

論文要旨

The effects of the phosphodiesterase inhibitor olprinone on global cerebral ischemia

全脳虚血におけるホスホジエステラーゼ
阻害薬オルプリノンの効果

岡山 奈穂子

【序論および目的】

ホスホジエステラーゼ(phosphodiesterase:PDE)阻害薬、オルプリノンは細胞内の cyclic AMP の分解を抑制することで心収縮に陽性変力作用をもたらし、同時に血管拡張作用も発揮する。そのため、臨床では鬱血性心不全の治療薬として用いられている。加えて、オルプリノンには脳の細動脈を拡張し脳血流量を増加させる作用があることも知られている。また、同じ PDE 阻害薬であるシロスタゾールには虚血時の神経細胞に対して保護効果があることが報告されている。オルプリノンの心機能改善と脳血流量増加という二つの効果に加え、シロスタゾールと同様の直接的な細胞保護効果があれば、心肺蘇生後の神経学的予後を改善する可能性があるのではないかと考えられる。そこで今回、我々はラット全脳虚血時のオルプリノンの神経細胞保護効果について検討した。

【材料および方法】

- 1)全身麻酔下にラットの椎骨動脈を焼灼後、総頸動脈を 10 分間遮断し、全脳虚血モデルを作成した。ラットを虚血なしの sham 群、生理食塩水投与群、オルプリノン投与群を濃度別に 3 群 (0.3、3、30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 投与) の計 5 群 (n=6) に分け、各群に虚血中とその前後 15 分間薬剤投与を行った。
 - ① 虚血再灌流後 72 時間で脳をホルマリンで灌流固定し、海馬 CA1 領域に残存する神経細胞数(200 倍 1 視野中)を比較した。
 - ② 生理食塩水投与群、オルプリノン 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 投与群のラットで、薬剤投与終了直後に海馬を採取し、Western blot で cyclic AMP response element-binding protein(CREB) とその活性化をみるために、リン酸化 CREB を測定した。
- 2)胎児ラットの大脳皮質から抽出し培養した神経細胞を、オルプリノン濃度 $10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ の状況下で 4 時間の無酸素、糖欠乏に暴露させ、さらに 24 時間培養し、コントロール群に比しての細胞生存率(%)を評価した。

【結 果】

1) 全脳虚血モデルにおいて、体重、血圧、血液ガス分析、血糖値、体温等に群間の差は認めなかった。

① オルプリノン $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 投与群で 72 時間後に残存した神経細胞数は 49.9 ± 9.2 個で生理食塩水投与群 7.2 ± 3.4 個に比して有意に多かった。

② 生理食塩水投与群、オルプリノン $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 投与群間で、虚血後の海馬における CREB の発現に差はなかったが、リン酸化 CREB の発現は $30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 投与群が生理食塩水投与群の 6.4 倍高かった。

2) オルプリノン投与なしでの細胞生存率は $34.7 \pm 3.7\%$ であったのに対し、オルプリノン最少濃度 $10^{-11} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ での細胞生存率は $57.4 \pm 4.5\%$ で有意に高く、以後、用量依存性に細胞生存率は上昇した。

【結論及び考察】

今回の実験で、ラット全脳虚血モデルにおいてオルプリノンが海馬 CA1 領域の遅発性細胞死を抑制しうること、さらにその効果に cyclic AMP - CREB の伝達経路が関与している可能性を示した。また *in vitro* ではオルプリノンが無酸素、糖欠乏時の神経細胞に対し、用量依存的に直接的保護効果のあることを明らかにした。これらの結果はオルプリノンが神経細胞保護効果を有することを示し、現在の循環作動薬としての効果とあわせて、循環不全から脳虚血を生じた患者においてその神経学的予後の改善に寄与する可能性が示された。

論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医研第	689号	氏名	岡山 奈穂子
審査委員	主査	桑木 共之		
	副査	有田 和徳	山田 勝士	

**The effects of the phosphodiesterase inhibitor olprinone
 on global cerebral ischemia**
 (全脳虚血におけるホスホジエステラーゼ阻害薬オルプリノンの効果)

ホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase: PDE) III阻害薬オルプリノンは、細胞内の cyclic AMP の分解を抑制することで強心作用と血管拡張作用を有し、臨床では循環作動薬として用いられている。加えて、オルプリノンは脳血流増加作用を有することも報告されている。また、同じ PDE III 阻害薬シロスタゾールは直接的な神経細胞保護作用を持つことが確認されている。オルプリノンが心機能改善と脳血流量増加という2つの作用に加え、シロスタゾールと同様な神経細胞保護効果を持つならば、オルプリノンは心肺蘇生後の神経学的予後改善に有用と考えられ、本研究では *in vivo*、*in vitro* において虚血時のオルプリノンの神経細胞保護効果について検討している。

本研究では、1) オルプリノンの神経細胞保護効果の有無を確認するため、4-vessel occlusion 法で作成した10分間のラット全脳虚血モデルに、異なる濃度のオルプリノンを投与し、72時間後の海馬 CA1 領域における遅発性細胞死を比較検討した。2) オルプリノンの神経細胞保護効果のメカニズムを明らかにするため、虚血再灌流後のラットの海馬領域における cyclic AMP response element-binding protein(CREB)のリン酸化の有無を Western blot で確かめた。3) オルプリノンの直接的な神経細胞保護効果の有無を確認するため、ラット胎児脳由来の培養神経細胞を様々な濃度のオルプリノン下で4時間の虚血に暴露し、その保護効果を比較検討した。

その結果、本研究で得られた知見は以下の3点である。

1. ラット全脳虚血モデルにおいて、臨床使用濃度のオルプリノンは CA1 領域の遅発性細胞死を抑制しなかったが、高濃度のオルプリノンは遅発性細胞死を抑制した。
2. 海馬領域における CREB のリン酸化を認めたことより、オルプリノンの細胞保護効果発現に CREB が関与している可能性を示した。
3. 培養神経細胞において、臨床使用濃度より低濃度のオルプリノンが直接的な細胞保護効果を示した。

本研究は、高濃度ではあるがオルプリノンがラットの全脳虚血に対し遅発性細胞死を抑制し、その機序の一つとして cyclic AMP - CREB の伝達経路が関与している可能性を示した。さらに、オルプリノンが直接的な神経細胞保護効果を有することも明らかにした。循環補助と脳血流増加という既知のオルプリノンの効果に加え、投与濃度の問題はあがあるが、オルプリノンが虚血再灌流時の直接的な神経細胞保護効果を有することを *in vivo* および *in vitro* の両面で明らかにしたことは、心肺停止後の脳虚血再灌流障害治療におけるオルプリノンの有用性を示唆している。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 689 号	氏名	岡山 奈穂子
審査委員	主査	桑木 共之	
	副査	有田 和徳	山田 勝士
<p>主査および副査の3名は、平成23年2月8日、学位請求者 岡山 奈穂子 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 海馬が一過性脳虚血によってダメージを受けやすいのはなぜか？ (回答) 海馬 CA1 領域では NMDA 受容体を介した Ca^{2+} の細胞内流入が他の部位に比較し著明であり、このことが細胞に対し傷害的に作用すると考えられる。</p> <p>質問2) vivo では CA1 の細胞をみて、vitro では胎児脳由来の大脳皮質細胞をみているが違いはないのか。vivo で大脳皮質はみていないのか。 (回答) CA1 の錐体細胞に対しての遅発性細胞死抑制作用と、培養した大脳皮質細胞への直接作用については、その作用機序は異なる可能性がある。今回はまず vivo での効果を得たため、次に直接作用を見るべく、入手が容易な大脳皮質の培養細胞を用いた。vivo での大脳皮質は検討していない。</p> <p>質問3) Discussion に BBB を越えにくいとあったが、なぜロリプラムではなくオルプリノンを使用したのか。 (回答) 今回は、臨床で循環作動薬として有用なオルプリノンが、神経細胞保護効果も有しているのではないかとこのことを検討するために実験を行なった。</p> <p>質問4) オルプリノンが神経細胞体に作用した場合の Ca^{2+} の動向は？ (回答) オルプリノンは虚血時に電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介する Ca^{2+} 流入を抑制し、presynapse では cGMP/PKG pathway を介して glutamate の分泌を抑制するとの報告があるため、虚血再還流時には細胞内 Ca^{2+} を低下させる作用があると考えられる。</p> <p>質問5) 全脳虚血モデルは 72 時間生かしているが神経学的評価はできるのか？ (回答) 可能だと考えられるが、今回は行っていない。</p> <p>質問6) リン酸化 CREB は Sham 群とコントロール群では差が出るのか。 (回答) 差が出る可能性はあると考えられるが、今回は検討していない。</p> <p>質問7) リン酸化 CREB、Bcl-2 以下の Bcl-XL や、BDNF は検討しなかったのですか？ (回答) リン酸化 CREB の局在、Bcl-2 の発現や Bcl-XL、BDNF についても今後検討すべき課題と考える。</p>			

質問 8) オルプリノンのフリーラジカル抑制に関して論文はあるのですか？

(回答) 虚血再還流モデルについて動物実験でも臨床データでも、オルプリノンのフリーラジカル抑制作用については報告がある。

質問 9) 実験では虚血前から投与しているが臨床応用するなら直後に投与するのか？

(回答) 虚血後から投与して肝、腎、肺において細胞保護効果が得られたとする報告もある。効果を得るには早期の投与が望ましいと考えられる。

質問 10) 虚血再還流 72 時間後に評価されているが、この 72 時間というのは確立されているのか？その間行動障害は起こったか？

(回答) 全脳虚血モデルとしてポピュラーなラットやマウスではアポトーシスの観察は 72 時間以降での評価が一般的である。虚血後のラットは前に比して攻撃的になる傾向にあった。

質問 11) CA1 のスライドでは $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 投与群も効果がありそうだが？

(回答) 細胞のカウントは薬剤投与量を知らない第 3 者によって行っている。 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 投与群に比べて $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ 群で生存細胞数は若干多い傾向にあったが有意差は認められなかった。

質問 12) vitro の細胞生存率をカウントしたキットとは？

(回答) Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies) を使用し、生存細胞の酵素に反応して発色する試薬を用い生存率を測定した。

質問 13) 遅発性細胞死は種にかかわらず 72 時間後と確立されているのか？

(回答) マウス、ラットについては 72 時間以降での遅発性細胞死が確立されている。また猫、犬、豚、猿においても一過性脳虚血後に買い場に障害が及ぶことは分かっているが、全脳虚血モデルとしては一般的ではない。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。