M, Fujita
T, Okumura S, Ishikawa Y

Inhibitor of cardiac adenylyl cyclase
prevents atrial fibrillation in mice.
HD Physiology the 2nd International
Symposium, MY PLAZA ホール (東京),
2013 年 6 月 28-29 日.

Suita K, Cai W, Jin H, Jin M, Fujita
T, Okumura S, Ishikawa Y

Vidarabine, an anti-herpesvirus agent,
prevents atrial fibrillation in mice.

第 90 回日本生理学会大会, タワーホー
ル船堀 (東京), 2013 年 3 月 27-29 日.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ビダラビ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: PCT 国際出願

番号: PCT/JP2012/069540

出願年月日: 2012 年 8 月 1 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吹田 憲治 (SUITA KENJI)

横浜市立大学・医学研究科・特任助手

研究者番号: 90569542