

学 位 論 文 要 約

氏 名 Telma Mary Nakata

題 目 Echocardiographic Assessment of Effects of Cyclic
Nucleotides Signaling Regulators in Animal Models of Heart
Failure
(環状ヌクレオチドシグナル調節効果が心不全モデル動物にもたらす影響に関する心エコー評価)

本研究は心不全モデル動物に環状アデノシンーリン酸 (cAMP) , 環状グアノシンーリン酸 (cGMP) を投与した際の心機能に対する効果を評価するため, 病態作成前, 病態作成後, 薬物投与後の心機能の変化を心エコーを用いて評価したものである。心エコーは正確かつ非侵襲的な心機能および血行動態の評価方法であり, 臨床現場において予後の評価や薬物の効果判定に用いられている。

心不全は駆出率の低下 (駆出率が低下した心不全, HFREF, EF > 40%) によって特徴付けられる臨床徴候であり, 左心 (LV) 不全や右心 (RV) 不全により生じ, 心拍出量 (CO) や血管緊張を増加させるための治療が必要となる。しかし, 左心室の駆出率が 40% に満たない患者でも心不全症状を呈することがあり (駆出率が正常な心不全, HFNEF, 左心室の充満圧の増加と心筋弛緩能の変化に起因する肺うっ血が原因と考えられている)。

cAMP や cGMP のような環状ヌクレオチドの伝達を強化することは心不全 (HF) の治療法としての可能性が指摘されており, このことは cAMP や cGMP の作用を強化する様々な機構を研究したいくつかの前臨床試験においても示されている。cAMP は心収縮力を増加させ (変力作用), 心収縮の周波数を増加し (変時作用), 心筋の拡張を改善させる (心筋弛緩) が, 一方で cGMP は一酸化窒素 (NO) に反応して産生され, 強心作用を制御する。cAMP と cGMP 伝達路はともに環状ヌクレオチド加水分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) を含んでおり, cAMP や cGMP の細胞内濃度の調整に重要な役割を果たしている。心臓においては cAMP の加水分解 PDE を制御する作用も cGMP は有しており, cAMP の細胞濃度にも影響を与える。ドブタミンは β -AR 作動薬であり, 細胞内の cAMP とカルシウムの濃度を上昇させることによって心拍出量を増加させるが, ピモベンダンのような PDE 阻害薬は β -AR を介さない独立した機構で cAMP の加水分解を阻害する。

まず, 頻拍誘発性心不全モデル (RVP) によって心係数の減少, 左心および右心充満圧の上昇, 心筋肥厚を伴わない心拡大といった循環動態の変化を引き起こした。その後 RVP を重度心不全へと移行させた。実験 1 では, 健常および頻拍誘発性心不全犬において心エコー検査を実施し, 病態進行に伴う変化や, 心

不全が進行した症例に対するドブタミンの効果的な使用量(2~12 μ g/kg/min)の評価を行った。global radial strain は病態発現後 2 週間後から減少し, global circumferential strain は 5 週間後に減少した。研究終了時には torsional deformation は減少したが, この減少はベースラインにおける測定との有意差は認められなかった。人医療では正常~減少した torsional deformation が報告されており, 中等度~重度な拡張不全との関連性がある可能性がある。侵襲的な血行動態評価は心筋弛緩作用の維持と心収縮力作用の低下を示しており, 健常犬で必要とされる投与量で得られる効果を得るためにはより高用量が必要となる

植物から抽出したモノクロタリンを単回投与した後の病理学的変化には, 肺高血圧症 (PAH) と右心不全を引き起こす右心室の肥厚がある。実験 2 では右心室負荷を惹起した心不全ラットに対して, 28 日間のシルデナフィル(1mg/kg, BID), ピモベンダン (0.15mg/kg, BID), ニコランジル(1mg/kg, BID)の単独および組み合わせ投与を行い, 進行した心不全に対して右心および左心の収縮能および拡張能改善効果を評価した。週ごとに撮られた心エコーでは, 病態惹起 1 週間後から右心における機能不全と形態変化に関連する数値の変化が認められた。心不全が確立した後の cAMP や cGMP 伝達レギュレーターを用いた治療では, 心エコーパラメーターの改善を伴う病態の減弱化が認められた。一般的に右心室の後負荷を減少させるために使用されるシルデナフィルはピモベンダン投与による効果と同等の効果が得られたが, ピモベンダンとニコランジルの組み合わせ投与時には全体的な拡張能においてのみで有意な改善が認められた。しかしながら, 疾患に由来する病態変化は治療を行っても可逆的な改善は示さなかった。

左心室肥厚は収縮不全や拡張不全に繋がることもあり, 最終的には心不全の原因となり得る。心筋肥厚を減少させるために, 肥厚の進行を制御する伝達経路が着目されてきた。しかし, 最近ではこの伝達経路を負の方向に制御する因子が心筋肥厚の治療標的として研究されている。イソプロテレノールは非選択性の β -AR 作動薬で, もし推奨投与量よりも多く投与された場合には肥厚, 心筋壊死, 求心性左心室リモデリング, 左室拡張不全, HFNEF のような組織学的変化の原因となる。最後の研究では, 健常ラットとイソプロテレノール惹起性左心不全ラットにおいて, シルデナフィル (10mg/kg/day)あるいはピモベンダン (0.5mg/kg/day)投与中に 15 日ごとに 3 回にわたってドプラ心エコーおよびストレイン検査を行い, 治療による病気の減弱効果や心筋のリモデリングについて評価した。circumferential および longitudinal ストレインでは心基部および心室中央部の中隔区域における異常な deformation を示し, それぞれの薬による 45 日間の治療によって有意な改善が得られた。しかし, 肥大や心室内の同期

障害は、主にシルデナフィル投与による不整脈イベント（心室早期収縮，心室頻拍，心室細動）と関連して認められた。ピモベンダン投与は心室中隔の運動異常や左心室拡張を減弱させ，収縮能を改善させたが，拡張能は変化しなかった。また，抗不整脈作用は少ないまたは認められなかった。

結論として，cAMP や cGMP レギュレーターの投与効果を心エコーパラメータを用いて評価することは，これまでの研究で長期治療に対する心筋の反応や予後の改善が示唆するだけでなく，診断や治療効果の評価の改善にもつながる可能性がある。2次元心臓ストレインは頻拍誘発性心不全モデルにおける心筋バンドの apical ループに沿った壁運動異常の早期検出に有用である可能性がある。ドブタミン刺激試験は，心不全のある犬で強心および心筋弛緩作用によって心臓の収縮能と拡張能を改善させるためには，正常の心機能を有する犬に対して使用するよりも多くの用量が必要であることを示した。この研究では環状ヌクレオチド加水分解酵素阻害薬（シルデナフィルやピモベンダン）の使用は心臓病モデル動物において心機能を改善させるものの，報告された有害作用を理由に様々な病院の心不全患者における使用は限定的なものとなる可能性がある。加えて，先の研究結果は，cAMP 依存性強心薬の使用は心不全の長期治療には効果的ではないことを示しており，入院や死亡率を増加させる。したがって，これらの有害事象を避けるためには違う作用機序を有する新しい化合物の開発が現在の治療プロトコルを改善させるためには必要である。

学 位 論 文 要 約

氏 名 Telma Mary Nakata
題 目 Echocardiographic Assessment of Effects of Cyclic
Nucleotides Signaling Regulators in Animal Models of Heart
Failure
(環状ヌクレオチドシグナル調節効果が心不全モデル動物にもた
らす影響に関する心エコー評価)

This thesis aimed to evaluate cardiac function in baseline, during disease progress and after administration of cyclic nucleotides (cyclic adenosine monophosphate, cAMP, and cyclic guanosine monophosphate, cGMP) signaling regulators in animal models of heart failure using echocardiography. Echocardiography is an accurate noninvasive method for assessment of cardiac function and hemodynamic measurements which have been associated with prognosis and effectiveness of drug therapy in clinical setting.

Heart failure (HF) is a clinical syndrome characterized by reduced ejection fraction (heart failure with reduced ejection fraction, HFREF, EF <40%) resulting from left ventricular (LV) and right ventricular (RV) failure and requires treatment to enhance cardiac output (CO) and vascular tone. However, patients with LVEF > 40% may manifest signs of HF (heart failure and normal ejection fraction, HFNEF) due to pulmonary congestion resulting from increased LV filling pressures and altered myocardial relaxation.

Augmentation of cyclic nucleotides, cAMP and cGMP, signaling are recognized as potential therapeutic strategies in heart failure (HF) based on several preclinical studies that have investigated various mechanisms to enhance the effects of cAMP and cGMP. cAMP increases force (inotropy), frequency of myocardial contraction (chronotropy) and relaxation (lusitropy) while cGMP is generated in response to nitric oxide (NO) and modulates inotropy. Interrelation of cAMP and cGMP signaling pathways involves the activity of the cyclic nucleotide-degrading enzymes, phosphodiesterases, which are critical regulators of cAMP and cGMP intracellular concentrations. In the heart, cGMP also acts as a regulator

of the activity of cAMP hydrolyzing PDEs and influence the intracellular concentration of cAMP. Dobutamine is a β -AR agonist which increases intracellular levels of cAMP and calcium resulting in enhancement of CO, while phosphodiesterase inhibitors, e.g. pimobendan, act through independent mechanism bypassing β -AR to prevent cAMP hydrolysis.

Initially, the rapid ventricular pacing (RVP) induces hemodynamic changes including cardiac index reduction, RV and LV filling pressures elevation, cardiac dilatation without wall thickening. And latterly, RVP leads to severe heart failure. In the first study, healthy and tachycardia-induced (TI) HF dogs underwent echocardiographic examination to determine changes during disease progression and dobutamine effects in the advanced stage of HF to determine the lowest effective infusion rate (2, 4, 8 and 12 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{ min}^{-1}$). Global radial strain showed reduction since the second week while global circumferential strain showed reduction after fifth week of disease progression follow-up. In the end of study, the torsional deformation was reduced; however, this reduction was not significantly different from baseline measurements. Normalized to reduced torsional deformation has been described in humans and might be related to moderate to severe diastolic dysfunction. Invasive hemodynamic assessment showed preserved lusitropic effects and reduced inotropic effects that required higher doses of dobutamine to produce similar effects of that obtained using same doses in healthy dogs.

Pathological changes after a single injection of monocrotaline, extracted from a plant, include pulmonary arterial hypertension (PAH) and right ventricular hypertrophy which leads to right heart failure. In the second study, right ventricle overload-induced heart failure rats were evaluated after 28 days of sildenafil (1 mg/kg, q 12h), pimobendan (0.15 mg/kg, 12h), and nicorandil (1 mg/kg, q 12h) in single and combined administration in the same doses to determine improvements in RV and LV systolic and diastolic function with the treatment in advanced stage of disease. Echocardiography taken in week basis showed variables related to RV dysfunction and morphological changes since the first week after disease induction. Therapy using cAMP and cGMP signaling regulators after development of HF showed attenuation of disease with improvement of echocardiographic parameters. Sildenafil, commonly used to reduce RV afterload, provided comparable hemodynamic effects to the administration

of pimobendan; however, only generated statistically significant improvement in overall diastolic function when administered in combination with pimobendan and nicorandil. Nonetheless, disease-related pathological changes could not be reverse despite of the therapy.

LV hypertrophy may progress to systolic and diastolic dysfunction and ultimately to HF. Efforts to reduce ventricular hypertrophy has focused on signaling pathways that regulate hypertrophy positively. However, more recently negative regulators of this signaling pathway are under investigation targeting the treatment of myocardial hypertrophy. Isoproterenol, a non-selective β -AR agonist, if administered in higher than recommended dose is related to histological findings including hypertrophy, myocardial necrosis, concentric LV remodeling and diastolic LV dysfunction or HF with normal ejection fraction (HFNEF). In the last study, healthy and isoproterenol-induced left-sided HF rats were evaluated every 15 days for 3 times during sildenafil (dose 10 mg/kg/d) or pimobendan (0.5 mg/kg/d) administration using Doppler echocardiography and cardiac strain to determine the degree of disease attenuation and myocardial remodeling with the therapy. Circumferential and longitudinal strain showed abnormal deformation in basal and mid-ventricular septal segments with significant improvement after 45 days of single administration of both drugs. However, hypertrophy and interventricular dyssynchrony were present in association with arrhythmic events (premature ventricular contraction, ventricular tachycardia, ventricular fibrillation) mostly related to sildenafil administration. Pimobendan administration attenuated septal motion abnormalities, LV dilation and improved systolic function, although diastolic dysfunction remained unchanged, it showed reduced to absent arrhythmogenic effects.

In conclusion, effects of different doses of cAMP and cGMP regulators assessed using echocardiographic variables, which have been suggested predict myocardial response to long-term therapy and improve prognosis in previous studies, may also improve diagnosis and therapeutic effectiveness evaluation. Two dimensional cardiac strain may be useful for early detection of wall motion abnormalities along the apical loop of the myocardial band in RVP-induced HF. Dobutamine stimulation test showed that higher doses than those used in dogs with normal cardiac function are necessary for dogs with HF to enhance systolic and diastolic function

through inotropic and lusitropic effects. In this study, the use of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors (sildenafil and pimobendan), despite of improvements in cardiac function in animal models of cardiac disease, may have limited use in patients with HF of different etiologies due to described detrimental effects. In addition, results of previous studies indicated that the use of cAMP-dependent inotrope agents are not effective in the long-term treatment of HF and are associated with hospitalization and death. Therefore, development of new compounds with different mechanism of action that avoid these adverse effects are essential for improvement of current therapeutic protocols.