

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460658

研究課題名(和文) 抗不整脈薬ベプリジルの有害反応軽減法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to attenuate the adverse effect of anti-arrhythmic bepridil

研究代表者

藤村 昭夫 (Fujimura, Akio)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90156901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗不整脈薬ベプリジルは優れた臨床効果を発揮する反面、QT延長に伴う致死性不整脈を来すことがあり問題となっている。本研究では、亜ヒ酸によるQT延長に対して抑制効果を認める α -リポ酸に着目し、 α -リポ酸は、モルモットモデルにおいてベプリジルによるQT延長を用量依存的に抑制すること、心筋由来培養細胞においてベプリジルによる活性酸素種産生を抑制することを見出した。抗酸化薬 α -トコフェロールにもベプリジルによるQT延長の抑制効果が認められたことから、 α -リポ酸は、少なくとも一部には、抗酸化作用を介してベプリジルのQT延長を抑制すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bepridil, an anti-arrhythmic drug, has beneficial clinical effects, but causes an adverse effect of QT prolongation leading to sudden cardiac death. In this study, we investigated the effects of alpha-lipoic acid (LA) on bepridil-induced QT prolongation, because LA can protect against arsenic trioxide-induced QT prolongation in guinea pigs. We found that LA dose-dependently attenuates bepridil-induced QT prolongation in guinea pigs, and that LA inhibits the formation of reactive oxygen species in H9c2 myocardial cells. Because alpha-tocopherol, an antioxidant, also attenuated bepridil-induced QT prolongation, LA appears to protect against the adverse effect at least through its antioxidant property.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：臨床薬理学 循環器 薬物有害反応 QT延長

1. 研究開始当初の背景

抗不整脈薬であるペプリジルは、心筋細胞の Na⁺、Ca²⁺及び K⁺イオンチャネルを抑制する、すなわち Vaughan Williams 分類のクラス Ia、
、 の作用を併せ持つ抗不整脈薬である。ペプリジルは海外では虚血性心疾患治療薬として用いられているが、わが国では持続性心房細動の洞調律化にも極めて有効であることが示されており、持続性心房細動や頻脈性不整脈の治療薬としても使用されている。しかしながら、ペプリジルを通常量投与した場合には、患者の 10%以上に QT 延長が出現し、1%前後は致死的不整脈を来たすが、現在のところ、ペプリジルによる QT 延長に対する特異的な予防法はない。そのため、ペプリジル投与中は頻回の心電図検査が必要であり、QT 延長が出現した場合には、直ちに休薬の上、入院管理となることが少なくない。

これまでにわれわれは、急性前骨髄球性白血病の標準的治療薬である亜ヒ酸 (As2O3) が、酸化ストレスを惹起することにより培養腎細胞 (ヒト腎初代培養細胞および HEK293 細胞) の細胞障害を誘発すること、および抗酸化作用を有する α -リポ酸は急性前骨髄性白血病細胞株 (HL-60 細胞および NB4 細胞) に対する亜ヒ酸の細胞障害性を減ずることなく、培養腎細胞に対する亜ヒ酸の細胞毒性を軽減させることを明らかにした (Exp Hematol 35:252, 2007)。

また、亜ヒ酸は心毒性のためにしばしば使用が制限されるために、動物を用いて α -リポ酸が亜ヒ酸による心毒性を予防・軽減できるか否かを検討した。その結果、 α -リポ酸の併用によって、亜ヒ酸投与により急性に誘発されるラットの心電図 ST 変化 (J Pharmacol Sci 115:244, 2011) やモルモットの QT 延長 (Eur J Pharmacol 705:1, 2013) が予防・改善された。これは、モルモット単離心室筋細胞を使用したパッチクランプ法によって、 α -リポ酸が亜ヒ酸による緩徐活性型遅延整流性カリウム電流 (IKs) の抑制を速やかに改善したことからも裏付けられた。さらに、 α -リポ酸同様、その構造式中に 2 つのチオール基を有し重金属捕捉作用を持つ中毒治療薬 British Anti-Lewisite (BAL) が、亜ヒ酸誘発性 QT 延長を速やかに抑制したことから、この保護効果のメカニズムの一つには α -リポ酸が亜ヒ酸とキレートする結果、亜ヒ酸の IKs 抑制作用が減弱することが示唆された。一方、亜ヒ酸の慢性投与は心筋細胞における活性酸素種 (ROS) の誘発により QT 延長を惹起すること、抗酸化作用を有するレスベラトロールはこの QT 延長を防止することも報告されている。したがって、ペプリジルが亜ヒ酸同様に IKs に対する抑制、あるいは ROS の生成を介して QT 延長を誘発するのであれば、 α -リポ酸はペプリジルによる QT 延長や致死性不整脈を予防できる可能性は高い。

2. 研究の目的

そこで本研究は、基礎研究により、 α -リポ酸がペプリジルによる QT 延長を軽減するかどうかを検討し、その機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペプリジルの QT 延長作用に対する α -リポ酸の効果

雄性 Hartley モルモットを日本 SLC (浜松市) より購入し、12:12 時間明暗周期、標準飼料自由摂餌・自由飲水下で飼育し、2 週間以上馴化した後に実験に供した。なお、すべての動物実験は自治医科大学動物実験委員会の承認を得て、関連法令等を遵守して実施した。

ウレタン麻酔下にてモルモットの外頸静脈に薬物注入用カテーテルを留置し、心電図計 (PowerLab, AD Instruments) を装着した。

α -リポ酸 (Sigma-Aldrich) は 1 N NaOH に溶解し、HCl を用いて pH 7.4 に調整後、17.5、35、70 mg/kg を 120 分かけてモルモットに静脈内投与した。また、ペプリジルは 10 mg/kg/h を持続静脈内投与した。

(2) ペプリジルの QT 延長作用に対する α -トコフェロールおよび BAL の効果

カテーテルを挿入したモルモットに α -トコフェロール (50、100 または 200 mg/kg) または British Anti-Lewisite (BAL、35 mg/kg) を静脈内投与し、その 120 分後よりペプリジル (10 mg/kg/h) の持続静脈内投与を開始して QT 間隔の変化を調べた。

(3) ペプリジル存在下の ROS 産生、細胞障害、アポトーシスに対する α -リポ酸の効果

ラット心筋由来培養細胞 H9c2 細胞を 96 穴プレートで培養し、ペプリジル (0.1、0.5、1 または 2 μ M) と α -リポ酸 (10 μ M) を添加し、24 時間後に活性酸素種 (ROS) 量、生細胞数、アポトーシス量を評価した。それぞれの評価は、DCF アッセイ、WST-1 アッセイ、カスパーゼ-3 のタンパク定量 (ウェスタンブロット) により行った。

(4) 統計解析

統計解析には GraphPad Prism (ver. 5.0d) を使用した。多群間の比較には一元配置分散分析および二元配置分散分析を用い、特定の 2 群間の比較には Bonferroni テストを用いた。すべての解析において、有意水準は 5%未満とした。

4. 研究成果

(1) α -リポ酸の前投与はペプリジルの QT 延長作用を抑制する

予備検討の結果、モルモットにペプリジル (10 mg/kg/h) を持続静脈内投与すると、少なくとも開始 150 分後までは QT 間隔が徐々に延長することが判明した。また、 α -リポ

酸 (35 mg/kg) をペプリジル投与開始 10 分前に瞬時静脈内投与すると、ペプリジル単独投与時と同様、QT 間隔はペプリジル 150 分後まで徐々に延長した。しかし、その後は QT 間隔は短縮に転じており、 ω -リポ酸の効果発現には時間を要することが示唆された。

そこで、 ω -リポ酸をペプリジル投与開始時刻の 2 時間前から投与直前まで持続投与し、ペプリジルの QT 延長作用におよぼす効果を検討した。その結果、**図 1** に示すように、 ω -リポ酸は単独では QT 間隔に影響することなく、ペプリジルの QT 延長作用を用量依存的に抑制することが明らかになった。

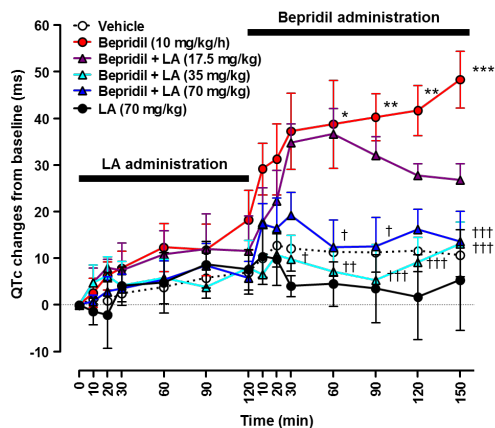


図 1 .QT 間隔におよぼすペプリジルおよび ω -リポ酸 (LA) の影響

$n=4-5$ in each group.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, and *** $P<0.0001$ vs. Vehicle.

† $P<0.05$, †† $P<0.01$, and ††† $P<0.001$ vs. Bepiridil alone.

一方、**図 2** に示すように、 ω -リポ酸はペプリジルの心拍数抑制作用には影響しなかったことから、ペプリジルの主作用である抗不整脈作用は減弱しない可能性が示された。

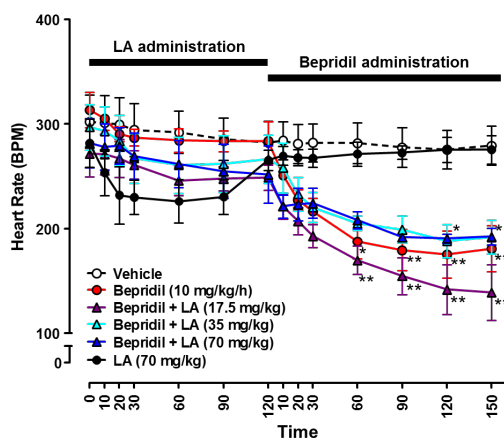


図 2 .心拍数におよぼすペプリジルおよび ω -リポ酸 (LA) の影響

$n=4-5$ in each group.

* $P<0.05$, and ** $P<0.01$ vs. Vehicle.

(2) α -トコフェロールはペプリジルの QT 延長作用を抑制する

前述のように、 ω -リポ酸がペプリジルの QT 延長作用を抑制する機序として、抗酸化作用およびキレート作用が推察される。そこで、同じモデルを用い、抗酸化薬である α -トコフェロールとキレート薬である BAL が、ペプリジルの QT 延長作用におよぼす影響を検討した。その結果、BAL の併用はペプリジルの QT 延長作用に影響しなかった一方、 α -トコフェロールはペプリジルによる QT 延長を用量依存的に抑制した (**図 3**)。これらのことから、 ω -リポ酸は抗酸化作用を介してペプリジルの QT 延長作用を軽減することが示唆された。

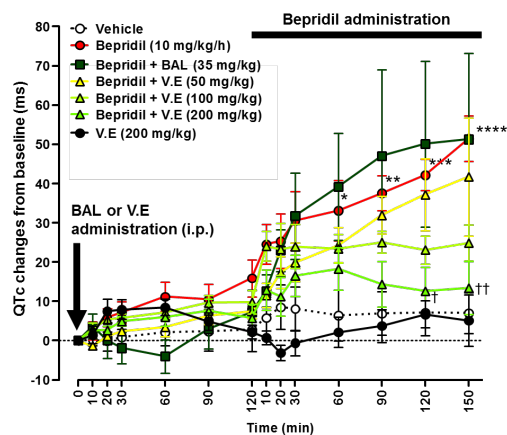


図 3 .ペプリジルの QT 延長作用におよぼす α -トコフェロール (V.E) および BAL の効果

$n=4-7$ in each group.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, and **** $P<0.0001$ vs. Vehicle.

† $P<0.01$, and †† $P<0.0001$ vs. Bepiridil alone.

(3) ω -リポ酸はペプリジルによる ROS 産生を抑制する

ペプリジルが実際に ROS を産生し、 ω -リポ酸の併用がその産生量を抑制するか否かを、*invitro* において検討した。**図 4** に示すように、心筋由来培養細胞において、ペプリジルは濃度依存的に ROS の産生量を増加させた。この増加は、 ω -リポ酸を同時添加することにより有意に抑制されることが確認された。一方、ペプリジル (1 μ M) および ω -リポ酸 (10 μ M) は、生細胞数やアポトーシス量には影響しなかった (データは掲載せず)。

以上のように、本研究は、 ω -リポ酸の前投与によりペプリジルの QT 延長の予防が可能であることを明らかにし、その機序として、 ω -リポ酸によるペプリジルの ROS 産生の抑制が示唆されることを示した。 ω -リポ酸は医療用医薬品としてのみならず、サプリメントとしても一般販売されており、安全性が十分に高いことが知られている。したがって、

本研究の成果は、直ちに臨床試験につなげることが可能である。今後、臨床試験により、
-リポ酸の併用がペプリジルの抗不整脈効果を減じることなく、QT 延長のみを軽減することが明らかになれば、ペプリジル治療の安全性が飛躍的に向上し、持続性心房細動や頻脈性不整脈に苦しむ多数の患者の救済につながることから、本研究の臨床的、社会的意義は非常に大きいものとなる。

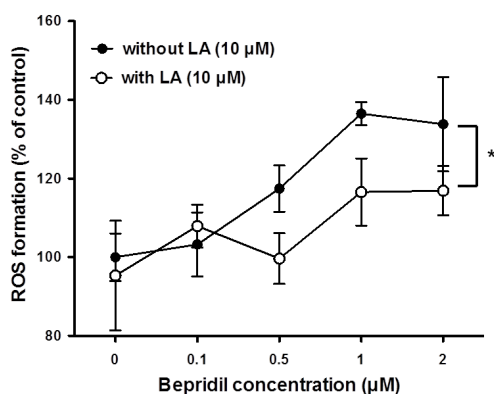


図4 . ペプリジルの活性酸素種 (ROS) 産生作用と -リポ酸 (LA) によるその抑制

$n=4$ in each group.

* $P<0.05$.

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 8 件)

Ando H, Nakano K, Ushijima K, Kurokawa S, Washino S, Hosohata K, Morita T, Fujimura A. Influence of genetic polymorphisms of multidrug and toxin extrusion protein 1 on its mRNA expression in peripheral blood cells. *J Pharmacol Sci* 2016, 131(2):138-40. doi:10.1016/j.jphs.2016.03.002. 査読あり

Fujiwara Y, Tsuchiya H, Sakai N, Shibata K, Fujimura A, Koshimizu TA. Lipopolysaccharide-induced inflammation or unilateral ureteral obstruction yielded multiple types of glycosylated Lipocalin 2. *J Inflamm (Lond)* 2016, 13:7. doi:10.1186/s12950-016-0116-5. 査読あり

Hosohata K, Yoshioka D, Tanaka A, Ando H, Fujimura A. Early urinary biomarkers for renal tubular damage in spontaneously hypertensive rats on a high salt intake. *Hypertens Res* 2016, 39(1):19-26. doi:10.1038/hr.2015.103. 査読あり

Hosohata K, Washino S, Kubo T, Natsui S, Fujisaki A, Kurokawa S, Ando H, Fujimura A, Morita T. Early prediction

of cisplatin-induced nephrotoxicity by urinary vanin-1 in patients with urothelial carcinoma. *Toxicology* 2016, 359-360:71-5. doi:10.1016/j.tox.2016.06.011. 査読あり

Takuma M, Ushijima K, Kumazaki M, Ando H, Fujimura A. Influence of dioxin on the daily variation of insulin sensitivity in mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015, 40(2):349-51. doi:10.1016/j.etap.2015.07.008. 査読あり

Nakano K, Ando H, Kurokawa S, Hosohata K, Ushijima K, Takada M, Tateishi M, Yonezawa A, Masuda S, Matsubara K, Inui K, Morita T, Fujimura A. Association of decreased mRNA expression of multidrug and toxin extrusion protein 1 in peripheral blood cells with the development of flutamide-induced liver injury. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015, 75(6):1191-7. doi:10.1007/s00280-015-2743-6. 査読あり

Washino S, Ando H, Ushijima K, Hosohata K, Kumazaki M, Mato N, Sugiyama Y, Kobayashi Y, Fujimura A, Morita T. Tensirolimus induces surfactant lipid accumulation and lung inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014, 306(12):L1117-28. doi:10.1152/ajplung.00251.2013. 査読あり

Hosohata K, Ando H, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. Urinary Kim-1 is a sensitive biomarker for the early stage of diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diab Vasc Dis Res*. 2014, 11(4):243-250.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤村 昭夫 (FUJIMURA, Akio)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：90156901

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

安藤 仁 (ANDO, Hitoshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：50382875

興水 崇鏡 (KOSHIMIZU Takaaki)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20392491

加計 正文 (KAKEI Masafumi)
自治医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：90214270

志賀 剛 (SHIGA Tsuyoshi)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00277211

(4)研究協力者
なし