

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業  
基礎研究成果の臨床応用推進研究

高齢者に向けた心不全治療薬の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石川義弘

平成22（2010年）年5月

目 次

I. 総括研究報告

高齢者に向けた心不全治療薬の開発 ----- 1

石川 義弘

II. 分担研究報告

高齢者に向けた心不全治療薬の開発（薬理学の検討） ----- 11

奥村 敏

高齢者に向けた心不全治療薬の開発（動物モデルの検討） ---- 15

上地 正美

高齢者に向けた心不全治療薬の開発（化学合成の検討） ---- 18

井上誠一

高齢者に向けた心不全治療薬の開発（心機能効果の検討） ---- 54

南沢享

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 70

IV. 研究成果の刊行物・別刷

# 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

（総括担）研究報告書

高齢者に向けた心不全治療薬の開発研究

主任研究者 石川義弘 横浜市立大学大学院・教授

研究要旨

心不全はすべての心臓病の末期像であり、我が国民の3大死因のひとつである。心不全治療の世界標準指針は慢性的に亢進した交感神経活動の抑制であり、RA系阻害剤とベータアドレナリン受容体遮断薬（ベータ遮断薬）はその代表薬として使用されている。然るにベータ遮断剤導入に当たっての最大の副作用は一過性の心機能抑制であり、とくに高齢者には大きな妨げとなる。さらに呼吸機能抑制もあり、肺気腫などの合併症の多い高齢者では大きな問題である。ベータアドレナリン受容体の働きは細胞内アデニル酸シクラーゼ酵素を活性化し、細胞内cAMP濃度を高めて心機能を調節することであり、ベータ遮断薬の薬理効果はアデニル酸シクラーゼ活性の抑制に他ならない。ベータ遮断薬による呼吸機能抑制の本質は、肺気管支にもベータアドレナリン受容体が発現するため、ベータ遮断薬によって気管支の収縮が起こることである。ベータアドレナリン受容体は3つのサブタイプしかないが、アデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、心臓型とよばれるサブタイプは心臓に特異的に発現する。従って心臓型アデニル酸シクラーゼを選択的に阻害することが出来れば、呼吸器抑制を起こさずにベータ遮断剤と同等の心不全治療ができるはずである。これまでの我々の遺伝子操作動物や薬理実験結果から、心臓型サブタイプを欠損させた動物では、定常状態の心機能低下はないが、心不全など様々な病態生理下ではむしろ心筋保護作用を示すことがわかった。これは心臓型サブタイプがcAMPの基礎産生には関与しないが、交感神経の亢進時に反応するためと考えられる。さらに80万種類以上の薬剤をコンピュータモデルにて検討した結果、心臓型サブタイプを選択的に抑制できる化合物が複数同定された。とりわけ抗ウイルス剤として長年臨床で用いられてきた薬剤の一部に心臓型サブタイプの選択的抑制効果があり、心不全動物モデル実験では心機能保護を有する結果が得られた。このことは抗ウイルス剤をはじめとする心臓型サブタイプ抑制剤が心不全治療薬として有用であることを意味する。本申請は学際的プロジェクトであり、アデニル酸シクラーゼの研究者が化学合成の専門家と協力し、獣医循環器専門医の協力を得て動物実験を行い、心臓型サブタイプの選択的な抑制剤を、高齢者にも安心して使える心不全治療薬として開発することを目的とする。

## 分担研究者氏名・所属機関名及び所

### 属機関における職名

奥村敏 横浜市立大学 准教授

上地正美 日本大学 教授

井上誠一 横浜国立大学 特任教授

南沢享 早稲田大学 教授

## 石川 義弘（研究代表者）

### A. 研究目的

心不全治療の世界標準指針は慢性的に亢進した交感神経活動の抑制であり、レニンアンジオテンシン系阻害剤とベータアドレナリン受容体遮断薬（ベータ遮断薬）はその代表薬として使用されている。然るにベータ遮断剤導入に当たっての最大の副作用は一過性の心機能抑制であり、とくに高齢者には大きな妨げとなる。ベータアドレナリン受容体の働きは細胞内アデニル酸シクラーゼ酵素を活性化し、細胞内cAMP濃度を高めて心機能を調節することであり、ベータ遮断薬の薬理効果はアデニル酸シクラーゼ活性の抑制に他ならない。ベータアドレナリン受容体は3つのサブタイプしかないが、アデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、心臓型とよばれるサブタイプ(5型)は心臓に特異的に発現する。従って心臓型アデニル酸シクラーゼを選択的に阻害することが出来れば、呼吸器抑制を起こさずにベータ遮断剤と同等の心不全治療ができるはずである。本研究は学際的プロジェクトであり、心臓型サブタイプの選択的な抑制剤を、高齢者にも安心して使える心不全治療薬として開発することを目的とする。

### B. 研究方法

我々の同定した心臓型サブタイプ阻害剤（ビダラビン）の個体レベルでの効果を、心臓型サブタイプ

遺伝子操作動物および野生型において検討した。とくに様々な病態モデルを作製して、病態生理下における心臓型サブタイプの薬理効果を検討した。ヒト臨床試験への移行実験として中型動物として心不全モデルの作製を検討した。イヌペーシングモデルは数週間で顕著な心不全を来すことが知られているが、我々は心臓型サブタイプの非げっ歯類での効果を検討するためにイヌペーシング製の心不全モデルの作製をおこなった。また既存の心臓型サブタイプ阻害剤（ビダラビン）だけでなく、より生体適合性の高い新規化合物の設計を行い、合成をおこなった。合成された化合物を、生体組織（脳、心臓、肺など）のアデニル酸シクラーゼ活性に対する抑制効果を検討した。

### C. 研究結果

同阻害剤のイソプロテレノール刺激状態での心機能抑制効果は、野生種では認められないが、心臓型サブタイプ過大発現マウスでは高度であり、またPDE阻害剤に対する反応性は不変であったことから、同阻害剤の生体での作用点は、心臓型アデニル酸シクラーゼ酵素であることが確認された。また3週間のカテコラミン負荷によって、コントロール群では心筋肥大とともに心機能の顕著な低下がみられたが、同阻害剤群では心機能の低下はみられなかった。同様に心筋の繊維化を比較したところ、同阻害剤投与群において顕著な心筋細胞死の減少と、心筋繊維化の抑制が見られた。

マウスなどのげっ歯類だけでなく、ヒトへの臨床試験開始を踏まえて、その前臨床試験として大型動物で心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果を検討する必要があり、そのためのイヌを利用したペーシング誘発型心不全モデルの作製を開始した。モデルイヌ種の検討とペーシング様式の検討を行った結

果、ペースング数の適正化が計られた。さらに既存のビダラビンでは中枢移行性が見られるため、脂溶性を減弱させた誘導体の設計および合成を行った。各臓器の膜標本を用いてアデニル酸シクラーゼ活性に対する抑制効果を検討したところ、ビダラビンに匹敵する抑制効果を持つ化合物が同定された。

## E. 結論

心臓型サブタイプの阻害剤であるビダラビンで心臓保護効果を示すと考えられた。そのような薬剤は既に抗ウイルス剤として市販されており、安全性も確認されているため、臨床応用が可能であるとも考えられる。ただし、ヒト臨床試験を始めるにあたっては、中型動物などを対象とした前臨床試験を行い、治療効果を実証しておく必要があると考えられた。その目的のために、ペースング誘発型心不全モデルは適切であると考えられた。次年度以降に実際の検討実験を開始できる予定である。また新規化合物においてアデニル酸シクラーゼ活性を抑制することの出来る化合物が複数同定された。このことは、心臓を標的にした新規化合物が我々の手で開発できる可能性を示唆する。

アデニル酸シクラーゼは9つのサブタイプを持つため、それぞれのサブタイプが創薬の対象となり、既に世界各国で薬剤開発が行われ、英国では睡眠障害を対象として脳型サブタイプの阻害剤開発が進んでいる。心臓型サブタイプ抑制剤の開発は、高齢者に向けた副作用の少ない薬としてだけでなく、我々の長年の研究成果に裏づけされたコンピュータによる予測技術を含めて、次世代の創薬手法の代表例となることが考えられ、わが国に普及を目指していきたい。

## F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ebina T, **Ishikawa Y**, Uchida K, Suzuki S, Imoto K, Okuda J, Tsukahara K, Hibi K, Kosuge M, Sumita S, Mochida Y, Ishikawa T, Uchino K, Umemura S, and Kimura K: A case of giant coronary aneurysm and literature review. *J. Cardiol.* 53; 293-300, 2009
2. Jiao Q, Bai Y, Akaike T, Takeshima H, **Ishikawa Y**, and Minamisawa S: Sarcalumenin is essential for maintaining cardiac function during endurance exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297; H576-82, 2009
3. Akaike T, Jin MH, Yokoyama U, Izumi-Nakaseko H, Jiao Q, Iwasaki S, Iwamoto M, Nishimaki S, Sato M, Yokota S, Kamiya Y, Adachi-Akahane S, **Ishikawa Y** and Minamisawa S: T-type Ca<sup>2+</sup> channels promote oxygenation-induced closure of the rat ductus arteriosus not only by vasoconstriction but also by neointima formation. *J. Biol. Chem.* 284; 24025-34 2009
4. Hu CL, Chandra R, Ge H, Pain J, Yan L, Babu G, Depre C, Iwatsubo K, **Ishikawa Y**, Sadoshima J, Vatner SF, Vatner DE. Adenylyl Cyclase Type 5 Protein Expression during Cardiac Development and Stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297:H1776-82, 2009

5. Baljinnyam E, Iwatsubo K, Kurotani R, Wang X, Ulucan C, Iwatsubo M, Lagunoff D and Ishikawa Y. Epac Increases Melanoma cell migration by Heparan Sulfate-Related Mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297:C802-13, 2009
6. Sato M, Honda T, Jiao Q, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Lanier SM, and Ishikawa Y. An involvement of activator of G protein signaling 8 on hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes and its interaction with connexin 43. *J. Biol. Chem.* 284:31431-40, 2009
2. 学会発表
1. Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U, Ozawa M, Iwasaki S, Ishikawa I: Oxygenation Promotes Smooth Muscle Cell Migration in the Rat Ductus Arteriosus. BCVS Conference-Molecular Mechanisms of Cardiovascular Diseases. Nevada, 2009, .6.
2. Sato M, Honda T, Jiao Q, Kurotani R, Toyota E, Lanier SM, Ishikawa Y: Requirement of Receptor-Independent G-Protein Activator, Activator of G-Protein Signaling 8 for Hypoxia-Induced Apoptosis of Cardiomyocytes. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 2009, 7.
3. Jiao Q, Sato M, Suzuki H, Kurotani R, Ishikawa Y: Alterations of cardiac connexin 43 under hypoxic stress: roles of Activator of G protein Signaling 8 and Gbetagamma. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 2009, 7.
4. Yokota T, Akaike T, Ozawa M, Yokoyama U, Minamisawa S: T-type calcium channels regulate smooth muscle cell migration, neointimal formation, and oxygen-induced closure in rat ductus arteriosus. The 1<sup>st</sup> International Symposium on Biomedical Science and Engineering Waseda University High-Tech Research Center, Tokyo, 2009, 7.
5. Ozawa M, Akaike T, Katayama A, Yokoyama U, Ishikawa Y, Minamisawa S: Oxygen Promoters Calcium-dependent Smooth Muscle Cell Migration in the Rat Ductus Arteriosus. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, 2009, 7.
6. Katayama A, Yokoyama U, Tang T, Akaike T, Hammond HK, Minamisawa S, Ishikawa Y: Adenylyl Cyclase Type 2 and 6 Differentially Promote Vascular Tone and Remodeling in Ductus Arteriosus. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, 2009, 7.
7. Sato M, Jiao Q, Hiraoka M, Kurotani R, Toyota E, Lanier SM, Ishikawa Y: Roles of Ischemia-inducible G-protein Activator in Hypoxia-Induced Apoptosis of Cardiomyocytes and its Regulation of Connexin 43. American Heart Association's Scientific Sessions, Orlando, 2009, 11.
8. Okumura S, Jin M, Bai Y, Suzuki S, Xuan X, Cai W, Hidaka Y, Kurotani R, Yokoyama U, Ishikawa Y: Epac1 Protects Heart From Lipopolysaccharide-induced Cardiac Dysfunction By Inhibiting The Toll-like Receptor 4 Signaling Pathway. American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, 2009, 11.
9. Minamisawa S, Akaike T, Yokoyama U.

- Oxygenation from hypoxia to normoxia promotes smooth muscle cell migration in the rat ductus arteriosus. The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Section, Sapporo, 2009, 12.
10. Kurotani R, Keduka K, Kimura S: SCGB3A2 reduces the severity of bleomycin-induced lung fibrosis. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, 2009, 12.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

検討中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 2. その他

関連事項として心不全治療における標的としてのアデニル酸シクラーゼについてまとめる。

#### 心不全の治療標的としてのアデニル酸シクラーゼ

慢性心不全におけるベータ遮断剤は、各国のガイドラインにも記載されている標準的治療薬となっている。しかし導入には副作用も多く、同じ標準的治療薬であるRAS系阻害剤に比して使い勝手が悪い。これは臓器選択性や心機能抑制効果によることが大きい。そこで臓器選択性が高く、心機能抑制を持たないベータ遮断剤があればいい。そのひとつの可能性が、心臓型アデニル酸シクラーゼの阻害剤である。心臓型アデニル酸シクラーゼは心臓に高発現し、ベータ受容体の下流に位置する。遺伝子操作動物や薬理実験から、同酵素の活性阻害は心機能低下を起こ

さずに心筋保護作用を示すことがわかっている。さらに長年にわたって使用されてきた抗ウイルス剤の一部に、心臓型酵素の阻害作用があることもわかっている。近年では細胞内酵素サブタイプが創薬標的の新しい潮流となっているが、心不全治療においても同様の可能性があるかもしれない。

創薬の対象がこれまでにない広がりを見せている。これまでの主体であった低分子化合物から、抗体をもちいた生物学的製剤へのシフトがあるかと思えば、古典的な受容体作動薬だけでなく、細胞内酵素サブタイプを標的としたシフトがある。後者の代表例は、間違いなくバイアグラであろうが、それ以外にもPKCなどのサブタイプを標的にした新薬の開発が相次いでいる。つい最近のNature Reviewにまとめられたように、アデニル酸シクラーゼも痲痺症やパーキンソン病、さらには鎮痛剤としての開発がすすんでいる(1)。今回はその中でもすでに一部が実用化されている心不全への応用を、その背景を中心にまとめてみたい。

#### 交感神経と心機能

心機能は心筋収縮力によって規定される。神経内分泌因子による心機能調節の最大因子が、交感神経であることは古典的に知られている。交感神経活動亢進によって、神経シナプス末端から分泌されたノルアドレナリンが、心筋細胞膜上に存在するベータカテコラミン受容体に結合する。ベータカテコラミン受容体は活性型となり、共役する刺激性G蛋白質( $G_s$ )を活性化する。活性化された $G_s$ 蛋白質は、同じく膜結合型酵素であるアデニル酸シクラーゼを活性化する。活性型となったアデニル酸シクラーゼは、ATPを基質としてcAMPを産生する。cAMPは細胞内セカンドメッセンジャーとして、cAMP依存性リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ



A (PKA) を活性化する。そしてこのPKAが、心機能調節に関わる様々な蛋白質をリン酸化することによって、心筋の細胞機能を調節していく(2)。

### 急性心不全とカテコラミン

心不全を心機能の低下した状態と一般的に定義するのなら、急激に低下した心収縮力を回復させてやるのが心不全の治療となる。交感神経刺激が心機能をあげるなら交感神経を刺激してやればいい。つまり、ベータカテコラミン受容体を活性化し、アデニル酸シクラーゼの活性化を経て、心筋細胞内のAMP濃度の上昇とPKAの活性化を引き起こして、心収縮力を増強する。したがって薬物治療としての急性心不全の治療は、このプロセスのどこを活性化しても同様の効果がえられるはずである。一般的にはドーパミンなどのカテコラミン製剤による受容体レベルの刺激、あるいは心筋細胞内のAMP濃度を上昇させるためのフォスフォジエステラーゼ(PDE)阻害剤の使用となる。後者はミルリノンに代表されるように、サイクリックヌクレオチド分解酵素であるPDEを阻害することによって、AMPの産生を変えずに分解を抑制して、結果的に細胞内のAMP濃度を高めようというものである。あるいはアデニル酸シクラーゼの直接刺激剤であるコルホルシンダルパートでもAMP産生が亢進してAMP濃度は上昇する。いずれにせよ心筋細胞内のAMPを上げることが目的となる。

以上の心不全治療薬は、極めてオーソドックスなカテコラミンシグナルの活性化という観点にもとづいた治療薬である。交感神経系のベータカテコラミン受容体やアデニル酸シクラーゼ、さらにフォスフォジエステラーゼはすべての臓器に発現するから、いうなればドーパミンにせよPDE阻害剤、アデニル酸シクラーゼ刺激薬は、すべての臓器の交感神経系のシグナルを増強することになる。心臓における

交感神経刺激効果は比較的前面にでてくるので、強心効果として現れるが、すべての臓器の交感神経シグナルを活性化してしまうのがいいのかは別の論議となってしまう。

### 慢性心不全とカテコラミン

慢性心不全の治療は急性心不全とは治療のベクトルが反対向きとなる。長期にわたって亢進しすぎてしまった交感神経系を、いかに上手に抑制してやるのが治療のポイントとなる。先に述べた交感神経系シグナルの抑制という観点から、RAS系を除けばベータカテコラミン受容体阻害剤、つまりベータ遮断剤がもっとも多く用いられる。

ところがRAS系阻害剤の導入が比較的簡単であるのに比べて、ベータ遮断剤は必ずしも容易でない。慢性心不全では、低下してしまった心機能を交感神経で何とか補っていることを考えると、交感神経刺激を遮断してしまえば、心機能が一過性にせよ低下することは避けられない。そこでベータ遮断剤は極めて低用量からの導入となる。ちなみにカルベジロールの最小容量錠はわが国では1.25mg(アーチスト)であるが、米国では3.125mg(Coreg)である。いかにわが国では低用量に関心があるかわかる。しばらく前まで心不全患者へのベータ遮断剤の導入が入院で行われていたことも考えると、いかに重要な問題であるのかが見えてくる。これ以外にも、ベータ遮断剤には臓器選択性の問題がある。ベータ受容体は肺気管支にも発現するため、気管支喘息や慢性肺気腫の患者にベータ遮断剤を始めるには注意が必要である。慢性心不全患者の多くが虚血性心疾患を持っていることを考えると、喫煙者の割合が極めて高い。そのため慢性心不全と肺気腫の合併は珍しくなく、これもベータ遮断剤を導入する足かせとなっている。

### ベータ遮断剤に代わる交感神経作動薬

急性にせよ慢性にせよ、心不全治療にベータカテコラミン受容体作動薬が全世界的に使われているのは、治療効果がはっきりしているからである。つまり、ベータカテコラミン受容体シグナルの制御によって心不全のコントロールが可能である。しかるに受容体レベルでの作動薬には副作用が多い。ならば、受容体レベルではなく、もっと下流のシグナル分子を標的にすればいいことになる。受容体、G蛋白質、アデニル酸シクラーゼ、PDE、PKAのそれぞれが標的となりうるが、サブタイプが十分にあるのはアデニル酸シクラーゼとPDEに絞られる。PKAやG蛋白質では普遍的発現のため、受容体よりも選択性が悪くなる。アデニル酸シクラーゼとPDEには酵素サブタイプが多数存在し、サブタイプ特異的な作動薬が開発できれば、臓器特異性を高めて副作用の発現を減らすことが出来る。

PDEを標的とするならば、サブタイプとして狙うのはIII型PDEだろう。III型PDEは心臓、血管や血小板に発現し、別々の遺伝子からなる2種類の亜種（AおよびB）をもつ。すでに阻害剤としての利用はすでにミルリノンなどで効果の証明されている急性心不全の治療に広く使用されている。慢性心不全への応用となれば、PDEを刺激してやればよい。心筋細胞内のcAMP濃度を低下させ、ベータ遮断剤と同様の効果が期待できるはずであるが、残念ながら遺伝子操作動物をはじめとする支持データがそろっていない。あるいは出づらいのかもしれない(3)。

アデニル酸シクラーゼを標的とするならば、心臓型アデニル酸シクラーゼだろう。アデニル酸シクラーゼには少なくとも9種類のサブタイプがあり、それぞれに特異的な組織分布と生化学的性状を有する。心臓には多数のサブタイプが発現するが、なかでも5と6型は心臓型と呼ばれ、心臓にとりわけ多く発現することが知られている。6型は酵素活性が極め

て低く、胎児期に発現は最大であり、成長とともに減少する。5型は反対に高い酵素活性を持ち、胎児期に発現が少なく、加齢とともに増加していく。そのため6型を胎児型、5型を成人型アデニル酸シクラーゼとしている(4)。

### 5型アデニル酸シクラーゼの特徴

心不全の患者の大半が中年以上であることを考えるなら、心不全治療の標的とすべきは5型のアデニル酸シクラーゼだろう。もともとアデニル酸シクラーゼ活性は脳と心臓で高いことが知られていたが、脳から初めて分離されたのが1型、心臓からが5型である。脳と心臓に高発現し、脳では特に線条体に多く、末梢では心筋にもっとも多いが、他の組織にも少ないが発現が認められる。生化学的には、他のサブタイプと同様にGsタンパク質によって刺激されるが、Giタンパク質によって抑制されるものは5型を含めて少数である。したがって5型は交感神経で刺激され、副交感神経で抑制される性質をもつ。このことは5型が心臓に高発現し、心機能が自律神経の強い制御を受けることと関連をもつと考えられる。

### 5型アデニル酸シクラーゼの役割

5型サブタイプの欠損動物モデルの性状は、いくつかの研究グループから報告されているが、いずれも心機能低下をきたさないことがわかっている。心臓のアデニル酸シクラーゼ酵素活性の低下はせいぜい30%程度であり、心機能の低下は定常状態ではみられない。これは5型サブタイプが心臓に高発現し、精製標本は高い酵素活性と示すという性質からは意外なものであった。おそらく心臓に高発現はしている、発現の絶対量が少ないために心機能低下をおこさないと考えられる。しかるに欠損動物では高濃度のカテコラミンに対する反応は落ちており、

5型サブタイプは強い交感神経刺激にのみ反応するサブタイプかもしれない(5)。もっとも特徴的な性質は、各種ストレスに対する心筋保護作用である。高圧負荷モデルにおいて心肥大は起こるが、心筋収縮力の低下が極めて少なく、通常みられる心筋細胞死も少ない。つまり心不全をおこさない(6)。慢性カテコラミン負荷によっても心肥大は起こすが、心不全の発症が妨げられる。これは5型欠損により、各種ストレスに対する代償機構としての心肥大は起こすが、非代償期への移行が見られないことを意味する(7)。さらに特徴的なことは、5型欠損モデルは、長期生存性が高まる。加齢にともなう上記ストレスに対する抵抗性だけでなく、酸増加に由来すると考えられる。

心不全患者の多くが高齢者で、高血圧や慢性的な交感神経活動亢進による心不全を発症していることを考えると、5型サブタイプの薬物による抑制は、理にかなっているのかもしれない。

### 5型サブタイプの選択的作動薬の開発

アデニル酸シクラーゼの直接刺激剤であるコルホルシンダルパート(商品名アデール)は、漢方薬に使用されていた植物由来の化合物であるフォルスコリン誘導体として開発されたが、じつは5型サブタイプの選択的刺激である。他のサブタイプに比較して、心臓型サブタイプに対する選択制が極めて高い(8)。アデニル酸シクラーゼは受容体に比べて脱感作やダウンレギュレーションが少ないため、心臓選択的にアデニル酸シクラーゼを選択的に刺激してやることは、急性心不全の治療において、有用であると考えられる。これ以外にもフォルスコリン誘導体を合成して構造活性連関を調べた結果、心臓型だけでなく他のサブタイプへの選択制をきめる側鎖構造が明らかになっている。これにより、肺型サブタイプを選択的に刺激する化合物も合成されている。さらにフ

ィッティング分析と呼ばれるたんぱく結晶構造を利用した既存の解析だけでなく、量子力学的な解析によって、サブタイプ選択制の検討がさらに容易になることもわかってきた(9)。これらの方法を駆使することにより、創薬はさらに発展することになると思われる。

心臓型サブタイプを選択的に刺激できるのなら、選択的な抑制も可能と考えられる。既存のライブラリーからコンピュータ解析手法を用いて、85万種類の化合物から、5型選択的阻害剤が複数同定された。このなかには既に臨床において長年使用されてきた抗ウイルス剤(带状疱疹治療薬)も含まれている。培養心筋細胞を使用した実験では、5型抑制剤による心筋細胞収縮力の低下は見られないが、カテコラミン暴露による細胞死の顕著な現象がみられている(10, 11)。またマウスにおける心筋梗塞モデルでは、5型阻害剤の投与によって、生存率の顕著な上昇と心機能低下および心筋細胞死の低下がみられている。

### おわりに

心不全の病態生理の理解は、過去数十年で飛躍的に進歩したにもかかわらず、人類の最大死因の一つであることは変わらない。米国においてもいまだにDRGにおける最多疾患を占めている。心不全の克服は、すべての循環器専門医の目標であるといっても過言で無いだろう。様々な心不全治療薬がこれまでに開発されてきており、新しい治療薬の使用開始と同時に心不全の病態生理の理解も進んできている。アデニル酸シクラーゼ阻害薬がどのような心不全治療薬となるのかは未知数であるが、心不全の更なる理解と克服の一助となることを願ってやまない。

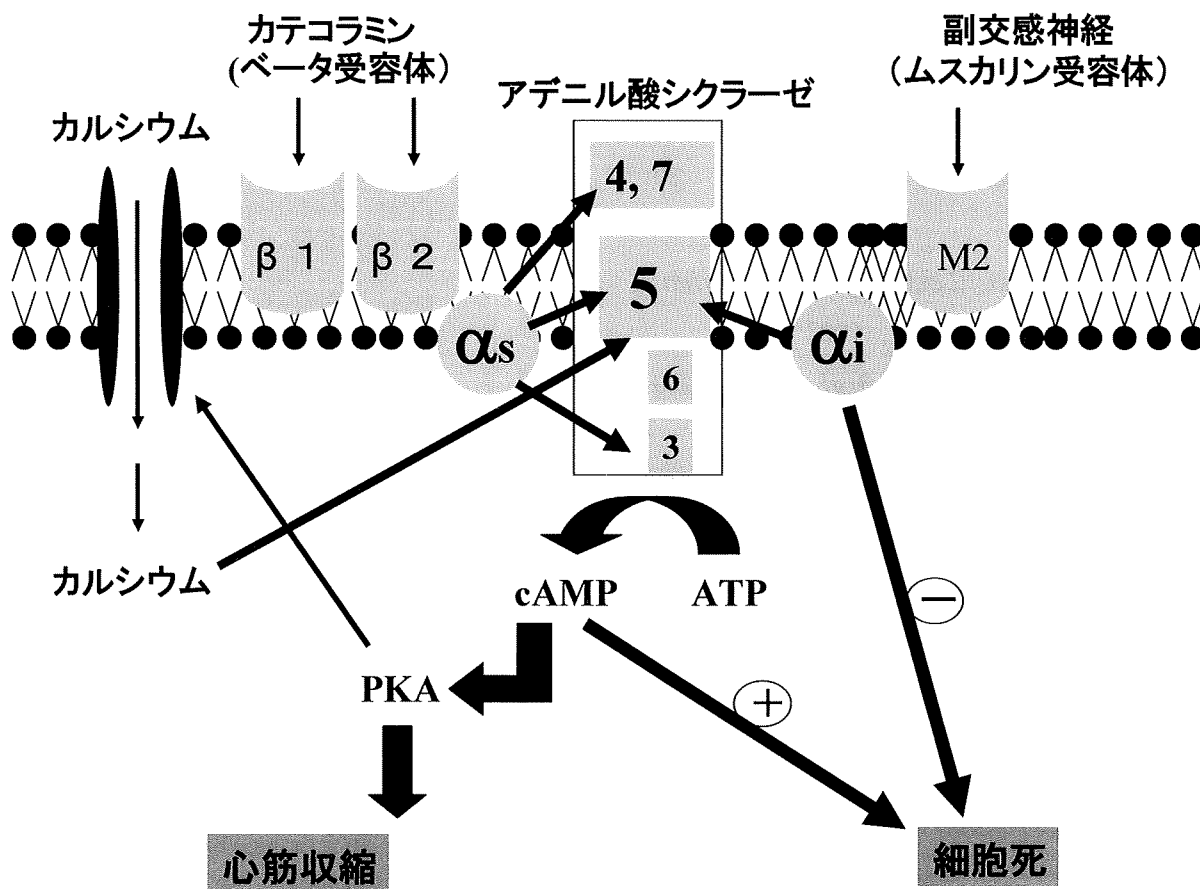
### 文献

- 1) Pierre S. et al. *Nature Reviews Drug*

- Discovery* 8:321–335, 2009
- 2) Ishikawa Y et al. *Circ. Res.* 80: 297–304, 1997
  - 3) Sun B, et al. *Cell. Signal.* 19:1765–1771, 2007
  - 4) Ishikawa Y et al. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41: S1–S4, 2003
  - 5) Okumura S et al. *Circ. Res.* 93: 364–371, 2003
  - 6) Okumura S et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:9986–90, 2003
  - 7) Yan L et al. *Cell* 130:247–58, 2007
  - 8) Toya et al. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 97–108, 1997
  - 9) Eguchi H et al. *Letters in Drug Design & Discovery* 4:434–441, 2007
  - 10) Iwatsubo K et al. *J. Biol. Chem.* 279: 40938–40945, 2004
  - 11) Onda T et al. *J. Biol. Chem.* 276: 47785–47793, 2001
  - 12) Iwatsubo K et al. *Expert Opinion on Therapeutic Target.* , 7:441–451, 2003

図 心筋細胞酸における自律神経調節と cAMP。

交感神経と副交感神経は心筋細胞内 cAMP 濃度を調節して PKA 活性を変化させることにより心機能を制御している。5型サブタイプは心臓型とも呼ばれ成人心臓に高度に発現し、交感神経による刺激と副交感神経による抑制を受けることが知られている。交感神経活動の慢性的な亢進は心筋細胞死を引き起こし、心不全の増悪を招く。5型サブタイプの酵素活性阻害は、結果的に交感神経刺激の低下と副交感神経刺激の最大化を引き起こすこととなり、心筋細胞死の予防が可能になる。



# 分担研究報告

## 奥村敏（研究分担者）

### A. 研究目的

一般にベータアドレナリン受容体は3つのサブタイプしかないが、アデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、心臓型とよばれるサブタイプ(5型)は心臓に特異的に発現する。心臓には5型と6型が、心臓型グループを形成して、他臓器に比較して優位に発現することが知られている。とりわけ6型は胎児心臓に優位に発現し、5型は成人心臓に優位に発現することが知られている。従って5型である成人型の心臓型アデニル酸シクラーゼを選択的に阻害することが出来れば、呼吸器抑制を起こさずにベータ遮断剤と同等の心不全治療ができるはずである。本研究は学際的プロジェクトであり、心臓型サブタイプの選択的な抑制剤を、高齢者にも安心して使える心不全治療薬として開発することを目的し、薬理学的な実験を中心に施行した。

### B. 研究方法

我々の同定した心臓型サブタイプ阻害剤（ビダラビン）の個体レベルでの薬理効果を、心臓型サブタイプ遺伝子操作動物および野生型において検討した。とくに様々な病態モデルを作製して、病態生理下における心臓型サブタイプの薬理効果を検討した。また既存の心臓型サブタイプ阻害剤（ビダラビン）だけでなく、より生体適合性の高い新規化合物の設計を行い、合成された化合物を、生体組織（脳、心臓、肺など）のアデニル酸シクラーゼ活性に対する抑制効果を検討した。酵素活性は膜精製標本を用いて測定した。

### C. 研究結果

同阻害剤のイソプロテレノール刺激状態での心機能抑制効果は、野生種では認められないが、心臓型サブタイプ過大発現マウスでは高度であり、またP

DE阻害剤に対する反応性は不変であったことから、同阻害剤の生体での作用点は、心臓型アデニル酸シクラーゼ酵素であることが確認された。また3週間のカテコラミン負荷によって、コントロール群では心筋肥大とともに心機能の顕著な低下がみられたが、同阻害剤群では心機能の低下はみられなかった。同様に心筋の繊維化を比較したところ、同阻害剤投与群において顕著な心筋細胞死の減少と、心筋繊維化の抑制が見られた。

さらに既存のビダラビンでは中枢移行性が見られるため、脂溶性を減弱させた誘導体の設計および合成を行った。各臓器の膜標本を用いてアデニル酸シクラーゼ活性に対する抑制効果を検討したところ、ビダラビンに匹敵する抑制効果を持つ化合物が同定された。

### E. 結論

心臓型サブタイプの阻害剤であるビダラビンで心臓保護効果を示すと考えられた。そのような薬剤は既に抗ウイルス剤として市販されており、安全性も確認されているため、臨床応用が可能であるとも考えられる。ただし、ヒト臨床試験を始めるにあたっては、中型動物などを対象とした前臨床試験を行い、治療効果を実証しておく必要があると考えられた。また新規化合物においてアデニル酸シクラーゼ活性を抑制することの出来る化合物が複数同定された。このことは、心臓を標的にした新規化合物が我々の手で開発できる可能性を示唆する。

アデニル酸シクラーゼは9つのサブタイプを持つため、それぞれのサブタイプが創薬の対象となり、既に世界各国で薬剤開発が行われ、英国では睡眠障害を対象として脳型サブタイプの阻害剤開発が進んでいる。心臓型サブタイプ抑制剤の開発は、高齢者に向けた副作用の少ない薬としてだけでなく、我々の長年の研究成果に裏づけされたコンピュータによ

る予測技術を含めて、次世代の創薬手法の代表例となることが考えられ、わが国に普及を目指していきたい。

## F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sato M, Honda T, Jiao Q, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Lanier SM, and Ishikawa Y: An involvement of activator of G protein signaling 8 on hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes and its interaction with connexin 43. *J. Biol. Chem.* 284:31431-40, 2009

### 2. 学会発表

Okumura S, Jin M, Bai Y, Suzuki S, Xuan X, Cai W, Hidaka Y, Kurotani R, Yokoyama U, Ishikawa Y: Epac1 Protects Heart From Lipopolysaccharide-induced Cardiac Dysfunction By Inhibiting The Toll-like Receptor 4 Signaling Pathway. American Heart Association Scientific Sessions, Orlando, 2009, 11.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

申請準備中

(このため大学弁理士より、申請内容の詳細は記載が可能でないとの指示を受けている)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

## 心筋細胞のアドレナリン受容体シグナル経路

アドレナリン受容体は G 蛋白結合型受容体であり、自律神経系と心血管系をつないですばやい心機能制御を統合的に行う。しかし慢性的なカテコラミン刺激は病的な心臓リモデリングやアポトーシス、心肥大をおこし心不全へと移行する。心筋細胞は  $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$  および  $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ 、 $\alpha 1D$  の少なくとも 6 つのアドレナリン受容体を発現する。受容体の数から言えば、 $\beta 1$  受容体が優位である。 $\beta 2$  受容体は種特異的であり、年齢および発達段階において発現量が異なる。 $\beta 1$  と  $\beta 2$  受容体は刺激性 Gs 蛋白に結合し、アデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP を産生する。cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) は L 型 Ca チャネル、フォスフォランバン、トロポニン I と C など様々な基質をリン酸化する。リアノジン受容体も PKA の基質であり、リアノジン受容体のリン酸化はヒト不全心および心不全動物モデルで観察される。 $\beta 1$  受容体はマウスの心拍数の制御に重要な役割を担う<sup>2</sup>。また心筋細胞において活性化した  $\beta 2$  受容体は Gs と Gi にカップリングする<sup>6</sup>。成熟マウス心筋細胞では  $\beta 2$  受容体刺激は L 型 Ca チャネルの調節活性を選択的に制御する。しかし、PTX 処理し Gi 機能を消失させた細胞では、 $\beta 2$  受容体刺激は L 型 Ca チャネルのより広範な活性化を示し、フォスフォランバンを強力にリン酸化し、 $\beta 1$  受容体でみられるのと同様に心臓弛緩を促進する。マウス新生仔心筋細胞では、刺激を受けた  $\beta 2$  受容体は Gs と Gi にカップリングし、心筋収縮率をわずかに上げその後長く低下させる。 $\beta 2$  受容体刺激は cAMP をわずかに蓄積させるが、PKA の抑制は心筋細胞の収縮率の上昇低下に影響を与えない。

アデニル酸シクラーゼ (AC) は、カテコラミン刺激を受けた  $\beta$  受容体のシグナルを細胞内へ伝える膜蛋白質であり、9 つあるサブタイプのうち V 型は心



筋細胞において優位な型として存在する。心筋細胞の自律神経調節の中心は $\beta$ 受容体であり、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ が存在することが知られている。しかし、 $\beta 1$ 受容体はカテコラミン刺激に反応してcAMPを産生し、心筋収縮力および心拍数を上げることが知られているが、 $\beta 2$ 受容体の詳細な機能はまだ解明されていない。 $\beta 2$ 受容体は種特異性が高く、例えばラットの新生仔心筋細胞では $\beta 2$ 受容体刺激によるcAMP産生は心筋収縮力と密接な関係にあるが<sup>7</sup>、マウスにおいては $\beta 2$ 受容体刺激によるcAMP産生は小さく、心筋収縮と関連しないと考えられている<sup>4</sup>。また、 $\beta 1$ 受容体はG蛋白質のうちGsのみとカップリングしているが $\beta 2$ 受容体はGs、Gi共にカップリングしており、その効果は単に心筋収縮のみをコントロールしているのではなく心筋細胞のapoptosisにも関与している<sup>8</sup>。さらに $\beta$ 受容体とアデニル酸シクラーゼサブタイプとの関係はほとんどわかっておらず、今回我々はV型ACノックアウトマウスの新生仔心筋細胞を用いて $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体とV型ACとのカップリングについて検討した。細胞膜における $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体の局在性を考えると、 $\beta 1$ 受容体は細胞膜に広く分布するが、 $\beta 2$ 受容体は主にカベオラに存在すると考えられており、V型ACが主にカベオラに存在するとすれば、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 受容体共にカップリングしている可能性がある。しかし我々の実験結果では、マウス新生仔心筋細胞における $\beta 2$ 受容体刺激によるcAMP産生は必ずしも少なくはなかった。さらに $\beta 1$ 受容体刺激では野生型とACVノックアウト型では有意な差を認めたが、 $\beta 2$ 受容体刺激では差を認めなかった。よってV型ACは $\beta 1$ 受容体とカップリングしている可能性が示唆された。これはISO刺激を受けたときに $\beta 2$ 受容体はカベオラ分画から非カベオラ分画へ移動する知見と一致する。さらに百日咳毒素を用いGiを抑制した実験では $\beta 2$ 刺激実験において差を認めなかったことから、少なくともcAMPの

産生においては $\beta 2$ 受容体はGiの影響を受けない可能性が示唆された。さらにカルバコールを用いたムスカリンM2受容体を介する抑制実験ではISO刺激による野生型とノックアウト型の差は濃度依存的に減少することが示された。以上からACVは $\beta 1$ 受容体およびM2受容体と関連すると考えられた。さらにACVノックアウトマウスでは野生型に比べISO刺激による収縮能はあまり変化がないことが分かっており、ACVは心筋における主要アイソフォームではあるが心筋収縮能に大きく関与しない可能性が示唆された<sup>11</sup>。しかしではどのアイソフォームが心筋収縮に関与しているのかはまだ結論が出ていない。

心筋細胞とアポトーシスについて、近年、慢性的な $\beta 1$ 刺激が心筋のアポトーシスを起こすことがわかってきたが、そのシグナルパスウェイは論点となっている。In vitroではこの過程はPKA非依存的なL型カルシウムチャネルを介した細胞内カルシウムの活性化を必要としており、それは成熟マウス心筋細胞においてカルモジュリンキナーゼIIの活性化を起こす<sup>12</sup>。しかし、成熟ラット心筋細胞においてPKAの抑制が $\beta 1$ 刺激のアポトーシス効果を抑制するとも言われている<sup>13</sup>。一方 $\beta 2$ 刺激は抗アポトーシス効果をもっており、これは成熟マウス、ラットの心筋細胞においてGiの $\beta \gamma$ サブユニットを介するとされている。Giシグナルにおける特異的な下流効果器はまだよくわかっていないが、

成熟マウス心筋細胞においてPI3KがGiの $\beta \gamma$ サブユニットによって活性化され、Akt/PKBを活性化してGi介在性の抗アポトーシス効果を起こすとされている<sup>14</sup>。 $\beta 2$ 刺激がp38 MAPKを活性化するが、その抗アポトーシス効果についてははっきりしない。おもしろいことに成熟マウス心筋細胞においてGiの抑制が抗アポトーシス効果からアポトーシス効果に転じることから、Giが抑制されたときの $\beta 2$ からGsへのシグ

ナリングが心筋のアポトーシスを起こすと考えられる。しかし以前から少なくともラット心筋細胞においては $\beta$ 受容体刺激がcAMP/PKAパスウェイを介してアポトーシスを起こすことが知られており13, 15、我々の実験では野生型とACVノックアウト型の心筋を比較したとき圧負荷によるアポトーシス誘発効果は野生型に比べACVノックアウト型で著明に減弱していた。このことからACVを介するcAMPの産生が圧負荷によるアポトーシスの発現に重要であることが示唆された16。以上のことから $\beta$ 1受容体がACVを介してアポトーシス効果を起こすという知見が示唆された。また新生仔心筋細胞においてはISO刺激によるアポトーシス誘発効果は野生型に比べACVノックアウト型で著明に減弱していた。

心肥大について、慢性的な $\alpha$ 1や $\beta$ 刺激は心筋肥大をおこす。 $\alpha$ 1刺激が肥大をおこすパスウェイは複雑でGq, PKC, Rasを介したERKやPI3Kの活性化またはCa<sup>2+</sup>, カルモジュリンを介したカルシニューリンの活性化が関与する。どちらのパスウェイも転写因子の活性化を介した遺伝子発現の変化をおこす。RhoAやRac1も遺伝子発現や細胞骨格に関連して肥大をおこす。 $\beta$ 刺激が心肥大をおこす機序はまだよくわかっていない。 $\beta$ 1および $\beta$ 2で活性化されたGsあるいは $\beta$ 2で活性化されたGiは共に関与する。

## 上地 正美（研究分担者）

### A. 研究目的

心不全治療の世界標準指針は慢性的に亢進した交感神経活動の抑制であり、レニンアンジオテンシン系阻害剤とベータアドレナリン受容体遮断薬（ベータ遮断薬）はその代表薬として使用されている。然るにベータ遮断剤導入に当たっての最大の副作用は一過性の心機能抑制であり、とくに高齢者には大きな妨げとなる。ベータアドレナリン受容体の働きは細胞内アデニル酸シクラーゼ酵素を活性化し、細胞内cAMP濃度を高めて心機能を調節することであり、ベータ遮断薬の薬理効果はアデニル酸シクラーゼ活性の抑制に他ならない。ベータアドレナリン受容体は3つのサブタイプしかないが、アデニル酸シクラーゼには9つのサブタイプが知られており、心臓型とよばれるサブタイプ(5型)は心臓に特異的に発現する。従って心臓型アデニル酸シクラーゼを選択的に阻害することが出来れば、呼吸器抑制を起こさずにベータ遮断剤と同等の心不全治療ができるはずである。本研究ではヒト臨床試験への移行を念頭に、中型動物における心不全モデルを作製し、心臓型アデニル酸シクラーゼ阻害剤の効果を検討することである。

### B. 研究方法

ビーグル犬を用いた高度ペーシング誘発性心不全モデルの作製をおこなった。ハロセン麻酔下にレスピレーターに接続した。左胸部より切開をいれ、タイゴンカテーテルを胸部大動脈および心房に挿入した。圧感受性トランスデューサーは左室心尖部に装着した。右室にペーシング用のワイヤーを装着した。ペーシング装置手術後2週間後に、ペーシング以前の基底状態の心機能を測定した。高速心室ペーシングは毎分240回のスピードで2週間を目やすとして、ペ

ーシングレートは体外に取り付けたコントローラーによる調節を行った。血行動態は覚醒状態において、右側臥位の安静状態でおこなった。

### C. 研究結果

高速ペーシングによって、イヌモデルにおいて心不全が再現された。これは心筋収縮能力の顕著な低下と、心筋拡張障害、および心不全に特徴的な諸臓器におけるうっ血状態として観察された。

### E. 結論

大型動物における心不全モデルの作製は容易でないが、我々の手法を用いることにより、イヌモデルにおける心不全モデルが作製され、アデニル酸シクラーゼ阻害剤の治療効果を判定できる可能性がある。

### F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表.

なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

#### 1. 関連報告

本研究の関連報告として、僧帽弁閉鎖不全症犬における内因性エリスロポエチン濃度と鉄利用状態、

および運動負荷が犬のレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に及ぼす影響についてまとめる。

#### 僧帽弁閉鎖不全症犬における内因性エリスロポエチン濃度と鉄利用状態

近年医学において、内因性エリスロポエチン濃度が心臓病患者で上昇することが報告されている。また、心臓病患者では貧血がよく認められ、その原因が鉄の利用制限によるものと推測されている。この研究の目的は、僧帽弁閉鎖不全症犬での内因性エリスロポエチンと鉄の利用状態について評価することであった。

#### 【症例および方法】

本研究には、僧帽弁閉鎖不全症犬51頭、健常犬15頭を用いた。僧帽弁閉鎖不全症犬はISACHのステージ分類に基づきIa群(n = 19)、Ib群(n = 11)、II群(n=14)、IIIa群(n=7)に分類した。検査項目は、内因性エリスロポエチン濃度、血清鉄 (Serum iron: Fe)、総鉄結合能 (Total Iron Binding Capacity: TIBC)、不飽和鉄結合能 (Unsaturated Iron Binding Capacity: UIBC)、トランスフェリン飽和度 (Transferrin saturation : TSAT) を測定した。

#### 【結果】

ヘマトクリット値は、健常犬群で $42.6 \pm 4.80\%$ 、Ia群で $44.7 \pm 4.80\%$ 、Ib群で $43.1 \pm 5.10\%$ 、II群で $44.7 \pm 8.91\%$ 、IIIa群で $42.3 \pm 4.44\%$ であり、群間の比較に有意差は認められなかった。ヘモグロビン濃度は健常犬群で $13.9 \pm 1.61$  g/dl、Ia群で $15.5 \pm 1.75$  g/dl、Ib群で $15.3 \pm 1.89$  g/dl、II群で $15.6 \pm 2.87$  g/dl、IIIa群で $17.8 \pm 5.70$  g/dlであり、健常犬群と比較しIIIa群で有意で高値を示した(P < 0.05)。赤血球数は、健常犬群で $5.72 \pm 0.67 \times 10^6/\mu\text{l}$ 、Ia群で $6.50 \pm 0.82 \times 10^6/\mu\text{l}$ 、Ib群で $6.52 \pm 0.52 \times 10^6/\mu\text{l}$ 、II群で $6.57 \pm 1.34 \times 10^6/\mu\text{l}$ 、IIIa群で $6.54 \pm 1.04 \times 10^6/\mu\text{l}$ であ

り、群間の比較に有意差は認められなかった。健常犬群の内因性エリスロポエチン濃度は、 $11.7 \pm 2.04$  mIU/mlであった。僧帽弁閉鎖不全症犬の内因性エリスロポエチン濃度は、Ia群で $16.9 \pm 5.86$  mIU/ml、Ib群で $20.7 \pm 8.56$  mIU/mlおよびII群で $21.0 \pm 9.19$  mIU/ml、IIIa群で $21.5 \pm 5.56$  mIU/mlであった。内因性エリスロポエチン濃度は、健常犬群に比較して、Ib群(P < 0.05)、II群(P < 0.01)、IIIa群(P < 0.05)で有意に高値を示した。血清Feは、健常犬群で $173.3 \pm 42.6$   $\mu\text{g} / \text{dl}$ 、Ia群で $139 \pm 66.3$   $\mu\text{g} / \text{dl}$ 、Ib群で $121 \pm 29.4$   $\mu\text{g} / \text{dl}$ 、II群で $133.2 \pm 42.8$   $\mu\text{g} / \text{dl}$ 、IIIa群で $156.9 \pm 41.7$   $\mu\text{g} / \text{dl}$ であり、群間の比較に有意差は認められなかった。健常犬群の血中尿素窒素濃度は、 $12 \pm 4$  mg/dlであった。僧帽弁閉鎖不全症犬のIa群では $21 \pm 11$  mg/dl、Ib群で $23 \pm 19$  mg/dlおよびII群で $30 \pm 15$  mg/dl、IIIa群で $29 \pm 12$  mg/dlであり、健常犬群に比較して、Ib群(P < 0.05)、II群(P < 0.01)、IIIa群(P < 0.05)で有意に高値を示した。

#### 【考察】

以上の結果より、エリスロポエチン産生に関わる要因が僧帽弁閉鎖不全症により大きく修飾されることが示唆された。

#### 運動負荷が犬のレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に及ぼす影響

ストレスや運動負荷は、心不全を悪化させる要因となる。特に交感神経ならびにレニン-アンジオテンシン-アルドステロン(RAA)系の活性化がその増悪因子であると考えられる。今回、ACE阻害薬を投与した犬への運動負荷が、脈拍数、血圧およびRAA系に及ぼす影響について健常犬を用いて検討した。

#### 【方法】

健常ビーグル犬4頭(雄2頭、雌2頭、年齢3~10歳