

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	バルジニヤム エルデネチメグ
学位論文題目			
<p>Oral pretreatment with ebselen, a glutathione peroxidase like antioxidant, limits myocardial damage and attenuates cardiac dysfunction in ischemia reperfusion (経口前投与によるエブセレンの虚血再灌流時における心筋傷害軽減および心機能障害改善作用に関する研究)</p>			
共著者名: 長谷部直幸、森平雅彦、住友和弘、松坂知行、井澤和真、福澤純、菊池健次郎			
未公表			
研究目的			
<p>エブセレンは、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)様活性を持つセレン含有合成抗酸化物質である。短時間心筋虚血におけるエブセレンの心筋保護効果は報告されているが、その機序の詳細は不明であり、保護効果の長時間持続性、さらに経口投与による心筋虚血に対する有効性は明らかにされていない。そこで、今回我々は家兎の虚血再灌流モデルを用いて、24時間前に経口投与したエブセレンが、虚血イベントに対して心筋保護効果すなわち薬理的プレコンディショニング様効果を示すか否かを明らかにし、その機序を検討するために本研究を行った。</p>			
材料・方法			
1. 実験モデル			
<p>雄性日本白色家兎(3.0-3.5 kg)を pentobarbital(40 mg/kg, iv)麻酔し、人工呼吸器 (Model SB-460-6, Shimano Co, Japan)にて換気を行なった。ヘパリン(5000U iv)投与後、心臓を摘出し、</p>			

Langendorff 法にて Krebs-Henseleit 液(95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)で灌流した。左室内にラテックスバルーンを留置し、左室収縮圧(LVSP)、左室拡張末期圧(LVEDP)から左室発生圧(左室収縮期圧-拡張期圧: developed pressure (DP))を持続的に測定した。バルーンの調節により初期左室前負荷条件として LVEDP を 5 mmHg に設定し、200 回/分で心臓ペースングを行った。

## 2. 実験プロトコール

コントロール群(n=11)では 30 分虚血と 60 分再灌流を行った。家兎は活性酸素種(ROS)の発生源として xanthine oxidase を欠き、また本実験系は主要な ROS 産生源である白血球の存在しない環境であるため、生体に匹敵する酸化ストレス条件を得るため再灌流直後 1 分間に 50 $\mu$ M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を syringe infusion pump にて負荷して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 群(n=11)とした。エブセレン群は 24 時間前に 30 mg/kg を投与した低用量群(E30, n=11)と 100 mg/kg を投与した高用量群(E100, n=11)の 2 群に分け、各群で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 負荷を併用する E30 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(n=11)、E100 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(n=11)を設定して 30 分虚血と 60 分再灌流を行った。

## 3. 各指標の測定方法

血行動態の変化とともに、TTC 法を用いて心筋傷害(梗塞サイズ)を評価し(各群 n=5)、心筋の酸化ストレスの指標として HPLC-ECD 法を用いて心筋 8-OHdG 量を測定した(各群 n=6)。また、抗酸化能の指標として GSH 量、GPx 活性、心筋 Se 含量を測定した(各群 n=6)。各指標は虚血再灌流プロトコール後摘出した心筋で測定したが、エブセレン投与自体による HSP72 の発現変化は、コントロール群(n=3)、E30 群(n=3)、E100 群(n=3)で虚血再灌流前に検討した。

## 成績

### 1) 血行動態の変化

虚血再灌流 60 分後の%DPの回復は、コントロール群で有意に遅延し、 $H_2O_2$  群ではさらなる悪化が認められた。E30、E100 群では有意な回復の改善が認められ、特に再灌流初期の 10 分間における DP の改善が顕著だった。E30 +  $H_2O_2$ 、E100 +  $H_2O_2$  群では  $H_2O_2$  群で認められた DP 回復の悪化が用量依存的に抑制され、エブセレンが心筋 stunning を軽減することが明らかとなった。

### 2) 心筋障害(梗塞サイズ)の変化

心筋障害(梗塞サイズ)を TTC 法を用いて検討した。コントロール  $37.8 \pm 6.2$  に対し E30 群と E100 群では  $12.0 \pm 4.0$ 、 $15.7 \pm 5.7\%$  と有意な軽減効果が認められた。 $H_2O_2$  群の梗塞サイズは  $60.3 \pm 5.8\%$  と有意に増加したが、E30 +  $H_2O_2$ 、E100 +  $H_2O_2$  群では  $34.9 \pm 7.9$ 、 $21.9 \pm 5.6\%$  と用量依存的に有意な抑制が確認された。

### 3) 心筋酸化ストレスの検討

- i) 各群における心筋酸化ストレス状態を 8-OHdG を指標に検討した。心筋 8-OHdG レベルは E30、E100 群で有意に低値を示した。 $H_2O_2$  群では 8-OHdG レベルが有意に増加したが、E30 +  $H_2O_2$ 、E100 +  $H_2O_2$  群では用量依存的に有意に抑制された。
- ii) 心筋 GSH 含量は、E 群において有意な増加が認められた。 $H_2O_2$  群における GSH 含量は有意に減少したが、E30 +  $H_2O_2$ 、E100 +  $H_2O_2$  群で少し認められるものの  $H_2O_2$  単独群より有意に高いレベルに保持されていた。iii) 各群における GPx 活性値の比較では、 $H_2O_2$  群のみならず E30、E100 群でもコントロール群に比し低下が観察された。 $H_2O_2$  群での低下は組織障害の増強と解されるが、E 群での低下はエブセレン自体が GPx 類似の活性を有することによる、競合的拮抗作用を反映する可能性が考えられた。

iv) 心筋中の Se 含有量は、 $H_2O_2$  群でコントロールよりも有意に低下していたが、E 群ではいずれも有意に高値を示した。

#### 4) HSP72 の発現

虚血再灌流前に摘出したコントロール、E30、E100 各群の心筋から western blotting 法にて HSP72 発現量を測定した。エブセレン投与群でコントロールより HSP72 の有意な発現増強が認められた。

### 考 察

24 時間前に経口投与したエブセレンは、虚血再灌流時の心筋梗塞サイズを縮小し、再灌流後の血行動態障害を改善した。さらにエブセレンは、過酸化水素負荷による外因的な酸化ストレス増大環境において GSH レベルを保持し、心筋保護効果を示した。

エブセレンの虚血再灌流心筋保護効果は、過去にラットと犬のモデルで検討されているが、いずれも再灌流時ないし虚血再灌流直前に投与されたものである。経口投与によって、虚血イベントの際に予防的効果もたらされるか否かはこれまで知られておらず、24 時間前1回のみでの投与であっても薬理的プレコンディショニング様効果が認められることを明らかにしたのは本研究が初めてである。

本研究の結果、虚血再灌流後の心筋 GSH 含有量がエブセレン投与群で有意に高値を示すことが明らかとなった。GSH 自体が抗酸化物質でもあり、エブセレン投与によるこの増加は、虚血心筋保護効果の重要な機序の一つと考えられる。一般的に虚血再灌流により GSH の酸化の促進と合成阻害が生じ、心筋 GSH 含有量は減少することが知られている。GSH が高値を保つ機序の可能性としては gamma-glutamylcysteine synthetase および glutathione reductase (GR) などの合成と維持に関わる酵素活性の増強が推定される。gamma-glutamylcysteine synthetase は、AP-1 サイトを有しており、ERK1/2 が AP-1 を活性化することが知られている。現在進行中の培養心筋

細胞を用いた in vitro の検討において、我々はエブセレンが ERK1/2 の活性化を増強することを確認している(データ未提示)。いずれにせよ GSH レベルの保持が、虚血再灌流心筋保護の重要な機序のひとつであると考えられた。

エブセレンは、心筋障害をもたらす ROS の一つである peroxynitrite との反応性が高いことも知られており、in vitro の系では peroxynitrite による DNA の single strand break を抑制することが報告されている。本研究において、エブセレンは DNA の酸化的塩基損傷の産物である心筋 8-OHdG の産生量を有意に抑制した。さらに外因性に投与された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による 8-OHdG の増加を消去することも明らかとなり、エブセレンが虚血再灌流心筋において酸化的 DNA 塩基損傷を軽減する効果を有することは明らかであった。

本研究において、再灌流後の一時的な左室収縮機能の障害、すなわち心筋 stunning に対するエブセレンの改善効果が確認された。現在心筋 stunning の主要な機序として、ROS による心筋障害と Ca overload の二つが想定されている。エブセレンは血小板の IP3 による microsome から Ca 放出を抑制することが報告されている。本研究で再灌流直後1分間の冠灌流液中の free Ca<sup>2+</sup>レベルがコントロール群に比しエブセレン群で有意に高値を示しており、心筋細胞外への free Ca<sup>2+</sup>の流出、すなわち心筋細胞内における Ca overload を抑制する可能性が推定された(データ未提示)。すなわちエブセレンの心筋 stunning の軽減効果は、ROS に基づく心筋障害を抗酸化物質であるエブセレンが軽減したことに加えて、再灌流後の心筋 Ca overload を減弱させた可能性も考慮された。

統計的有意差は無かったものの、エブセレンの高用量群では心筋障害の程度(梗塞サイズ)および心筋 8-OHdG 量の面で、低用量群に比しむしろ保護効果が劣る傾向が認められた。一般的に高用量の抗酸化物質は、反面組織障害性を発揮することが知られており、酸化ストレスの比較的軽い条件では、高用量のエブセレンは障害性を発揮する可能性も否定し得ないと考えられた。しかし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加時の高度の酸化ストレス条件では、エブセレンの効果は、あくまで用量依存的であることが確認された。

薬物動態学的には、エブセレンは投与24時間後に肝あるいは腎から排泄されることが知られている。エブセレンの心筋保護作用が投与24時間後にも存在した事から、エブセレンによる何らかの心筋保護的因子の誘導が考えられる。培養心筋細胞ではエブセレンがストレス蛋白を誘導する事が報告されている。一般に、心筋虚血再灌流では、事前に誘導された熱ショックタンパク(HSP)が、その後の重度の虚血再灌流ストレスによる障害を軽減する事が知られている。本研究では、24時間前のエブセレンの経口投与が in vivo において HSP72 を誘導することを始めて明らかにした。虚血再灌流60分後の心筋において、HSP72 の発現は傷害の高度な心内膜側では各群に差を認めなかったものの、傷害の軽度な心外膜側ではエブセレン投与群で有意に高値を示した。これらのことからエブセレンにより誘導された HSP72 が心筋傷害軽減(梗塞サイズ縮小)と左室機能障害の回復の上で重要な役割を果たすものと考えられた。




#### 結 論

24 時間前に一度経口投与されたエブセレンが、虚血再灌流条件において強力な抗酸化作用を示しながら心筋傷害軽減(梗塞サイズ縮小)と心機能障害の良好な回復、すなわち薬理的ブレコンディショニング様効果をもたらすことをはじめて明らかにした。虚血再灌流におけるエブセレンの心保護効果の機序として、心筋 GSH の保持と HSP72 の誘導が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

#### 参考文献

1. Hoshida S, Kuzuya T, Nishida M et al. Ebselen protects against ischemia-reperfusion injury in a canine model of myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1994;267: H2342-H2347
2. Singh A, Lee KJ, Lee CY et al. Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 1989;80:1795-1804
3. Okubo S, Wildner O, Kukreja R et al. Gene transfer of heat shock protein 70 reduces infarct size in vivo after ischemia/reperfusion in the rabbit heart. *Circulation* 2001;103:877-881

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	バルジニヤム・エルデネツメク
<p>審査委員長 <u>柏柳 誠</u> </p> <p>審査委員 <u>岸省文隆</u> </p> <p>審査委員 <u>菊池健次郎</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Oral pretreatment with obselen, a glutathione peroxidase like antioxidant, limits myocardial damage and attenuates cardiac dysfunction in ischemia reperfusion Erdene Balijinnyam, Naoyuki Hasebe, Masahiko Morita, Kazuhiro Sumitomo, Tomoyuki Matsusaka, Jun Fukuzawa and Kenjiro Kikuchi</p>			
<p>学位論文提出者は、24 時間前に一度経口投与されたエブセレンが、虚血再灌流条件において強力な抗酸化作用を示しながら心筋傷害軽減 (梗塞サイズ縮小) と心機能障害の良好な回復、すなわち薬理的プレコンディショニング様効果をもたらすことをはじめて明らかにした。また、虚血再灌流におけるエブセレンの心保護効果の機序として、心筋 GSH の保持と HSP72 の誘導が重要な役割を果たす可能性を示唆した。</p> <p>今回、この論文をまとめるに当たり、提出者は様々な文献調査から、エブセレンをはじめとするセリン含有薬剤の化学構造とその生化学作用を十分に理解した上で、研究の遂行を行った。このことは、これから新たに出会う薬物の作用を表面だけではなく、構造活性相関を含む化学的な面から検討する能力を有していることを示している。また、循環器のみならず、エブセレンの薬理作用に対する幅広い知識を元にして心筋に対する作用を検討している。このことは、提出者が研究対象のエブセレンの生理作用に関する十分な知識を有していることを示すとともに、幅広い文献的な知識を得る能力を有していることを示している。さらに、エブセレンを臨床的に応用する場合に関して、様々なケースを</p>			

勘案して具体的な処方を考えている。このことは、基礎科学的な研究にとどまらず、研究成果を医学的な成果に結びつける能力を有していることを示している。このように、医学博士として十分な科学的素養、問題解決能力を有していることから、学位論文提出者が本学医学博士の学位を取得する十分な資格を有すると考えられる。