

論文要旨

Inhibitory effects of edaravone on the production of tumor necrosis factor- α in the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion

(心筋虚血再灌流後の TNF- α 産生におよぼすエダラボンの効果)

鬼丸 俊司

【背景】

ヒドロキシラジカル消去作用を持つエダラボンは、脳梗塞急性期における神経症状や機能障害の改善に用いられている。エダラボンの摘出心における心筋保護作用に関しては、すでに報告されているが、その機序を詳細に解明するには至っていない。腫瘍壊死因子-アルファ (TNF- α) は、心筋層に侵入したマクロファージのみならず心筋自体においても産生されることが指摘されており、虚血再灌流障害を反映するマーカーとしての役割を果たすものと期待される。虚血再灌流障害時には、接着分子 P-セレクトリンが血管内皮細胞上に表出することが報告されている。この P-セレクトリンの表出に TNF- α などの炎症性サイトカインの関与が指摘されている。また、血管内皮細胞の障害は細胞膜に表出した P-セレクトリンの細胞外への放出を増加させることが考えられる。

我々は、ラット心臓の虚血再灌流障害後の心機能に及ぼすエダラボンの効果を評価するため、心機能 (LVDP, \pm dP/dt など) を測定するとともに、心筋中の TNF- α 濃度、灌流液中の P-セレクトリンおよび TNF- α 濃度を ELISA にて測定した。また、梗塞領域を triphenyltetrazolium chloride 染色で評価し、TNF- α の心筋での発現をウエスタンブロットティングにより検討した。

【方法】

- 1) 実験動物：体重 300-400g の Wistar 系雄性ラットの心臓を麻酔下にて摘出し、Langendorff 装置に設置し、modified Krebs-Henseleit buffer にて灌流した。
- 2) 実験プロトコール：摘出心を 20 分間灌流し安定化させた後、40 分間の全虚血を施行しその後 60 分間再灌流した。薬物投与群は、再灌流時に 7.5 mM のエダラボン含有 modified Krebs-Henseleit 緩衝液で 60 分間灌流した。コントロール群は、薬物無添加の緩衝液で灌流した。
- 3) 心機能測定：LVDP、coronary flow、 \pm dP/dt および心拍数を虚血前、再灌流 5、15、30 および 60 分後に測定した。
- 4) 梗塞領域測定：実験終了後に作製した心筋スライスに triphenyltetrazolium chloride で染色し、非染色部位の梗塞領域を NIH-image software で解析した。
- 5) TNF- α の局在：実験終了後、心筋中に TNF- α の存在を免疫組織染色で検討した。
- 6) TNF- α の測定：実験終了後、心筋をホモジナイズし遠心分離して得られた上清中の TNF- α をウエスタンブロットティングおよび ELISA にて測定した。

- 7) P-セレクチンおよび TNF- α の放出反応：虚血前、再灌流 5、15、30 および 60 分後に採取した灌流液中の可溶性 P-セレクチンおよび TNF- α 濃度を測定した。
- 8) 統計処理：one way ANOVA で分散分析し、Fisher's protected least significant test で検定した。

【結果】

(1) 心機能の改善

- 1) LVDP および coronary flow：エダラボン投与群では、再灌流開始後のすべてのポイントにおいてエダラボン非投与（コントロール）群に比べ有意に高値であった。
- 2) $\pm dP/dt$ ：エダラボン投与群の再灌流後の $\pm dP/dt$ は、経時的に上昇(+ dP/dt)あるいは低下(- dP/dt)し、30分後にはプラトーに達した。また、実験中のすべてのポイントにおいてコントロール群に比べ有意差が認められた。
- 3) 心拍数：実験中の全てのポイントにおいて、両群間に差がみられなかった。

(2) 梗塞領域の縮小

エダラボン投与により、再灌流後の梗塞領域が有意に縮小した。

(3) TNF- α 発現抑制作用

- 1) 免疫組織染色法およびウエスタンブロッティング：虚血再灌流後の心筋では、TNF- α は血管内皮細胞と細胞間隙に存在し、エダラボンはこれらの発現を抑制した。
- 2) ELISA：虚血再灌流後の心筋 TNF- α 濃度は、エダラボン投与により有意に低下した。

(4) 灌流液中の可溶性 P-セレクチンおよび TNF- α 濃度

再灌流 60 分後の灌流液中の可溶性 P-セレクチン濃度は、エダラボンの投与により低下し、TNF- α 濃度はエダラボンの投与により低下する傾向にあった。

【考察】

Langendorff 装置に装着したラットの摘出心を用いた全虚血後再灌流障害モデルにおいて、エダラボンは発生した心機能障害を改善し、再灌流後の梗塞領域を縮小させた。我々は、この効果が再灌流時の oxidants 産生能を弱めることにより心筋を保護する ischemic preconditioning の効果に匹敵するのではないかと考える。その理由として、全虚血後の再灌流時に大量に発生したフリーラジカルの除去にエダラボンが効果的に作用し、局所虚血後に比べ心機能障害をより改善した可能性があげられる。また、再灌流後のフリーラジカル産生能の亢進により心筋内の TNF- α が誘導され、血管内皮細胞の P-セレクチン発現が増強すると考えられることから、エダラボンは再灌流後に発生されたフリーラジカルを除去し、TNF- α 発現を抑制したと推測される。再灌流後の TNF- α 産生抑制作用や、血管内皮細胞の P-セレクチン発現抑制、P-セレクチンの放出反応の抑制は、心筋保護作用の役割の一部を担っているものと考えられ、エダラボンが心筋虚血再灌流時に発生する障害から心筋を保護する作用を有することを示す。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	605	号	氏名	鬼丸 俊司
審査委員	主査	鄭 忠 和			
	副査	亀山 正樹		宮田 篤郎	

Inhibitory effects of edaravone on the production of tumor necrosis factor- α in the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion
(心筋虚血再灌流後の TNF- α 産生に及ぼすエダラボンの効果)

ヒドロキシラジカル消去作用を持つエダラボンは、脳梗塞急性期における神経症状や機能障害の改善に用いられている。エダラボンの摘出心における心筋保護作用に関しては、すでに報告されているが、その機序を詳細に解明するには至っていない。

本論文は、Langendorff 装置に装着したラットの摘出心を用い、心臓の虚血再灌流時の心機能を評価するとともに、梗塞領域、心筋における TNF- α の発現および濃度、灌流液中の可溶性 P-セレクトリンおよび TNF- α 濃度を検討することによって、心臓虚血再灌流障害に及ぼすエダラボンの効果を評価することを試みたものである。

本論文で得られた知見は以下の通りである。

(1) 心機能の改善

エダラボン投与群では、再灌流後のすべてのポイントにおいてコントロール群に比べ有意に心機能の改善が認められた。

(2) 梗塞領域の縮小

エダラボン投与により、再灌流後の梗塞領域が有意に縮小した。

(3) TNF- α 発現抑制

虚血再灌流後の心筋では、TNF- α は血管内皮細胞と細胞間隙に存在し、エダラボンはこれらの発現を抑制した。

(4) 灌流液中の可溶性 P-セレクトリンおよび TNF- α 濃度の減少

エダラボンの投与により再灌流 60 分後の灌流液中の可溶性 P-セレクトリン濃度は有意に低下し、TNF- α 濃度も低下する傾向にあった。

Langendorff 装置に装着したラットの摘出心を用いたモデルにおいて、再灌流時のフリーラジカル産生能の亢進は、心筋内の TNF- α 産生を誘導し、血管内皮細胞の P-セレクトリン発現を増強させると考えられる。エダラボンは再灌流時に生じるフリーラジカルの産生や、TNF- α の発現を抑制したと推測された。再灌流後の TNF- α 産生、血管内皮細胞の P-セレクトリン発現および P-セレクトリンの放出反応を抑制することは、心筋保護において重要な役割を担っているものと考えられる。本研究によって、心筋虚血再灌流障害に基づく心機能低下をエダラボンが改善したことから、エダラボンの心機能改善効果が明らかにされた。よって、本論文は、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 605 号	氏名	鬼丸 俊司
審査委員	主査	鄭 忠和	
	副査	亀山 正樹	宮田 篤郎

主査および副査の3名は、平成18年1月12日、学位請求者 鬼丸俊司 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。

質問1) 今回用いた実験方法で、Langendorff装置に装着した心臓は時間的にどの程度正常な機能を有するのか？
 (回答) Sutherland FJらは、虚血再灌流を施行しない場合や薬物の処置を行わない場合には、数時間 (several hours) の実験に耐えうると報告している(*Pharmacol Res* 2000;41:613-27)。また、虚血再灌流の実験において、再灌流60分後までのデータを測定している報告が多いことから、本研究で用いた心臓は十分に機能していたと考える。

質問2) Global ischemiaでは、心臓のどの部位に梗塞が起こるのか？
 (回答) 一部の冠状動脈を梗塞させる regional ischemia の場合は、その支配下の心筋が壊死を起こすことが知られているが、global ischemia においては全体的に梗塞を起こすことから、TTC染色を用いその部位を限定することは難しいと考える。

質問3) 可溶性P-selectinの放出反応は、虚血再灌流障害に直接関与するのか？
 (回答) P-selectinは白血球のローリング現象に関与する接着分子である。P-selectinの発現と可溶性P-selectinの放出には相関関係が認められている。今回の実験は白血球が存在しない実験系であることから、虚血再灌流障害時において内皮細胞に表出したP-selectinの直接の役割は特にないと考えられる。また、可溶性P-selectinの濃度の上昇は、膜上のP-selectinの発現増加を反映していることから、炎症反応のマーカーとしての意義が高いと考える。

質問4) エグラポンはCa²⁺ overloadに直接関与するのか？
 (回答) Ca²⁺ overloadが虚血再灌流障害の要因とする報告があるが、本研究では、細胞内Ca²⁺濃度を直接測定していないため、今後の検討を待ちたい。エグラポンが虚血再灌流障害時のCa²⁺の動態に影響を及ぼすという報告は現在のところなされていない。

質問5) フリーラジカルはTNF-αの産生やP-selectinの発現を直接制御するのか？
 (回答) TNF-αはフリーラジカルのNF-κB活性化作用を介して産生される。一方、P-selectinは炎症性サイトカインなどの刺激により発現が上昇する。したがって、TNF-αやP-selectin発現の増加に、フリーラジカルが関与しているものと考えられる。

質問6) TNF-αの作用を抑制する薬物あるいは物質があるか？あるとすれば、それらは今回の障害に影響を及ぼすか？
 (回答) TNF-αの作用を抑制する物質として、可溶性TNF受容体が考えられる。この可溶性TNF受容体はTNF-αと結合し、TNF-αの作用を抑制すると考えられている。今回用いた実験系で可溶性TNF受容体の効果を検討した報告は現在までのところない。他の心臓虚血再灌流障害モデルでは、可溶性TNF受容体がTNF-αのbioactivityを抑制し、虚血再灌流障害後の梗塞領域を縮小することが報告されている。以上のことから、今回の実験系でも可溶性TNF受容体の投与により虚血再灌流障害が軽減する可能性はあると考える。

質問7) 再灌流の流速が、coronary flowに影響を及ぼすのではないかと？
 (回答) 本実験は、大動脈から逆行性に80 mmHgの定圧灌流をおこなっているため、流速は血管抵抗に反比例する。したがって、今回得られたcoronary flowは心機能の改善を反映していると考えられる。

質問 8) ハイドロキシラジカル以外の他のフリーラジカルスカベンジャーの心筋保護作用についてどのように考えるか？

(回答) 他にフリーラジカルスカベンジャーとして、スーパーオキシド ($\cdot O_2^-$) を抑制する作用を持つスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) があげられる。 $\cdot O_2^-$ は Fenton 反応によりハイドロキシラジカル ($\cdot OH$) になるが、有害作用が強いのは $\cdot OH$ であると考えられている。したがって、SOD による心筋保護作用は $\cdot OH$ 消去作用のあるエダラボンより弱いと推測される。これらフリーラジカルスカベンジャーもまた本研究の結果と同様に心臓虚血再灌流障害を軽減することが知られている。

質問 9) 臨床において、脳梗塞の治療にエダラボンを積極的に使用するが、急性心筋梗塞においても有効と考えるか？

(回答) Tsujita K らは急性心筋梗塞において、再灌流直後の ejection fraction が非投与群に比べ有意に改善され、CK-MB の放出も有意に抑制されたことを報告している (*Am J Cardiol* 2004;94:481-484)。この報告によれば、急性心筋梗塞に対しても有用であると考えられる。しかし、臨床使用されるためには、フリーラジカル消去作用以外の作用、例えば毒性や蓄積性などについての検討も必要であると考ええる。

質問 10) Apoptosis と necrosis のうちいずれが虚血再灌流障害に深く関与しているのか？

(回答) 細胞レベルでは虚血再灌流障害時に DNA 断片化や caspase の活性化などの生じることが報告されており、また TNF- α による apoptosis の誘導が報告されている。これらの報告から apoptosis の関与も示唆されるが、今回の実験は、フリーラジカルによる細胞膜障害・脂質過酸化に基づく necrosis が関与している可能性が高いと考える。

質問 11) Ischemic preconditioning は、脳における ischemic tolerance (虚血耐性) と同じ現象を示すのか？

(回答) Ischemic preconditioning は、短期間の非致死性虚血再灌流を数回繰り返すことで、その後に長期虚血に対する耐性が得られる現象である。短期間の虚血により臓器保護作用が得られるという意味では、脳における ischemic tolerance と同じと考える。

質問 12) 臨床では、LVDP は left ventricular diastolic pressure を意味するが、本実験では developed pressure として用いられているが、通常用いられることなのか？

(回答) Langendorff 法を用いた実験において、left ventricular developed pressure を LVDP と略するのが一般的である。systolic pressure と diastolic pressure の差を developed pressure と定義し、Langendorff 法を用いた実験において心機能評価として頻回に使用されている。

質問 13) 実験時に、心停止や致命的な不整脈が観察されなかったか？TNF- α (サイトカイン) が致死性不整脈に関連していると言われているが、エダラボンはこれに効果があると考えるか？

(回答) 再灌流後に VF (心室細動) や PSVT (発作性上室性頻拍) が発生したが、その時は心機能や coronary flow に影響を及ぼさない濃度のリドカイン (1 回に 0.75mg) にて除細動をおこなった。エダラボン投与群では不整脈の発生回数がコントロール群に比べ少ない傾向にあったが、統計的処理を行っていないため有意差は確認できていない。今回、エダラボンが TNF- α 産生を抑制したことから、TNF- α の産生抑制作用を介して致死性不整脈の発生が抑制された可能性は高いと考える。

質問 14) エダラボンは血管平滑筋弛緩作用を有するか？

(回答) 今回の実験において、coronary flow の低下が抑制された成績を得たことから、エダラボンが血管平滑筋弛緩作用をもつ可能性は高いと考えられる。しかし、エダラボンの血管平滑筋弛緩作用を検討した報告は見当たらない。

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。