

アデノシン受容体アゴニスト YT-146 の  
虚血/再灌流障害に対する心筋保護作用

Cardioprotective effects of adenosine receptor agonist YT-146  
against ischemia/reperfusion injury

2015 年

笹森 潤

## 目次

緒言 .....	1
第 1 章 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルに対する YT-146 静脈内投与による心保護作用の検討 .....	3
第 1 節 YT-146 急速静脈内投与による冠血流量への影響と、イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルに対する再灌流直前急速静脈内投与による心保護作用の検討 .....	4
1.1.1 実験材料及び方法 .....	4
1.1.1.1 実験動物 .....	4
1.1.1.2 YT-146 静脈内投与による冠血流量に対する影響の検討 .....	4
1.1.1.3 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデル .....	5
1.1.1.4 心筋組織血流量の評価 .....	5
1.1.1.5 心筋梗塞サイズの評価 .....	5
1.1.1.6 血漿中クレアチンキナーゼ活性の評価 .....	6
1.1.1.7 試験プロトコール .....	6
1.1.1.8 統計処理 .....	7
1.1.2 結果 .....	8
1.1.2.1 YT-146 の静脈内投与後の冠血流量及び全身血行動態の変化 .....	8
1.1.2.2 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルに対する YT-146 の再灌流直前急速静脈内投与による心筋保護の検討 .....	9
1.1.2.2-1 YT-146 の血行動態への作用 .....	9
1.1.2.2-3 YT-146 の再灌流 5 分後の心筋組織血流量に対する作用 .....	11
1.1.2.2-4 YT-146 の心筋梗塞サイズへの作用 .....	12
1.1.2.2-5 YT-146 の血漿中クレアチンキナーゼ活性への作用 .....	13
1.1.3 考察 .....	14
第 2 節 <i>In vivo</i> イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルでの YT-146 虚血後持続静脈内投与の心保護作用の検討 .....	15
1.2.1 実験材料及び方法 .....	15
1.2.1.1 実験動物 .....	15
1.2.1.2 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルの作製 .....	15
1.2.1.3 心筋組織血流量、心筋梗塞サイズ、血漿中クレアチンキナーゼ活性の評価 .....	15
1.2.1.4 試験プロトコール .....	15
1.2.1.5 試験除外規定 .....	15
1.2.1.6 統計処理 .....	16
1.2.2 結果 .....	17
1.2.2.1 YT-146 の持続投与 .....	17

1.2.2.1-1 YT-146 の血行動態への効果 .....	17
1.2.2.1-2 YT-146 の心筋組織血流量への効果 .....	18
1.2.2.1-3 YT-146 の心筋梗塞サイズへの効果 .....	19
1.2.2.1-4 YT-146 の血漿中クレアチンキナーゼへの効果 .....	20
1.2.2.2 YT-146 の再灌流直前の急速静脈内投与+再灌流時の持続静脈内投与 .....	21
1.2.2.2-1 YT-146 の血行動態への効果 .....	21
1.2.2.2-2 YT-146 の心筋組織血流量への効果 .....	22
1.2.2.2-3 YT-146 の心筋梗塞サイズへの効果 .....	23
1.2.2.2-4 YT-146 の血漿中クレアチンキナーゼ活性への効果 .....	24
1.2.3 考察 .....	25
小活 .....	26
第2章 ラット摘出心 Langendorff 灌流標本を用いた YT-146 の心筋直接的な保護作用の検討 .....	27
2.1 実験材料及び方法 .....	28
2.1.1 実験動物 .....	28
2.1.2 ラット摘出心 Langendorff 灌流標本の作製 .....	28
2.1.3 灌流液中クレアチンキナーゼ活性の評価 .....	28
2.1.4 試験プロトコール .....	29
2.1.4.1 摘出灌流心臓への YT-146 投与及び虚血/再灌流 .....	29
2.1.4.2 YT-146 の虚血心筋保護作用に寄与するアデノシン受容体サブタイプの関与 .....	29
2.1.4.3 YT-146 の虚血心筋保護作用に対する PKC の関与 .....	29
2.1.5 統計処理 .....	29
2.2 結果 .....	31
2.2.1 YT-146 の虚血前投与による心筋直接的な保護作用の検討 .....	31
2.2.1.1 YT-146 による冠動脈灌流量への影響 .....	31
2.2.1.2 YT-146 による再灌流後の左心室発生圧に及ぼす効果 .....	32
2.2.1.3 YT-146 による虚血/再灌流時の左心室拡張末期圧に及ぼす効果 .....	33
2.2.1.4 YT-146 による再灌流心臓から灌流液中へ遊離したクレアチンキナーゼ活性への効果 .....	34
2.2.2 YT-146 の心筋直接的な保護作用に寄与するアデノシン受容体サブタイプの検討 .....	35
2.2.2.1 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による冠動脈灌流量に及ぼす効果 .....	35
2.2.2.2 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による左心室発生圧に及ぼす効果 .....	36
2.2.2.3 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による左心室拡張	

張末期圧に及ぼす効果 .....	37
2.2.2.4 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による再灌流液中クレアチンキナーゼ活性に及ぼす効果 .....	38
2.2.3 YT-146 の心保護作用に対する PKC の関与 .....	39
2.2.3.1 YT-146 と PKC 阻害薬組合せ投与による冠動脈灌流量への効果 .....	39
2.2.3.2 YT-146 と PKC 阻害薬組合せ投与による左心室発生圧及び左心室拡張末期圧への効果 .....	40
2.2.3.3 YT-146 と PKC 阻害薬組合せ投与による再灌流液中のクレアチンキナーゼ活性への効果 .....	41
2.3 考察 .....	42
小活 .....	45
第3章 ラット虚血/再灌流心臓における YT-146 のミトコンドリア機能への効果 ...	46
3.1 実験材料及び方法 .....	47
3.1.1 実験動物 .....	47
3.1.2 ラット摘出心 Langendorff 灌流標本の作製 .....	47
3.1.3 試験プロトコール .....	47
3.1.4 心筋細胞内 $\text{Na}^+$ 含量の定量 .....	48
3.1.5 ミトコンドリアの単離と $\text{Na}^+$ 含量の定量 .....	48
3.1.6 心筋組織 ATP 及びクレアチンリン酸の定量 .....	48
3.1.7 心筋ミトコンドリア酸素消費速度の測定 .....	49
3.1.8 Skinned fiber 中の $\text{Na}^+$ 濃度の測定 .....	49
3.1.9 統計解析 .....	50
3.2 結果 .....	51
3.2.1 YT-146 処置の左心室発生圧、左心室拡張末期圧及び灌流圧に及ぼす効果 .....	51
3.2.2 YT-146 処置の心筋組織 ATP 及びクレアチンリン酸含量への効果 .....	52
3.2.4 YT-146 処置の心筋内 $\text{Na}^+$ 含量への効果 .....	54
3.2.5 YT-146 処置のミトコンドリア内 $\text{Na}^+$ 含量への効果 .....	55
3.2.6 YT-146 処置の Skinned fiber 中の $\text{Na}^+$ 濃度の評価 .....	56
3.2.7 Sodium lactate 存在下におけるミトコンドリア酸素消費速度に及ぼす YT-146 の効果 .....	57
3.3 考察 .....	58
小活 .....	60
総括 .....	61
謝辞 .....	64
参考文献 .....	65

## 略語

本文中では以下の略語を用いる。

AMI	Acute myocardial infarction
bpm	Beats/min
CF	Coronary flow
CK	Creatine kinase
CrP	Creatine phosphate
CSC	1,3,7-Trimethyl-8-(3-chlorostyryl)xanthine
DBP	Diastolic blood pressure
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropyl xanthine
HR	Heart rate
K <sub>ATP</sub> channel	ATP-sensitive K <sup>+</sup> channel
LAD	Left anterior descending artery
LVDP	Left ventricular developed pressure
LVEDP	Left ventricular end diastolic pressure
LVSP	Left ventricular systolic pressure
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
OCR	Oxygen consumption rate
PC	Ischemic preconditioning
PCI	Percutaneous coronary intervention
PTCA	Percutaneous transluminal coronary angioplasty
PTCR	Percutaneous transluminal coronary recanalization
RMBF	Regional myocardial blood flow
SBFI/AM	Sodium-binding benzofuran isophthalate-acetoxymethyl ester
SBP	Systolic blood pressure
TTC	2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride
Vf	Ventricular fibrillation

## 緒言

我が国での生活様式の変化に伴う心不全患者の増加は、医療費を圧迫する社会問題の一因となっている。心不全の基礎疾患で最多の患者数となるのは、心筋梗塞を含む虚血性心疾患である<sup>1,2)</sup>。虚血性心疾患の中で最も重篤な急性心筋梗塞（AMI）は、主に血栓が塞栓となることで生ずる冠動脈閉塞で誘発される。この患者の救命のため、血栓溶解療法（PTCR）あるいは経皮的冠動脈形成術（PTCA あるいは PCI）等の梗塞領域への再灌流療法が急務となる<sup>3)</sup>。AMIの死亡率は、その発症から再灌流が行われるまでの時間との間に負の相関がある<sup>3)</sup>。心筋虚血が短時間で解除されるうちは、再灌流後の心機能は速やかに回復し、患者の予後も良好である。その一方で、虚血時間がある一定時間以上を経過すると、再灌流を行ったにも関わらず心筋細胞壊死が虚血時よりも促進される結果、心収縮不全が誘発される。このような再灌流後の逆説的な現象は、「虚血/再灌流障害」あるいは単に「再灌流障害」と呼ばれる<sup>4)</sup>。この再灌流そのものが原因となる虚血/再灌流障害による心筋梗塞領域の大きさ（心筋梗塞サイズ）のさらなる拡大が、急性および慢性心不全発症など予後不良の一因となっている<sup>5)</sup>。実際に、AMI患者の心筋梗塞サイズの大きさは同時期に測定した左室駆出率と逆相関し、6ヵ月死亡率とも相関することが報告される<sup>6)</sup>。従って、AMIの治療では急性期の患者の死亡の回避だけでなく、虚血/再灌流障害から心筋細胞を保護する処置が求められている。

虚血/再灌流障害の発症機序には、虚血時の心筋細胞内  $\text{Na}^+$  過剰蓄積（ $\text{Na}^+$  過負荷）による障害<sup>7,8)</sup>、再灌流時に活性化される  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換系及び  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換系を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  過剰蓄積（ $\text{Ca}^{2+}$  過負荷）による障害<sup>9)</sup>、再灌流時の炎症反応亢進と遊走した好中球が発生させる大量の活性酸素種（ラジカル）による障害<sup>10)</sup>、再灌流後の微小循環障害のため心筋組織血流が極度に低下する no-reflow 現象がある<sup>11)</sup>。特に、no-reflow 現象の発症を抑制することは、心筋細胞の生存およびその収縮弛緩能の維持のため特に重要と考えられている<sup>12-14)</sup>。これら虚血/再灌流障害の抑制、つまり AMI の予後を改善および慢性心不全の発症を回避するために、今までに様々な薬物の開発が試みられている<sup>15-17)</sup>。しかしながら、未だ決定的な治療薬は創出されておらず、新薬の開発が続けられている。

アデノシンは生体のほとんどの細胞で産生されるプリンヌクレオシドで、かつ細胞膜上の4種類のアデノシン受容体（ $\text{A}_1$ 、 $\text{A}_{2\text{A}}$ 、 $\text{A}_{2\text{B}}$  および  $\text{A}_3$ ）のリガンドとして様々な生理活性を発揮する<sup>18)</sup>。アデノシン投与により観察される生理作用は主にアデノシン  $\text{A}_1$  あるいは  $\text{A}_{2\text{A}}$  受容体を介したものである。例えば、アデノシン  $\text{A}_1$  受容体を介する反応には心機能抑制（心収縮力低下及び心拍数減少）<sup>19,20)</sup>、腎血流量・尿量減少（輸入細動脈の収縮及び輸出細動脈の拡張）<sup>21,22)</sup>、交感神経末端からのカテコラミンの放出抑制<sup>23)</sup>及び腎からのレニン放出抑制<sup>24)</sup>が、アデノシン  $\text{A}_2$  受容体を介するものに血管平滑筋弛緩（降圧作用）<sup>25)</sup>、血小板凝集抑制<sup>26)</sup>、好中球活性化抑制（活性

酸素種産生抑制)<sup>27)</sup>及び鎮静・催眠作用(中枢神経系抑制)<sup>28)</sup>がある。アデノシンは心筋の虚血/再灌流障害を軽減させることが知られ、各種実験動物を用いた心筋虚血/再灌流障害モデルで心保護効果が示されている<sup>29-31)</sup>。しかしながら、アデノシンの生体内での半減期は非常に短く<sup>32)</sup>、虚血/再灌流障害から心筋組織を保護するには、高用量かつ長期間のアデノシン投与が要求される<sup>33,34)</sup>。

YT-146 (Fig.1) はアデノシンの 2 位に炭素-炭素結合で置換基が導入された新たなアデノシン受容体アゴニストで、*in vivo* 条件下でアデノシンデアミナーゼへの耐性を示す長時間作用型薬物である<sup>35,36)</sup>。そこで、本研究では、アデノシン受容体アゴニスト YT-146 の心筋虚血/再灌流障害に対する心筋保護薬としての可能性について検討した。

本研究での各章の概要を以下に示す。

第 1 章 YT-146 の *in vivo* 心筋虚血/再灌流障害モデルに対する心保護作用について評価するため、麻酔開胸下のイヌ心筋虚血/再灌流障害モデルを用いた。実験では、AMI 患者に対する PCI 施行時の虚血/再灌流障害を抑制する薬物としての臨床応用を想定し、YT-146 投与は虚血中あるいは再灌流開始時に行い、その有効性について検討した。

第 2 章 YT-146 の虚血心筋保護効果の機序について検討するため、Langendorff 灌流したラット摘出心に虚血/再灌流を行った。本実験では、虚血心筋保護に関与するアデノシン受容体サブタイプについて検討した。

第 3 章 YT-146 の虚血/再灌流障害に対する心筋保護の機序を明らかにするため、ミトコンドリア機能への薬物の効果について検討した。

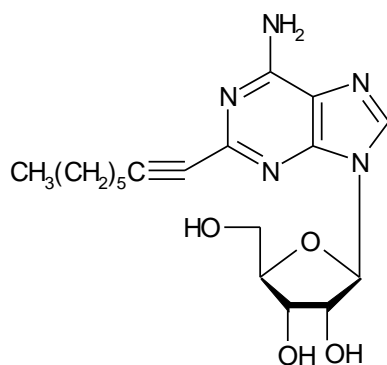


Fig.1. Chemical structure of YT-146

## 第 1 章 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルに対する YT-146 静脈内投与による心保護作用の検討

AMI 患者に対する再灌流療法施行時に問題となるのが、再灌流時に誘発される不整脈及び no-reflow 現象等の虚血/再灌流障害である<sup>4,5)</sup>。AMI 治療では、特に虚血領域への血流の再供給、すなわち再灌流後の良好な冠血流が no-reflow 現象を回避するので、心筋梗塞の予後を改善する最大の素因となる<sup>37)</sup>。アデノシン及びベラパミル等の冠動脈血流を増加させる薬物は、PCI 施行時の no-reflow 現象防止に有効である<sup>38,39)</sup>。これら薬物は強力な血管拡張作用を発揮するので、全身性の降圧による副作用を回避するため、カテーテルを介して冠動脈内に直接投与されている<sup>38-40)</sup>。ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャンネルの開口により冠微小血管を拡張させるニコランジルも、PCI 施行時に使用すると心筋組織への血流増加を介して心機能を改善する<sup>41)</sup>。このように、再灌流時に冠動脈及び冠微小血管の血流を改善する薬物は虚血/再灌流障害から心筋を保護するために有用と考えられる。

アデノシン  $A_2$  受容体アゴニストとして開発された YT-146 は 1 から 30 ng/kg の冠動脈内投与で、冠血流を用量依存的に増加させることが報告されている<sup>35)</sup>。この YT-146 の冠血流増加作用は再灌流性の no-reflow 現象の防止に有用と推測される。<sup>37)</sup> 本章第 1 節では、心筋虚血終了時、すなわち再灌流直前に YT-146 を静脈内に急速投与し、再灌流直後の冠血管拡張作用による心筋組織血流量増加が心筋梗塞サイズの抑制に寄与し得るか否かを検討した。実験にはイヌ心筋虚血/再灌流障害モデルを用い、心筋梗塞サイズ、全身血行動態変化、心筋組織血流量、心筋細胞壊死の指標である血漿中に漏出したクレアチンキナーゼ活性を測定した。さらに、アデノシン  $A_2$  受容体アゴニストは冠血流増加作用以外でも心筋保護が期待できる。本章第 2 節では、薬物の冠血流増加以外の作用、すなわち心筋組織血流量を増加させない用量の YT-146 持続静脈内投与による心保護作用について検討した。さらに、再灌流直後の急速静脈内投与と、再灌流後の持続静脈内投与を組み合わせることによる心保護作用についても検討した。



## 第1節 YT-146 急速静脈内投与による冠血流量への影響と、イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルに対する再灌流直前急速静脈内投与による心保護作用の検討

YT-146 は冠動脈内への投与で冠血流量を増加させ、心筋虚血後の心機能改善に有効であることが想定される。この冠動脈投与は薬剤投与カテーテルを冠動脈まで挿入する必要がある。本研究では、冠動脈内投与より実施しやすい末梢静脈投与による心保護について検討した。本実験では、イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルへの YT-146 投与後の冠血流及び全身血行動態を評価した。さらに、心筋梗塞サイズの抑制効果についても YT-146 投与による効果を評価した。なお、本実験では、虚血心筋保護の比較対照として虚血プレコンディショニング処置を行った。虚血プレコンディショニング処置は、非可逆的な組織障害を生じない短時間の虚血/再灌流に心筋組織を曝露させることにより、その後の長時間虚血への心筋組織の耐性を生じさせる操作である (Fig.2 参照)。虚血プレコンディショニング処置は、最も強力な虚血心筋保護効果を発揮する手段であり、YT-146 の虚血/再灌流障害に対する心筋保護効果の評価のための有益な指標 (positive control) として用いた。

### 1.1.1 実験材料及び方法

#### 1.1.1.1 実験動物

雌雄ビーグル犬(体重 7.8~12.0 kg) は入荷後から試験期間を通じて、温度  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50\pm 20\%$ 、照明時間 12 時間 (7 時点灯、19 時消灯) の条件に設定されたトーアエイヨー株式会社福島研究所内施設にて飼育した。イヌ用固型飼料 (DM-2, 株式会社船橋農場製) を、1 日 1 回 300 g で給餌した。また、自動給水装置を用いて上水道水を自由に摂取させた。

本研究における実験動物の管理と使用に関しては、米国 National Research Council の *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington D.C., 1996) に従った。本研究はトーアエイヨー株式会社動物実験委員会の審査及び承認を経て行われた。

#### 1.1.1.2 YT-146 静脈内投与による冠血流量に対する影響の検討

雌雄ビーグル犬に対し、pentobarbital sodium 30 mg/kg を静脈内投与して麻酔した。カフ付き気管チューブを気管挿入し、人工呼吸器 (SN-480-3、シナノ製作所製) を用いて室内空気により人工呼吸を行った (1 回換気量 20 mL/kg、呼吸回数 18 回/分)。右下肢静脈にカニューレを挿入し、適量の pentobarbital sodium を持続的に静脈内投与して維持麻酔を行った。また、左下肢静脈に薬剤投与用のカニューレを、左下肢動脈に採血用のカニューレを設置した。右下肢動脈に挿入したカニューレより、圧トラン

スデューサー（DX-360、OMEDA 製）及び歪圧力アンプ（AP-601G、日本光電製）を介して血圧を測定した。また、心拍数は瞬時心拍計（AT-601G、日本光電製）を用い、血圧脈波より算出した。血行動態はマルチチャンネルレコーダー（WR3701、日本光電製）を用い、連続的に記録された。

電気メス（SSE2L、Valleylab 製）を用いて第四あるいは第五肋間部位から開胸し、左心耳上部付近の心膜を切開して冠動脈左前下行枝（LAD）を露出させた。LAD を筋層より剥離し、流量測定プローブ（FA020S、日本光電製）を介して電磁血流計（MFV-3700、日本光電製）にて冠動脈灌流量を測定した。試験では、YT-146 の 0.3、1.0、3.0、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を累積投与して血行動態に及ぼす薬物の効果を評価した。

#### 1.1.1.3 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデル

麻酔下の雌雄ビーグル犬を開胸して LAD を露出させた。LAD の第一枝の遠位部を筋層から剥離し、ナイロン縫合糸（2-0、日本商事製）をかけ、その両端をポリエチレンチューブに通して coronary snare を作製した。試験では coronary snare で LAD を閉塞することにより、その支配領域を虚血とし、その閉塞を解くことにより再灌流を行った。試験中は手術台（夏目製作所製）の保温機能を 38°C に設定して体温を保った。開胸部位は白熱電灯にて 38°C に保ち、ビニールシートで覆うことで乾燥を防いだ。

#### 1.1.1.4 心筋組織血流量の評価

心筋組織血流量（regional myocardial blood flow, RMBF）の測定は水素クリアランス法にて行った<sup>42)</sup>。心筋組織中の水素を検出する白金電極（UHE-201C、ユニークメディカル製）は LAD 支配領域の左心室自由壁内部（深さ約 6 mm）に設置した。人工呼吸器による換気量の 5% の水素ガスを吸気と共に 1 分間負荷し、その心筋組織におけるクリアランスは白金電極を接続したポーラログラフイー（MHG-DI、ユニークメディカル製）にて計測した。水素クリアランス曲線をマルチチャンネルレコーダー（WR3701、日本光電製）で記録し、曲線がピーク時の 90% から 40% に下降する際に要した時間 T（90 to 40）を求め、下式を用いて心筋組織血流量を算出した。

$$\text{心筋組織血流量 (mL/min/g)} = -\ln(40/90) / T(90 \text{ to } 40)$$

#### 1.1.1.5 心筋梗塞サイズの評価

実験終了後に heparin sodium を静脈内投与し、pentobarbital sodium 過麻酔にてイヌを安楽死させ、速やかに心臓を摘出した。心筋梗塞サイズの評価は Evans blue と 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) による二段染色法にて行った。心臓を 0.9% 生理食塩液にて瀉血し、大動脈及び LAD にカニューレを挿入し、大動脈カニューレからは 2% Evans blue 溶液を、LAD カニューレからは 0.9% 生理食塩液を約 100 mmHg

の圧にて同時注入した。LAD 閉塞により虚血に陥った部位は、色素灌流により染色されない。この領域をリスク領域とした。一方、色素灌流で染色された部位は、虚血に陥らなかった部位ということで非リスク領域とした。

次に、左右心房と右心室自由壁を切除した左心室から 7 枚の冠状切片を作製した。各切片を 37°C に加温した 1% TTC 溶液中で 15 分間インキュベーションし、組織を染色した。TTC 非染色領域を心筋細胞が虚血/再灌流時に壊死した梗塞領域とし、TTC 染色領域を心筋細胞が生存している非梗塞領域として識別した。さらに切片を 3% ホルムアルデヒド溶液を用いて一晩固定し、切片の両面を画像解析装置 (QUANTIMET 500+, Leica 製) を用いて各領域の面積を算出した。7 枚の切片の表裏における各領域面積を合計して総面積とし、試験成績を以下のように求めた。

$$\text{リスク領域 (\%)} = \text{リスク領域総面積} / \text{左心室総面積 (リスク領域+非リスク領域の総面積)} \times 100$$

$$\text{心筋梗塞サイズ (\%)} = \text{梗塞領域総面積} / \text{リスク領域総面積} \times 100$$

#### 1.1.1.6 血漿中クレアチンキナーゼ活性の評価

Heparin sodium で処理した注射筒を用いて、採血用カニューレから約 1.5 mL の動脈血を経時的に採取し、直ちに 4°C、1000×g で 10 分間遠心して血漿を得、クレアチンキナーゼ活性測定時まで -20°C で保存した。

血漿中クレアチンキナーゼ活性は市販の測定キット (L-type Wako CK、和光純薬製) を用い、生化学分析装置 (CL-8000、島津製作所製) にて測定した。

#### 1.1.1.7 試験プロトコール

Fig.2 に試験プロトコールを示す。実験は vehicle 群、YT-146 3 μg/kg (低用量) 投与群、YT-146 10 μg/kg (高用量) 投与群及び虚血プレコンディショニング処置群にて行った。虚血/再灌流操作を行うための術後、血行動態が安定した時点で LAD を coronary snare で閉塞することにより LAD 支配領域を虚血とした。虚血状態を 90 分間維持した後、閉塞を解くことにより再灌流した。この再灌流は 5 時間行った。Vehicle あるいは YT-146 各濃度を再灌流開始の 1 分前に大腿静脈より約 1 分かけて静脈内投与することで薬物投与を行った。

LAD 支配領域の局所心筋血流量は虚血実施前、虚血 60 分後、再灌流 5、30、60、120、180、240 及び 300 分後に測定した。血漿中クレアチンキナーゼ活性を測定するため、虚血実施前、再灌流 5、30、60、120、180、240 及び 300 分後に大腿動脈から採血した。再灌流性の心室細動 (Vf) が生じた場合は、除細動器 (ライフパック 9B、NEC Medical 製) を用い、心臓を 10~20 J の直流電流にて直接刺激して除細動した。

なお、下記事象が生じた場合、その時点で試験終了とし、結果の解析対象から除外した。

- (1) 心筋虚血時に Vf が生じた場合
- (2) 再灌流中の Vf からの蘇生に、4 回以上の除細動器の使用を必要とした場合
- (3) 虚血 60 分後の局所心筋血流量が 0.1 mL/min/g 以上であった場合

#### 1.1.1.8 統計処理

試験結果は平均値±標準誤差にて表した。薬物投与群と vehicle 群の間におけるリスク領域と心筋梗塞サイズの差は Dunnett の多重比較にて、血圧、心拍数、局所心筋血流量及び血漿中クレアチンキナーゼ活性の差は二元配置分散分析と多変量検定にて検定した。

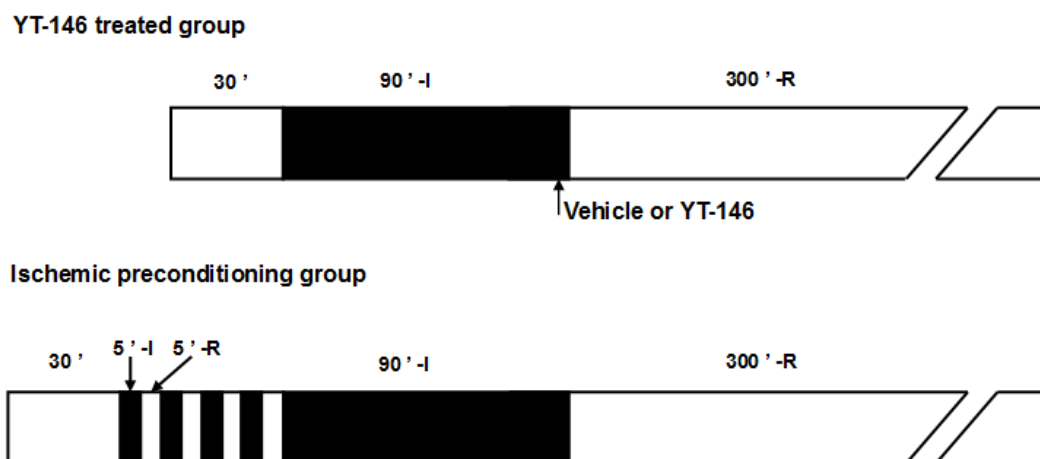


Fig. 2. Experimental protocols. All dogs were subjected to 90 min of ischemia (90'-I) followed by 300 min of reperfusion (300'-R). Vehicle, YT-146 3 µg/kg, or YT-146 10 µg/kg was administered intravenously into the ischemic/reperfused dogs 1 min before the onset of reperfusion. In the ischemic preconditioning group, 4 episodes of 5 min occlusion (5'-I) followed by 5 min of reperfusion (5'-R) were performed before 90 min of ischemia.

## 1.1.2 結果

### 1.1.2.1 YT-146 の静脈内投与後の冠血流量及び全身血行動態の変化

麻酔したイヌに YT-146 を 0.3、1.0、3.0 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で累積投与した時の冠血流量、平均血圧及び心拍数の薬物投与前からの変化値を Fig.3 に示す。薬剤投与前の冠血流量、平均血圧及び心拍数の初期値はそれぞれ  $19\pm 2$  mL/min、 $96\pm 9$  mmHg 及び  $137\pm 9$  bpm であった。YT-146 投与後に、冠血流量は薬物用量依存的な増加を示し、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では投与前から  $44\pm 12$  mL/min 増加した。一方、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与時における平均血圧及び心拍数の最大変化値はそれぞれ  $-8.0\pm 4.4$  mmHg 及び  $-6.3\pm 7.5$  bpm であった。

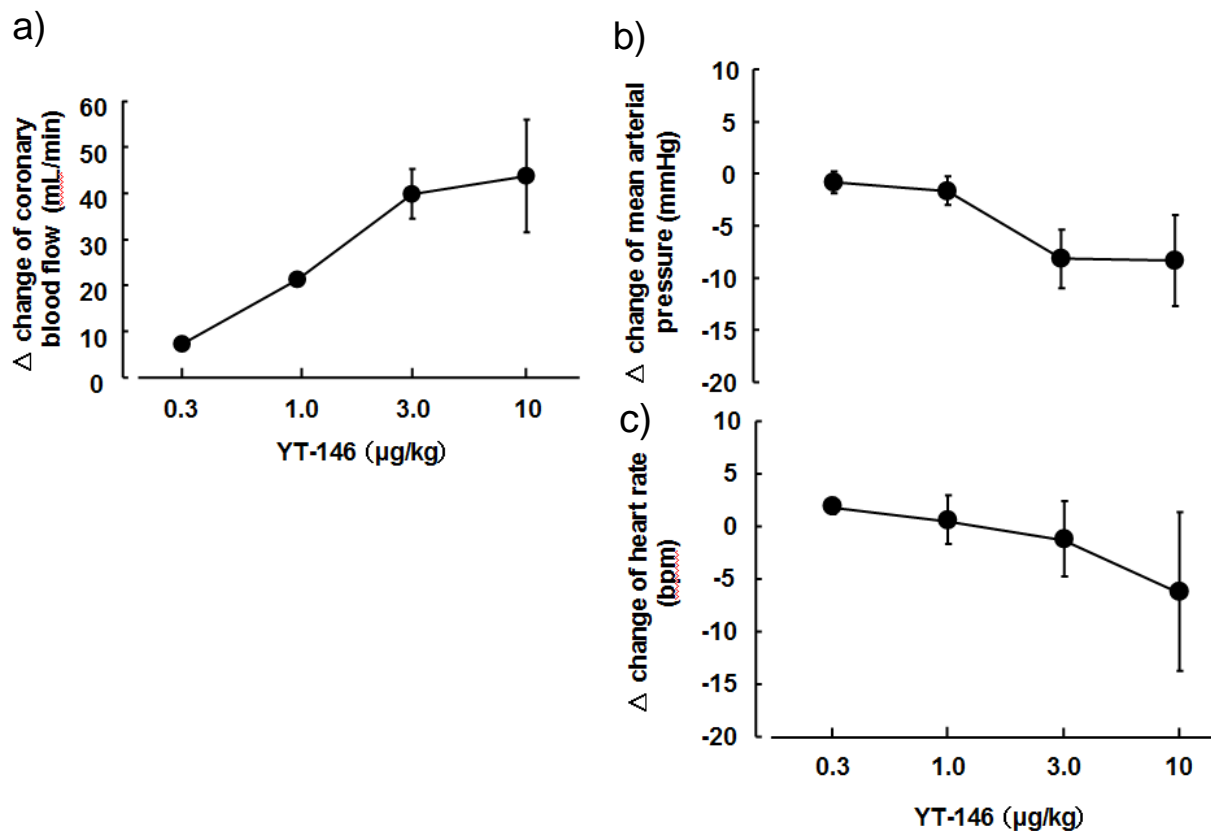


Fig. 3. Effects of YT-146 on coronary flow (a), mean arterial pressure (b) and heart rate (c) in dogs. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 dogs.

### 1.1.2.2 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルに対する YT-146 の再灌流直前急速静脈内投与による心筋保護の検討

#### 1.1.2.2-1 YT-146 の血行動態への作用

各実験群における虚血及び再灌流時の平均血圧及び心拍数を Fig.4 に示す。平均血圧及び心拍数の初期値は、各群でそれぞれ約 100 mmHg 及び 160 bpm に調整され、いずれの群間でも同様の値となった。YT-146 投与群では、投与直後に拡張期血圧が一過性に低下したものの、再灌流期間中の測定時点での平均血圧及び心拍数推移に有意な変動は観察されなかった。虚血プレコンディショニング群の平均血圧及び心拍数も同様に有意な変動は観察されなかった。

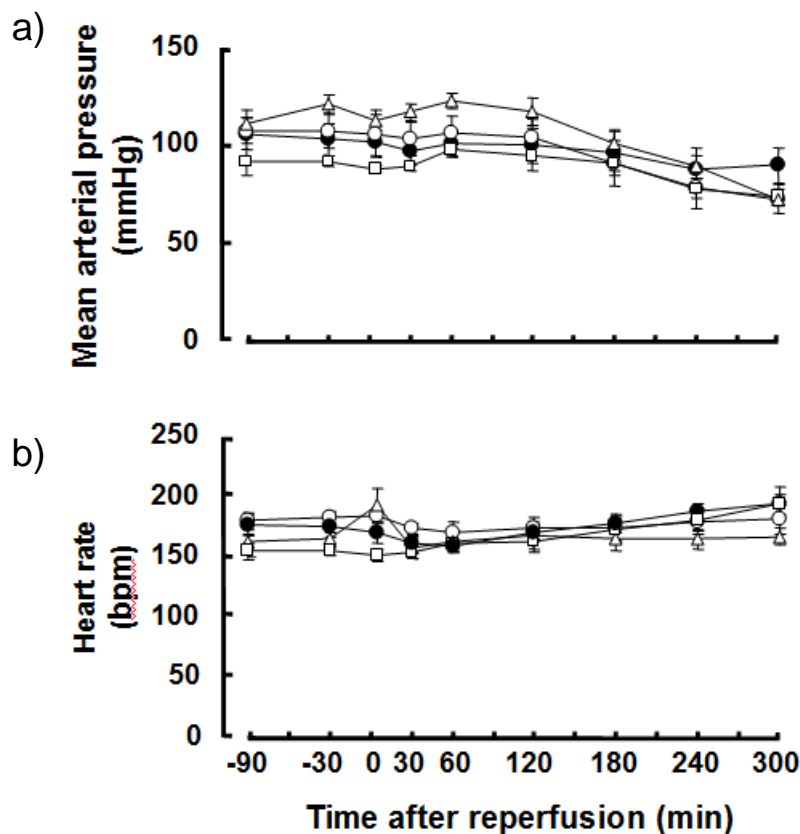


Fig. 4. Effects of YT-146 and the ischemic preconditioning on mean arterial pressure (a) and heart rate (b) during ischemia (-90 to 0 min) and reperfusion (0 to 300 min) in dogs. Each value represents the mean±S.E.M. of 5 dogs. Groups: vehicle (●), ischemic preconditioning (○), 3 µg/kg YT-146 (Δ), and 10 µg/kg YT-146 (□). The mean arterial pressure and heart rate were not altered by treatment with YT-146 or the ischemic preconditioning.

### 1.1.2.2-2 YT-146 の心筋組織血流量への作用

虚血前値を 100% とした場合の虚血及び再灌流時の各実験群の心筋組織血流量 (RMBF) を Fig.5 に示す。虚血中の RMBF は非常に低いレベルになり、いずれの群間でも同様の値となった。これらの値から、各群で同程度の虚血条件であることが示された。RMBF の再灌流後の推移では、vehicle 群と YT-146 高用量投与群がほぼ同様であり、YT-146 低用量投与群は高値で推移する傾向が観察された。一方、虚血プレコンディショニング処置群の RMBF は、vehicle 群のそれよりも低値となった。再灌流 300 分後の RMBF は各群とも虚血前の約 50% まで低下した。

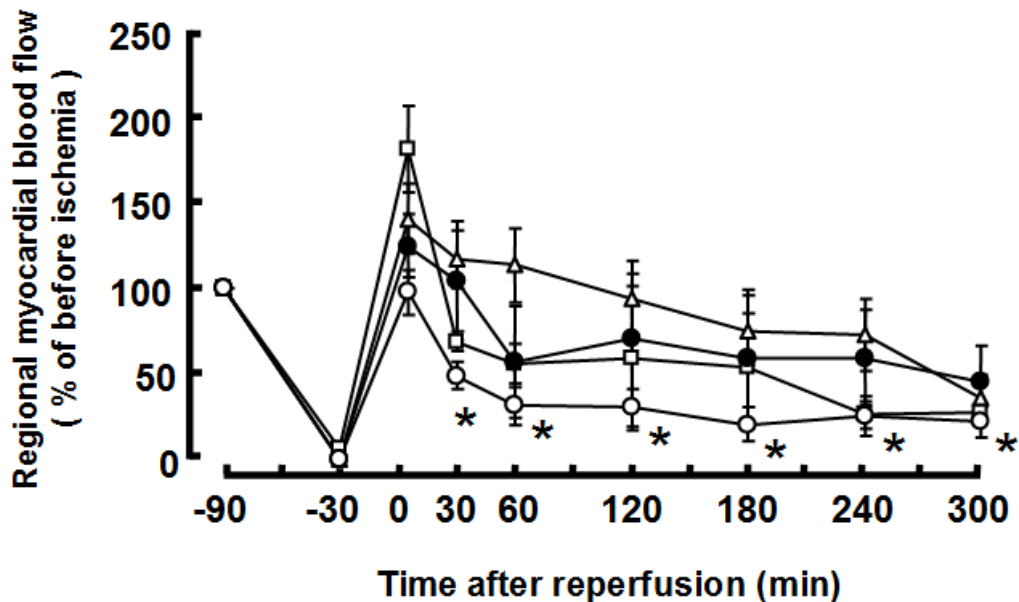


Fig. 5. Effects of YT-146 and ischemic preconditioning on regional myocardial blood flow in dogs. Blood flow at the territory perfused by the left anterior descending coronary artery before and during ischemia (-90 to 0 min) and after reperfusion (0 to 300 min) was measured by the hydrogen clearance method. Each value represents the mean±S.E.M. of 5 dogs. Groups: vehicle (●), ischemic preconditioning (○), 3 µg/kg of YT-146 (Δ), and 10 µg/kg of YT-146 (□). Regional myocardial blood flow of the ischemic preconditioned heart was significantly lower than that of the heart without any treatment. \*  $p < 0.05$  vs. vehicle group.

### 1.1.2.2-3 YT-146 の再灌流 5 分後の心筋組織血流量に対する作用

虚血前値を 100% とした各実験群の再灌流 5 分後の心筋組織血流量 (RMBF) 値を Fig.6 に示す。RMBF は vehicle 群で  $124 \pm 18\%$  に上昇し、再灌流開始直後の反応性充血反応が観察された。この反応は YT-146 低用量及び高用量投与群で増強され、それぞれ  $140 \pm 20\%$  及び  $180 \pm 25\%$  ( $p < 0.05$ ) となった。一方、虚血プレコンディショニング処置群では、反応性充血反応は観察されなかった。

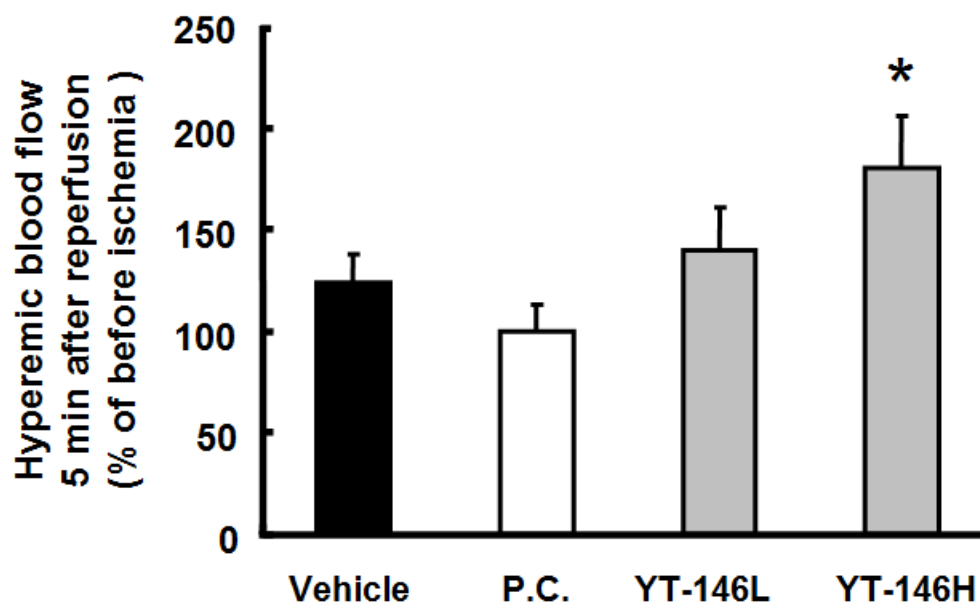


Fig. 6. Effects of YT-146 and ischemic preconditioning on hyperemic coronary flow at 5 min after the onset of reperfusion in dogs. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 dogs. Groups: vehicle, ischemic preconditioning (P.C.), 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  YT-146 (YT-146-L), and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  YT-146 (YT-146-H). YT-146 increased the hyperemic coronary flow dose-dependently and significantly at the dose of 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , whereas the ischemic preconditioning did not alter the flow. \*  $p < 0.05$  vs. vehicle group.



#### 1.1.2.2-4 YT-146 の心筋梗塞サイズへの作用

各実験群のリスク領域及び心筋梗塞サイズを Fig.7 に示す。各群のリスク領域はいずれも約 40% となった。一方、心筋細胞が壊死した領域の大きさを表わす心筋梗塞サイズは、vehicle 群で  $56.2 \pm 2.7\%$  となったのに対し、YT-146 の低用量及び高用量投与群ではそれぞれ  $29.5 \pm 8.7\%$  及び  $20.2 \pm 7.0\%$  となり、心筋梗塞巣の大きさが vehicle 群のそれよりも低値となった。虚血プレコンディショニング処置群でも、心筋梗塞巣は  $19.2 \pm 6.3\%$  の低値となり、心筋梗塞サイズが縮小された。

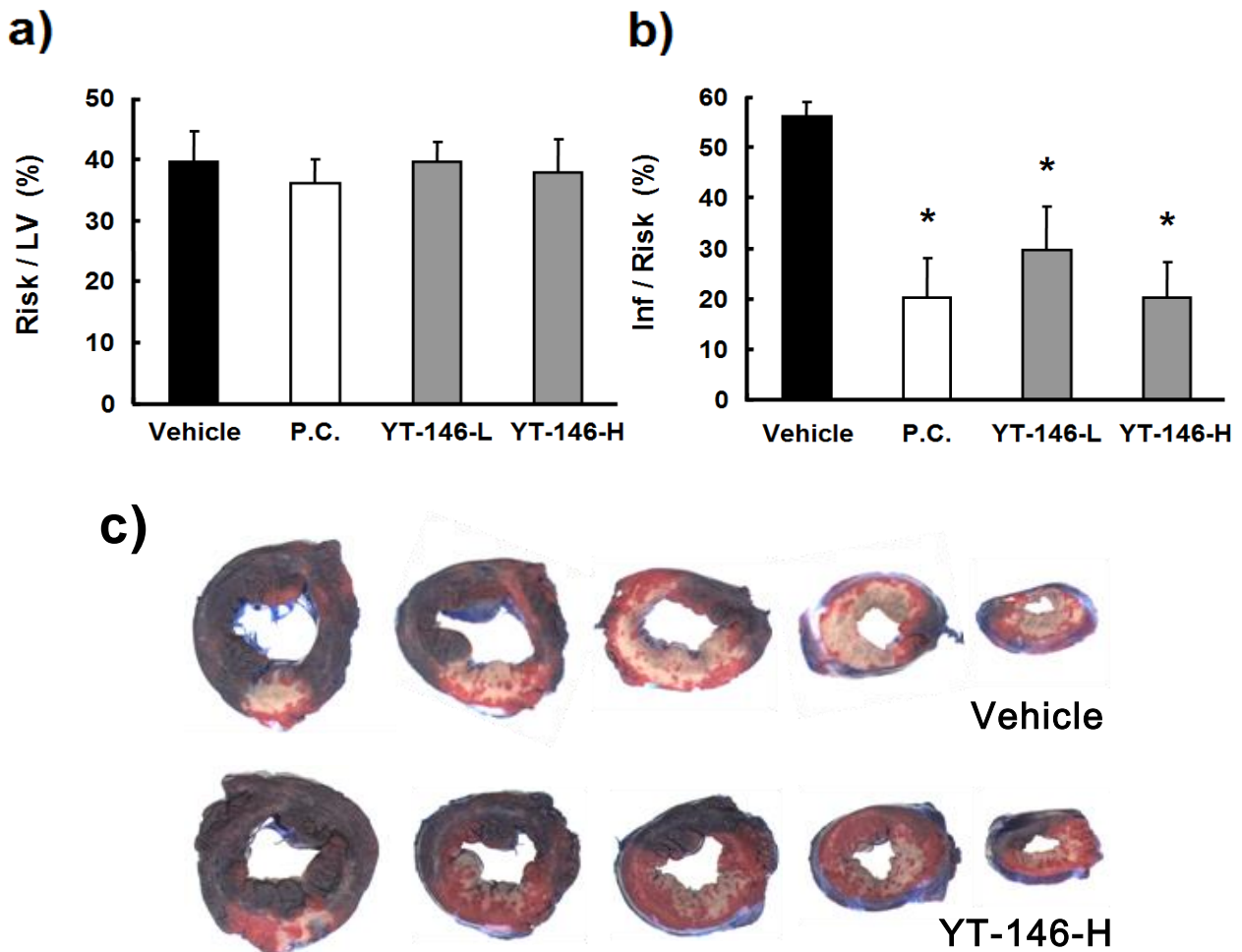


Fig. 7. Effects of YT-146 and ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced myocardial infarct size in dogs (a, Risk/LV; b, Inf/Risk, c, Cross sectional images of left ventricular from vehicle and YT-146-H treated group). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 dogs. Risk/LV, ratio of risk area vs. left ventricle; Inf/Risk, ratio of infarct size vs. risk area. Groups: vehicle, ischemic preconditioning (P.C.), 3  $\mu$ g/kg YT-146 (YT-146-L), and 10  $\mu$ g/kg YT-146 (YT-146-H). Infarct size of the ischemic preconditioned and YT-146-treated hearts was significantly smaller than that of the heart without any treatment. \*  $p < 0.05$  vs. vehicle group.

#### 1.1.2.2-5 YT-146 の血漿中クレアチンキナーゼ活性への作用

各実験群における試験期間中の血漿中のクレアチンキナーゼ (CK) 活性を Fig.8 に示す。血漿 CK 活性は再灌流 5 分後から 60 分後にかけて上昇し、再灌流 120 分後から 180 分後に最大値に達した。Vehicle 群の血漿中 CK 活性は  $17110 \pm 501$  IU/mL に達した。一方、YT-146 低用量及び高用量投与群の CK 活性最大値は  $9385 \pm 2338$  及び  $5981 \pm 1612$  IU/mL となり、血漿 CK 活性の低下が観察された。虚血プレコンディショニング処置群でも、再灌流時の最大値が  $5095 \pm 2364$  IU/mL となり、血漿 CK 活性が低下した。

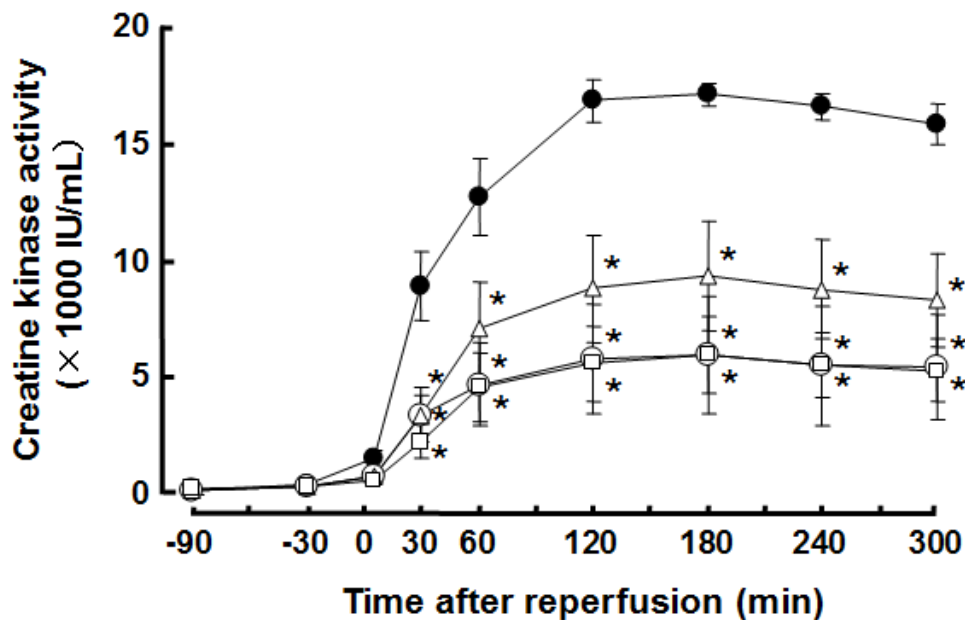


Fig. 8. Effects of YT-146 and ischemic preconditioning on plasma creatine kinase activity in dogs at different periods of perfusion. Ischemia was induced at -90 min and reperfusion started at 0 min. Blood samples were collected at the indicated time points. Creatine kinase activity was measured by use of a commercially available assay kit. Each value represents the mean±S.E.M. of 5 dogs. Groups: vehicle (●), ischemic preconditioning (○), 3 µg/kg YT-146 (Δ), and 10 µg/kg YT-146 (□). The amount of CK released after reperfusion was significantly reduced by treatment with YT-146 or ischemic preconditioning. \*  $p < 0.05$  vs. vehicle group.

### 1.1.3 考察

麻酔下開胸イヌにおいて、YT-146 の静脈投与で用量依存的に冠血流量が増加し、10 µg/kg 投与後にはベースライン(薬物投与前)のその約 3 倍まで増加した。一方、全身の血行動態指標に関して、過度な降圧及び心拍数の低下は観察されなかった。これらの結果から、静脈内投与後、薬物が全身組織に分布する条件下でも、他の血管拡張薬よりも YT-146 は冠血管に対して選択性の高い血管拡張作用を発揮することが示された。

今回のイヌ虚血/再灌流障害モデルを用いた試験において、3 µg/kg 及び 10 µg/kg の YT-146 を再灌流直前に急速静脈内投与したところ、心筋梗塞サイズの縮小と血漿 CK 活性の低下が観察された。一方、YT-146 投与後の血行動態は上述した正常動物のそれと同様であったことから、YT-146 は全身血行動態には影響せずに再灌流後の心筋組織血流量を増加させ、心保護作用を発揮することが示された。

本試験において、再灌流 5 分後の心筋組織血流量は vehicle 群で虚血前値の約 1.2 倍に増加したことから、虚血後の反応性充血が確認された。YT-146 は冠血管の拡張により再灌流 5 分後の心筋組織血流量を用量依存的に増加させ、vehicle 群のそれよりも高値となった。再灌流直後の反応性充血は、心筋細胞の酸素需要の高まりを反映するもので、虚血中の代謝不全を回復させるために誘発されると考えられている<sup>43)</sup>。イヌ虚血/再灌流モデルを用いたアデノシン及びその誘導体に関するこれまでの研究で、再灌流初期の冠血流量の増加が心筋壊死の抑制あるいは心室収縮・弛緩能の改善に寄与すると推測されている<sup>30,44-46)</sup>。同様に、PCI 後に再開する冠血流量が多い AMI 患者は、予後が良好であることも経験的に知られている<sup>47)</sup>。本実験条件下でも、YT-146 投与で再灌流直後の心筋組織血流量が用量依存的に増加すると共に、心筋梗塞サイズが縮小された。このことは、再灌流直後の心筋組織血流量の増加が心筋梗塞サイズの縮小に寄与することを示唆している。

YT-146 10 µg/kg 投与群の心筋梗塞サイズ減少の割合は、本実験系で虚血プレコンディショニング処置群のそれと同程度であった。前述したように、虚血プレコンディショニング処置は短時間の虚血/再灌流に暴露された細胞が、虚血耐性を獲得することであり、再灌流障害抑制に最も有効な手段とされる<sup>48)</sup>。Kitakaze らは心臓を複数回の短時間虚血/再灌流に曝露させることで、イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルの心筋梗塞サイズを 75% 縮小させることに成功している<sup>49)</sup>。本試験でもイヌ心筋虚血/再灌流障害モデルで Kitakaze らと同様な虚血プレコンディショニング処置を行ったところ、心筋梗塞サイズは vehicle 群のその約 30% まで抑制された。しかしながら、虚血プレコンディショニング処置群では心保護作用が示されたにもかかわらず、再灌流開始時点の反応性充血反応の増強は観察されず、かつ再灌流時の局所心筋血流量も低値であった。従って、YT-146 による虚血/再灌流時の心筋保護作用は、虚血プレコンディショニング処置による心筋保護作用のような冠動脈血流量増大以外の作用の寄与があると考えられた。

## 第2節 *In vivo* イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルでの YT-146 虚血後持続静脈内投与の心保護作用の検討

前節にて、イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルで再灌流直前の YT-146 急速静脈内投与により、再灌流開始時点での心筋組織血流量増加を介した心保護作用を見出した。一方、虚血プレコンディショニング処置による心保護作用では、再灌流開始時点での心筋組織血流量の増大は観察されなかった。そこで、本節では、YT-146 の心筋組織血流量を増加させない用量での持続静脈内投与により、心保護作用が発揮されるか否かについて検討した。さらに、再灌流直前の急速静脈内投与と再灌流時の持続静脈内投与の組み合わせの効果についても検討した。

### 1.2.1 実験材料及び方法

#### 1.2.1.1 実験動物

第1章第1節と同様の動物を用いた。

#### 1.2.1.2 イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルの作製

イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルの作製は前節と同様に行った。

#### 1.2.1.3 心筋組織血流量、心筋梗塞サイズ、血漿中クレアチンキナーゼ活性の評価

イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルにおける心筋組織血流量、心筋梗塞サイズ、血漿中クレアチンキナーゼ活性の評価は第前節と同様に行った。

#### 1.2.1.4 試験プロトコール

Fig.9 に試験プロトコールの概略を示す。再灌流時の持続静脈内投与による薬効評価は、vehicle 群、YT-146 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  群、YT-146 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与群にて行った。Vehicle 或いは YT-146 各投与量を再灌流 15 分前から 75 分間、持続注入器 (Model-22、Harvard 製) にて 0.05 mL/kg の容量で大腿静脈より持続投与した。

再灌流直前の単回静注+再灌流後の持続静脈内投与の検討では、実験は vehicle 群及び YT-146 投与群にて行った。再灌流 1 分前に YT-146 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を 0.5 mL/kg の容量で 1 分間かけて静脈内投与し、引き続き 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  にて 0.05 mL/kg の容量で 60 分間持続静注した。

イヌ心筋での虚血及び再灌流の作製は前節と同様に行った。RMBF 測定及び CK 活性測定を目的とした採血も前節と同様に行った。再灌流性 Vf に対する除細動も同様に行った。

#### 1.2.1.5 試験除外規定

試験除外規定は前節と同様とした。

### 1.2.1.6 統計処理

統計処理は前節と同様に行った。

#### YT-146 treated group

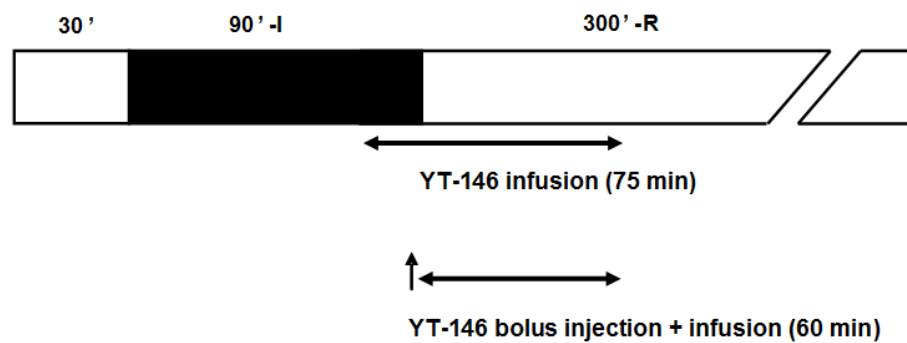


Fig. 9. Experimental protocols. All dogs were subjected to 90 min of ischemia (90' -I) followed by 300 min of reperfusion (300' -R). In infusion study group, Vehicle, YT-146 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , or YT-146 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  was infused intravenously for 75 min into the ischemic/reperfused dogs 15 min before the onset of reperfusion. In bolus injection + infusion study group, YT-146 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  was administered intravenously 1 min before the onset of reperfusion and followed by YT-146 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  intravenously infusion for 60 min.

## 1.2.2 結果

### 1.2.2.1 YT-146 の持続投与

#### 1.2.2.1-1 YT-146 の血行動態への効果

各実験群における虚血及び再灌流時の平均血圧及び心拍数を Fig.10 に示す。平均血圧と心拍数の初期値は各群とも約 90 mmHg 及び 160 bpm に調整され、それぞれの群間に差は無かった。YT-146 を 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  で持続静脈内投与された動物では、投与期間中に平均血圧が低下傾向にあったものの、投与前値と比較しても有意な変動にはならなかった。

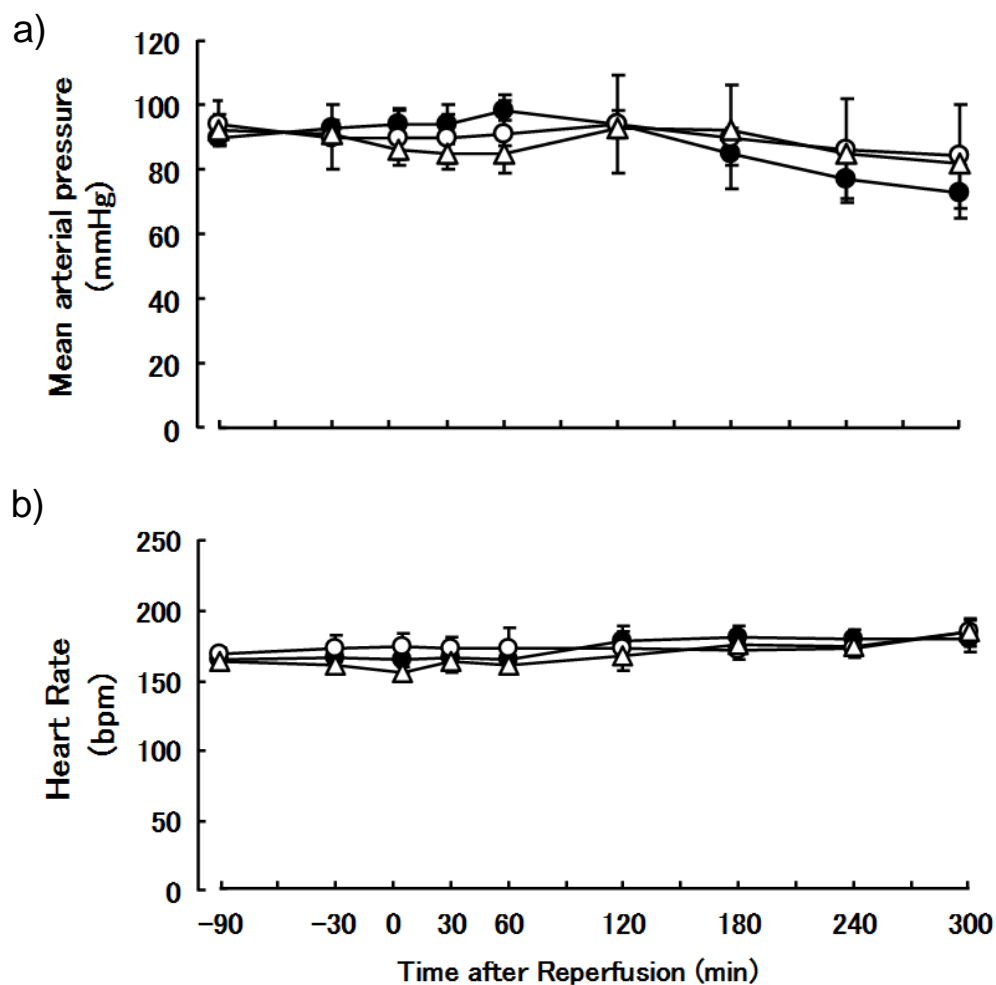


Fig. 10. Effects of YT-146 on mean arterial pressure (a) and heart rate (b) during ischemia (-90 to 0 min) and reperfusion (0 to 300 min) in dogs. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3-5 dogs. Groups: vehicle (●), YT-146 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion, ○), YT-146 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion, △). The mean arterial pressure and heart rate were not significantly altered by vehicle or YT-146 treatment.

### 1.2.2.1-2 YT-146 の心筋組織血流量への効果

虚血前値を 100% とした虚血/再灌流時の各群の心筋組織血流量 (RMBF) を Fig.11 に示す。虚血中の RMBF は非常に低い値となり、各群間に差は無かった。再灌流開始直後 (5 分後) の RMBF は YT-146 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与群及び YT-146 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与群でいずれも薬物未処置群と比較して同等あるいはそれ以下となり、本実験条件下での YT-146 による RMBF 量の増加は観察されなかった。

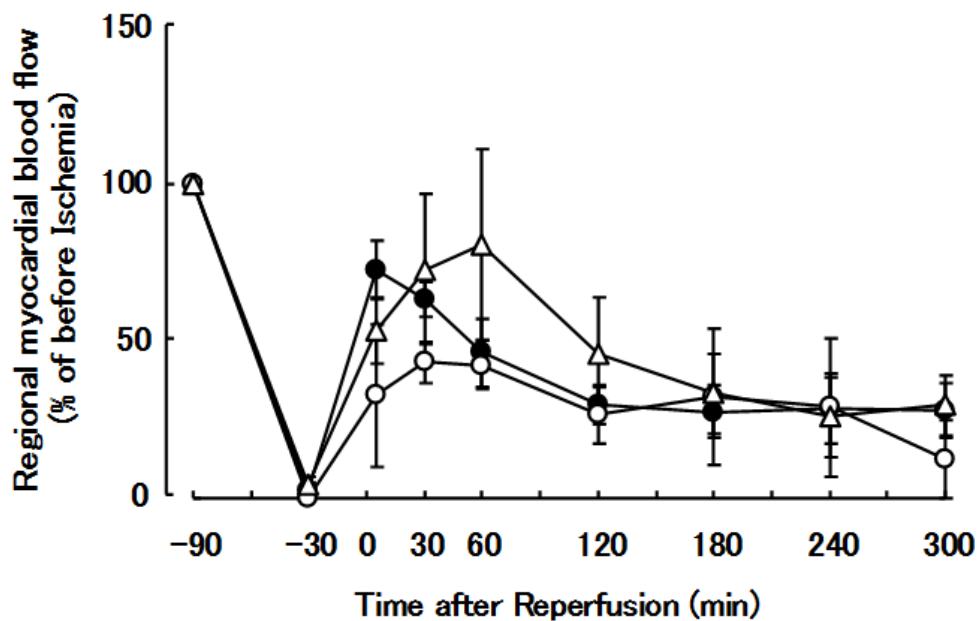


Fig. 11. Effects of YT-146 on regional myocardial blood flow in dogs. Blood flow at the territory perfused by the left anterior descending coronary artery before and during ischemia (-90 to 0 min) and after reperfusion (0 to 300 min) was measured by the hydrogen clearance method. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3-5 dogs. Groups: vehicle (●), YT-146 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion, ○), YT-146 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion, △).

### 1.2.2.1-3 YT-146 の心筋梗塞サイズへの効果

各群の心筋虚血によるリスク領域と心筋梗塞サイズを Fig.12 に示す。各群の心筋虚血によるリスク領域の大きさに差は認められなかった。

心筋梗塞サイズは vehicle 群では  $54.9 \pm 6.6\%$  となった。一方、YT-146  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与群の心筋梗塞サイズは、 $45.7 \pm 7.5\%$  と縮小傾向にあった。YT-146  $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与群の心筋梗塞サイズは  $35.7 \pm 4.6\%$  まで縮小した。

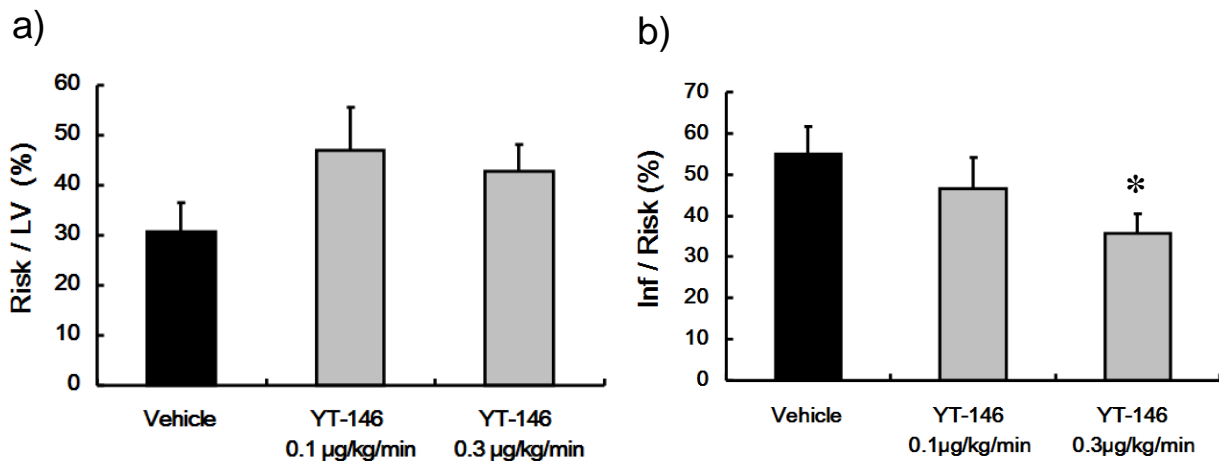


Fig. 12. Effects of YT-146 on ischemia/reperfusion-induced myocardial infarct size in dogs (a, Risk/LV; b, Inf/Risk). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 3-5 dogs. Risk/LV, ratio of risk area vs. left ventricle; Inf/Risk, ratio of infarct size vs. risk area. Groups: vehicle, YT-146  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion), YT-146  $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion). Infarct size of YT-146  $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ -treated hearts was significantly smaller than that of the vehicle treated heart. \*  $p < 0.05$  vs. vehicle group.



#### 1.2.2.1-4 YT-146 の血漿中クレアチンキナーゼへの効果

各群における再灌流時の血漿クレアチンキナーゼ (CK) 活性を Fig.13 に示す。CK 活性は再灌流 5 分後から 60 分後にかけて急激に上昇し、再灌流 120 分後から 180 分後にほぼ最大値に達した。最大 CK 活性は、vehicle 群では  $11335 \pm 2857$  IU/mL となった。YT-146 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与群の最大 CK 活性は  $17792 \pm 4610$  IU/mL となり、YT-146 処置は心筋組織からの CK 逸脱には影響しなかった。一方、YT-146 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  投与群での最大 CK 活性は  $5700 \pm 1398$  IU/mL となり、再灌流時の血漿 CK 活性を低下させた。

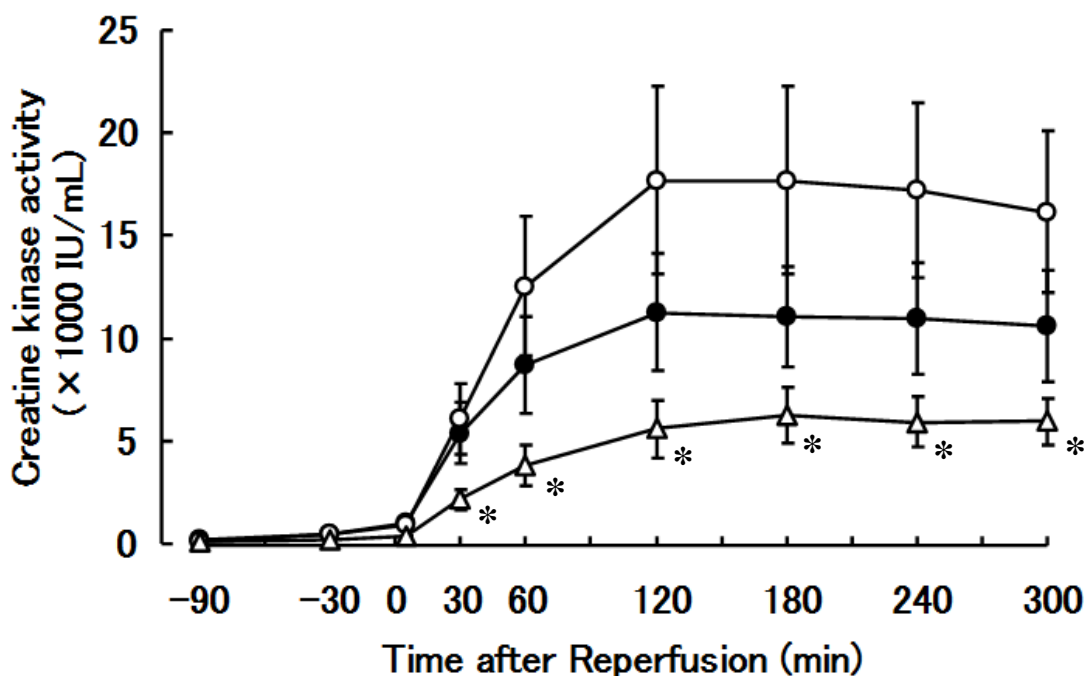


Fig. 13. Effects of YT-146 on plasma creatine kinase activity in dogs at different periods of perfusion. Ischemia was induced at  $-90$  min and reperfusion started at  $0$  min. Blood samples were collected at the indicated time points. Creatine kinase activity was measured by use of a commercially available assay kit. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 3-5 dogs. Groups: vehicle ( $\bullet$ ), YT-146  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion,  $\circ$ ), YT-146  $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (75 min infusion,  $\Delta$ ) The amount of CK released after reperfusion was significantly reduced by treatment with YT-146  $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . \*  $p < 0.05$  vs. vehicle group.

### 1.2.2.2 YT-146 の再灌流直前の急速静脈内投与+再灌流時の持続静脈内投与

#### 1.2.2.2-1 YT-146 の血行動態への効果

各実験群における、虚血/再灌流時の平均血圧及び心拍数を Fig.14 に示す。平均血圧と心拍数の初期値は各群とも約 90 mmHg 及び 160 bpm で、各群間で同様の値となった。YT-146 の投与の有無に関わらず実験期間中の平均血圧及び心拍数に変動はみられなかった。

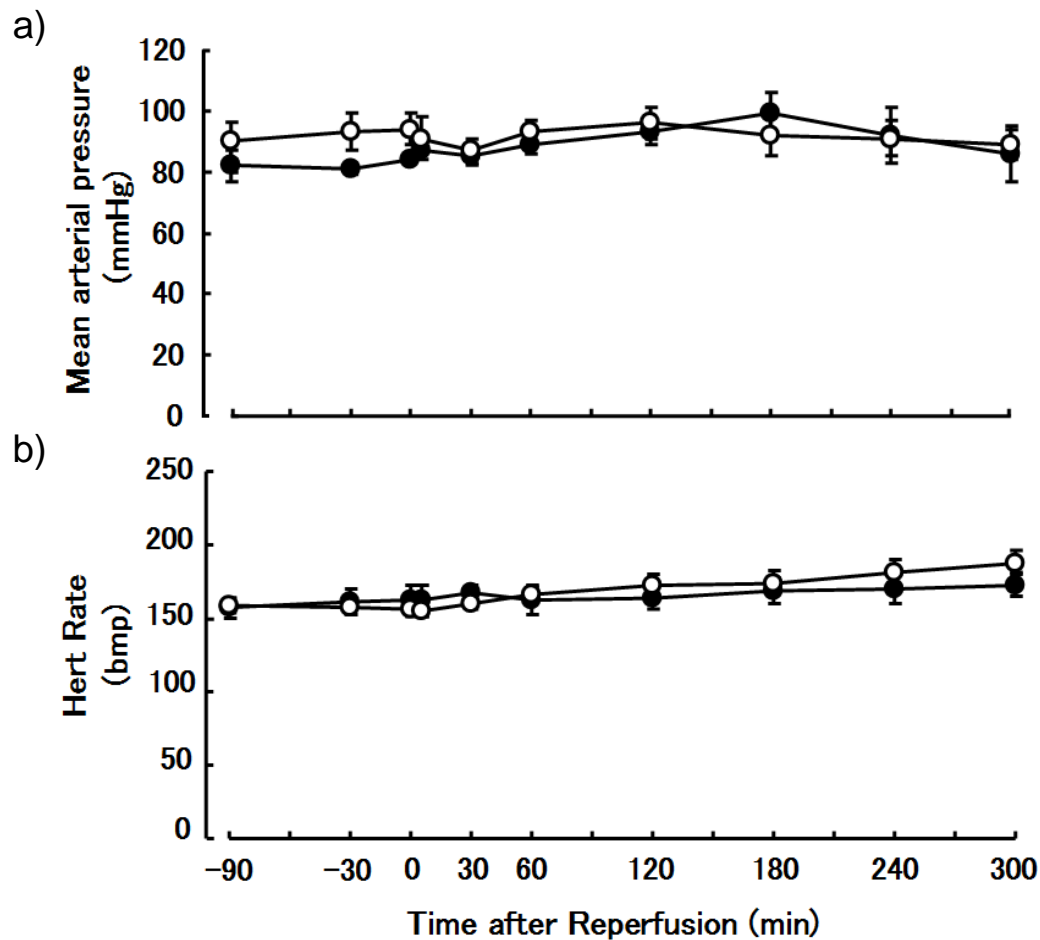


Fig. 14. Effects of YT-146 on mean arterial pressure (a) and heart rate (b) during ischemia (-90 to 0 min) and reperfusion (0 to 300 min) in dogs. Each value represents the mean±S.E.M. of 5 dogs. Groups: vehicle (●), YT-146 3µg/kg (bolus) + 0.3µg/kg/min (60 min infusion,○). The mean arterial pressure and heart rate were not altered by treatment with vehicle or YT-146.

### 1.2.2.2-2 YT-146 の心筋組織血流量への効果

虚血前値を 100% とした虚血/再灌流時の各実験群の心筋組織血流量 (RMBF) を Fig.15 に示す。虚血中の RMBF の平均値は 0~0.07 mL/min/g の極めて低い値となり、各群間で同様の値となったことから、いずれも同程度の虚血状態に陥っていることが示された。再灌流開始 5 分後の RMBF は、vehicle 群では虚血前値より低値となった。一方、YT-146 投与群のそれは 126.7±16.3% まで増加し、YT-146 の急速静脈内投与による RMBF の上昇が観察された。

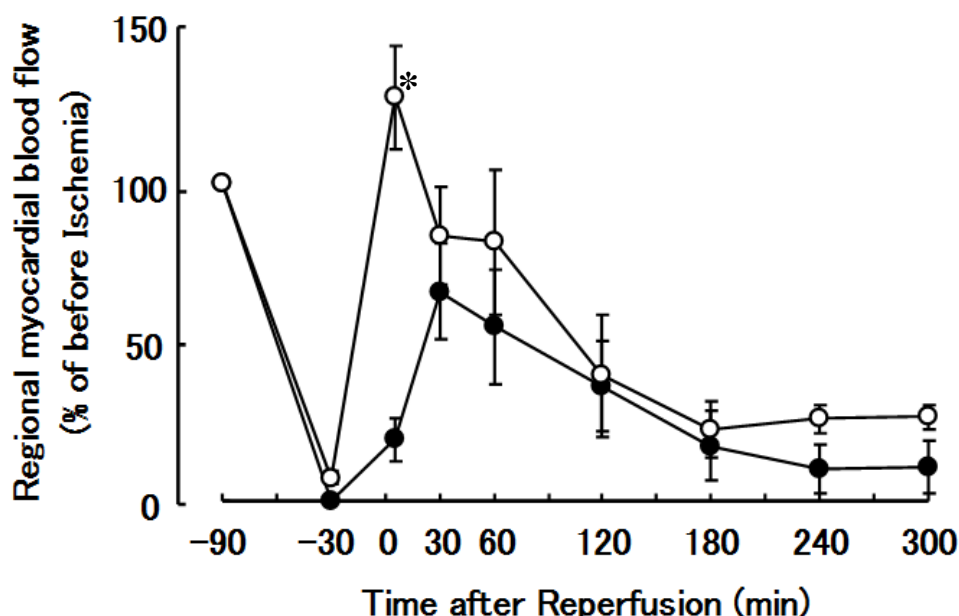


Fig. 15. Effects of YT-146 and ischemic preconditioning on regional myocardial blood flow in dogs. Blood flow at the territory perfused by the left anterior descending coronary artery before and during ischemia (-90 to 0 min) and after reperfusion (0 to 300 min) was measured by the hydrogen clearance method. Each value represents the mean±S.E.M. of 5 dogs. Groups: vehicle (●), YT-146 3µg/kg (bolus) + 0.3µg/kg/min (60 min infusion, ○). Five min after reperfusion, regional myocardial blood flow of YT-146 treated heart was significantly higher than that of the vehicle treated heart. \* p < 0.05 vs. vehicle group.

### 1.2.2.2-3 YT-146 の心筋梗塞サイズへの効果

各実験群の心筋虚血リスク領域と心筋梗塞サイズを Fig.16 に示す。各群のリスク領域の大きさは、いずれも同様の値となった。一方、vehicle 群の心筋梗塞サイズは  $58.8 \pm 5.9\%$  であったのに対し、YT-146 投与群のそれでは  $26.2 \pm 5.6\%$  の低値となり、薬物による心保護作用が認められた。

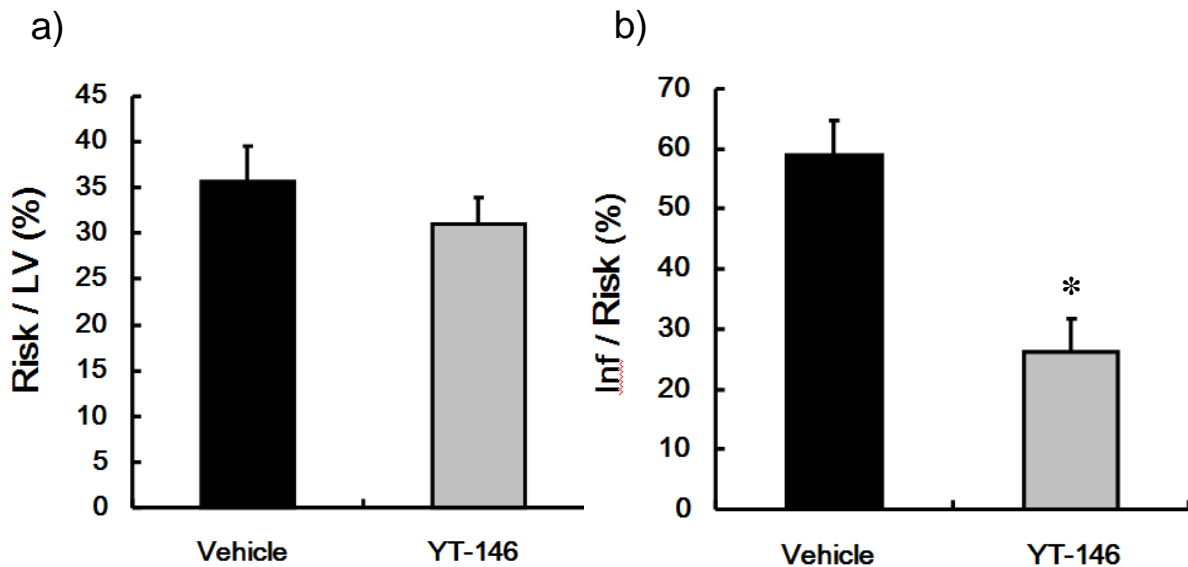


Fig. 16. Effects of YT-146 on ischemia/reperfusion-induced myocardial infarct size in dogs (a, Risk/LV; b, Inf/Risk). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 dogs. Risk/LV, ratio of risk area vs. left ventricle; Inf/Risk, ratio of infarct size vs. risk area. Groups: vehicle, YT-146  $3\mu\text{g}/\text{kg}$  (bolus) +  $0.3\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (60 min infusion). Infarct size of YT-146-treated hearts was significantly smaller than that of the vehicle treated heart. \*  $p < 0.05$  vs. vehicle group.

#### 1.2.2.2-4 YT-146 の血漿中クレアチンキナーゼ活性への効果

各実験群における再灌流時の血漿中クレアチンキナーゼ (CK) 活性を Fig.17 に示す。血漿中の CK 活性は再灌流開始 5 分後から 60 分後にかけて急激に上昇し、vehicle 群での最大活性は  $12522 \pm 2776$  IU/mL に達した。一方、YT-146 投与群のそれは、 $4409 \pm 1278$  IU/mL になり、YT-146 による血漿中の CK 活性低下が観察された。

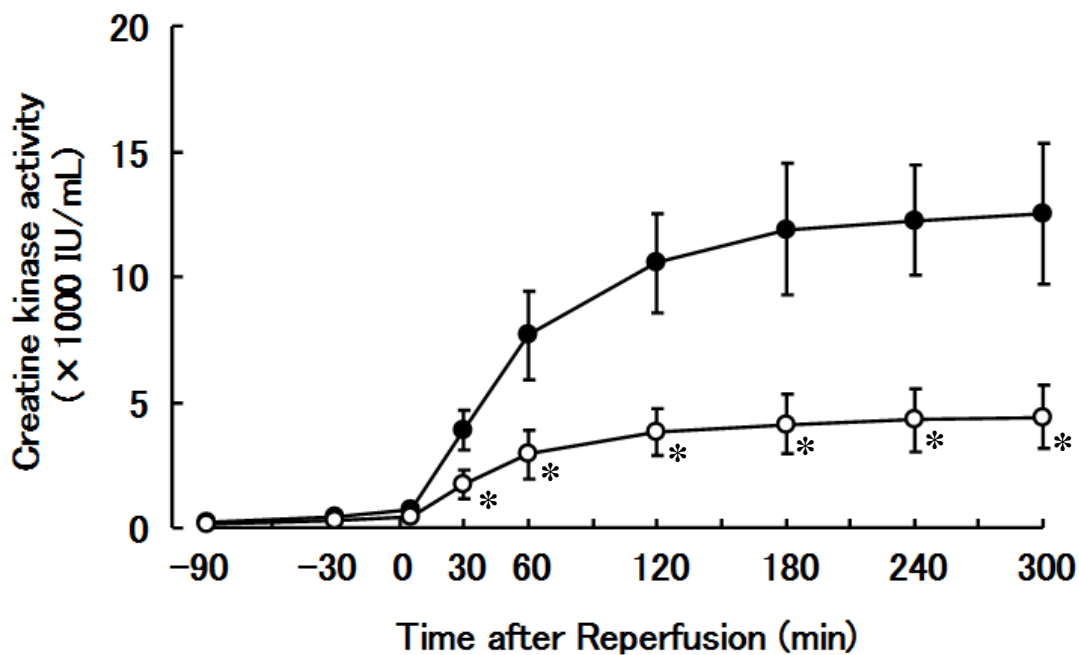


Fig. 17. Effects of YT-146 on plasma creatine kinase activity in dogs at different periods of perfusion. Ischemia was induced at -90 min and reperfusion started at 0 min. Blood samples were collected at the indicated time points. Creatine kinase activity was measured by use of a commercially available assay kit. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 dogs. Groups: vehicle (●), YT-146 3 $\mu$ g/kg (bolus) + 0.3 $\mu$ g/kg/min (60 min infusion, ○). The amount of CK released after reperfusion was significantly reduced by treatment with YT-146. \* p < 0.05 vs. vehicle group.

### 1.2.3 考察

第1章第1節において、YT-146は再灌流直前の急速静脈内投与で心筋梗塞サイズを縮小させた。その心保護の機序として左心室のLAD支配領域における再灌流直後の反応性充血の増強を介した心筋組織血流量の増大が考えられた。その一方、アデノシンA<sub>2</sub>受容体アゴニストの*in vivo*虚血/再灌流障害モデルでの心筋保護の機序として、好中球遊走阻害による活性酸素放出の抑制及び血小板活性化の抑制が報告されている<sup>26,27)</sup>。これらの作用は心筋虚血/再灌流障害に対し、心筋保護作用が期待できるものである。YT-146は好中球遊走を抑制する作用及び血小板活性化を抑制する作用が報告されており<sup>35,50)</sup>、これら機序が虚血/再灌流時の心筋保護作用に寄与すると考えられた。そこで、イヌ心筋虚血/再灌流モデルを用い、心筋組織血流量を増加させない用量（低用量）のYT-146を持続投与することでの心筋梗塞サイズの縮小の可否について検討した。本試験では0.1 µg/kg/min及び0.3 µg/kg/minでYT-146を持続投与した。これらの濃度では、再灌流5分後の心筋組織血流量が虚血前値の約50%に留まり、増加はみられなかった。再灌流5時間後の心筋梗塞サイズを指標にして薬物の効果を評価したところ、0.3 µg/kg/min投与群の心筋梗塞サイズがvehicle群のそれよりも縮小された。同時に0.3 µg/kg/min投与群では血漿クレアチンキナーゼ活性が、vehicle群のそれよりも低値となり、虚血/再灌流時の心筋細胞壊死の度合いが軽減されていることが示された。これらの結果から、YT-146はイヌ虚血/再灌流モデルに対し、心筋組織血流量を増加させない用量でも虚血/再灌流障害からの心保護作用を示すことが出来た。また、薬物投与は、虚血時に行われていることから、虚血状態にある心筋に対してもYT-146は保護効果を発揮することが示唆された。

YT-146 0.3 µg/kg/min投与群の心筋梗塞サイズの縮小効果は35.0%に留まり、前節でのYT-146を急速静脈内投与した場合のその縮小には及ばなかった。そこで、再灌流直後の急速静脈内投与による心筋組織血流量増加作用と、再灌流後の持続静脈内投与による作用の組み合わせについて検討した。その結果、YT-146の急速静脈内投与と持続静脈内投与の組合せで、再灌流5分後の心筋組織血流量を増加させるとともに、心筋梗塞サイズを縮小した。その心筋梗塞サイズの縮小効果は、それぞれの単独投与群での効果よりも高いものであった。以上の結果から、2つの投与方法を組み合わせることで、治療効果の高い心保護効果を得ることができた。

## 小活

1. アデノシン A<sub>2</sub> 受容体アゴニストの YT-146 を静脈内投与することにより、用量依存的な冠血流量の増加が確認された。
2. イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルで再灌流直前の YT-146 急速静脈内投与により、再灌流直後の反応性充血を用量依存的に増加させることが出来た。
3. イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルに対する再灌流直前の YT-146 急速静脈内投与により、再灌流 5 時間後の心筋梗塞サイズが用量依存的に縮小され、虚血/再灌流による血漿中のクレアチンキナーゼ活性の上昇も軽減された。心筋梗塞サイズの縮小の程度は、虚血プレコンディショニング効果によるものと同程度であった。この YT-146 の投与は全身血行動態に影響しなかった。
4. イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルで、心筋組織血流量を増加させない用量の YT-146 を再灌流時に持続静脈内投与しても、再灌流 5 時間後の心筋梗塞サイズを縮小させることができた。
5. イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルでの、再灌流直前の YT-146 急速静脈内投与及び再灌流後の持続静脈内投与の組合せは、再灌流 5 時間後の心筋梗塞サイズ縮小効果をそれぞれの単独処置よりも大きくした。

## 第2章 ラット摘出心 Langendorff 灌流標本を用いた YT-146 の心筋直接的な保護作用の検討

前章で、*in vivo* イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルでの YT-146 の静脈内投与は心筋梗塞後の組織障害を軽減することを示した。このアデノシン A<sub>2</sub> 受容体アゴニストの *in vivo* 虚血/再灌流障害への心保護作用の機序は、アデノシン A<sub>2</sub> 受容体刺激を介する冠血流量増加作用であり<sup>35)</sup>、その結果、YT-146 は再灌流直後の反応性充血を亢進させ、虚血/再灌流時の心保護作用を表わすと考えられた。加えて、アデノシン A<sub>2</sub> 受容体アゴニストは好中球の活性化及び血小板凝集を抑制することが報告されている<sup>26,27,35,50)</sup>。これらの作用は組織血流保持による心筋への酸素を含めたエネルギー基質供給の維持あるいは再灌流時に出現する心筋細胞への攻撃因子の抑制など、心筋細胞以外への働きかけによる間接的な心筋保護作用と考えられる。その一方で、YT-146 は再灌流 15 分前の虚血状態から、再灌流 60 分後までの 75 分間の持続投与でも、再灌流初期の冠血流量を増加させることなく心筋梗塞サイズを一部縮小させることに成功した。さらに、十分に心筋組織血流が改善されていない状態の心筋で、梗塞巣の一部を縮小させることが可能であることも示した。これらの結果より、YT-146 は心筋組織血流量の増加には依存しない心保護作用を発揮することが考えられた。しかしながら、虚血/再灌流障害に対し、YT-146 の心筋への直接的な保護作用の有無については不明である。

そこで、本章では、ラット摘出心の Langendorff 定圧灌流標本を用いて虚血/再灌流時の心収縮不全に及ぼす YT-146 の効果について検討した。本実験では、好中球等の血液成分が心機能および心筋代謝へ与える影響を避けるため、血液の代わりに Krebs-Henseleit 緩衝液で摘出心臓を灌流した。加えて、YT-146 処置により誘発される心筋保護作用に関与するアデノシン受容体サブタイプについて検討するために、YT-146 と様々なアデノシン受容体アンタゴニストとの組合せ投与も行った。

虚血プレコンディショニングの心筋保護はプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化を介することが知られている。前章において、YT-146 は虚血プレコンディショニングと同様に冠血流量増加に依存しない心保護作用を示したことから、本章では YT-146 の虚血心筋保護作用に対する PKC の関与についても検討した。



## 2.1 実験材料及び方法

### 2.1.1 実験動物

雄性 Sprague-Dawley ラット（体重 250～300 g）を用いた。ラットは入荷後より試験期間を通じて、温度 23±3°C、湿度 30～80%、照明時間 12 時間（7 時点灯、19 時消灯）の条件に設定されたトーアエイヨー株式会社福島研究所内施設にて飼育した。給餌は固型飼料（F-2、株式会社船橋農場製）を自由摂取とした。また、自動給水装置を用いて上水道水を自由に摂取させた。

本研究における実験動物の管理と使用に関しては、米国 National Research Council の *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington D.C.,1996)に従った。本研究はトーアエイヨー株式会社動物実験委員会の審査及び承認を経て行った。

### 2.1.2 ラット摘出心 Langendorff 灌流標本の作製

ラットを sodium pentobarbital (30 mg/kg) 腹腔内投与で麻酔し、下肢静脈から heparin sodium を (1000 IU/kg iv) を静注した。十分に麻酔が導入されていることを確認した後、速やかに心臓を摘出し、Langendorff 灌流装置 (Technical Supply 製) に装着した。灌流液には Krebs-Henseleit 液 (NaCl 120 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucose 11mM) を用い、70±5 mmHg の定圧下で灌流を行った。灌流液は 37°C に加温し、混合ガス (95% : O<sub>2</sub>, 5% : CO<sub>2</sub>) を通気させて酸素分圧を 600 mmHg に保った。Langendorff 灌流装置の流路に設置した流量測定プローブ (FF-030T、日本光電製) を介し、電磁血流計 (MFV-3700、日本光電製) にて冠動脈灌流量 (coronary flow, CF) を測定した。左心房から左心室に生理食塩液を満たしたラテックスバルーン (LB2.0、テスコ製) を挿入し、圧トランスデューサー (DX-360、Ohmeda 製) を介して歪圧カンプ (AP-601G、日本光電製) にて左心室内圧を測定した。心拍数は瞬時心拍計 (AT-600G、日本光電製) を用い、左室内圧波より算出した。また、左室拡張末期圧は 5～10 mmHg の初期値となるよう、ラテックスバルーンの膨らみにより調整した。左心房に電極を設置し、電気刺激装置 (SEN-7103、日本光電製) を用いて 150 bpm にて心臓をペーシングした。血行動態及び CF はマルチチャンネルレコーダー (WR3701、グラフテック製) に連続的に記録した。左心室発生圧 (left ventricular developed pressure, LVDP) は左心室収縮期圧 (left ventricular systolic pressure, LVSP) から、左心室拡張末期圧 (left ventricular end diastolic pressure, LVEDP) を差し引くことにより算出した。

### 2.1.3 灌流液中クレアチンキナーゼ活性の評価

再灌流時に心臓から流出した灌流液を採取し、左心室筋から漏出した CK 活性を測定した。灌流液中の CK 活性は市販の測定キット (L タイプワコーCK、和光純薬製) を用い、生化学分析装置 (CL-8000、島津製作所製) にて測定した。再灌流時に CK 活

性を経時的に測定し、60 分間の再灌流における曲線下面積 (AUC) を算出し、心臓から逸脱した全酵素活性とした。

#### 2.1.4 試験プロトコール

##### 2.1.4.1 摘出灌流心臓への YT-146 投与及び虚血/再灌流

Fig.18 に試験プロトコールの概略を示す。20 分間の通常灌流による心機能安定化の後、Langendorff 灌流装置の流路に設置した活栓より、持続注入器 (Model-22、Harvard 製) を用いて、溶媒あるいは YT-146 (終濃度 0.03、0.1、0.3  $\mu\text{M}$ ) を冠動脈灌流量の 1/100 の液量で灌流液に添加した。薬剤を含む灌流液で 10 分間灌流した後、30 分間心臓への灌流液供給を完全に停止することにより、心筋虚血を作製した。その後、灌流液の供給を再開させることにより、60 分間の再灌流を行った。

##### 2.1.4.2 YT-146 の虚血心筋保護作用に寄与するアデノシン受容体サブタイプの関与

虚血前 20 分間の通常灌流による心機能安定化の後、上記経路を介して、YT-146 (終濃度 0.3  $\mu\text{M}$ ) と、各種アデノシン受容体サブタイプのアンタゴニストとの組合せ処置を行った。アデノシン  $A_1$  受容体アンタゴニスト 8-cyclopentyl-1,3-dipropyl xanthine (DPCPX) は、0.1  $\mu\text{M}$ 、アデノシン  $A_{2A}$  受容体アンタゴニスト 1,3,7-trimethyl-8-(3-chlorostyryl)xanthine (CSC) は、1.0  $\mu\text{M}$ 、アデノシン  $A_{2B}$  受容体アンタゴニスト alloxazine は、0.3  $\mu\text{M}$  及びアデノシン  $A_3$  受容体アンタゴニスト MRS-1191 は 1.0  $\mu\text{M}$  を灌流液に添加した。これら薬物を含む灌流液で 10 分間摘出心臓を灌流した後、上記と同様に虚血/再灌流を行った。

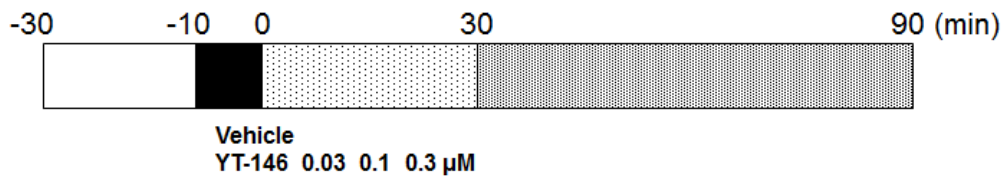
##### 2.1.4.3 YT-146 の虚血心筋保護作用に対する PKC の関与

虚血前 20 分間の通常灌流による心機能安定化の後、上記経路を介して、YT-146 (0.3  $\mu\text{M}$ ) 及び PKC 阻害薬 chelerythrine (1.0  $\mu\text{M}$ ) を冠動脈灌流量の 1/100 の液量で灌流液に添加した。薬物を含む灌流液で 10 分間灌流した後、上記と同様に虚血/再灌流を行った。

#### 2.1.5 統計処理

試験結果は平均値 $\pm$ 標準誤差にて表した。統計学的解析は EXSAS (Arm Systemex 製) を用いて行った。有意差の検定には一元配置分散分析または二元配置分散分析を行い、必要に応じて Dunnett または Tukey の多重比較を用いた。検定は 95% の信頼度 ( $p<0.05$ ) をもって有意差ありと判定した。

Ischemia/reperfusion YT-146 treatment



YT-146 + adenosine receptor antagonist or PKC inhibitor treatment

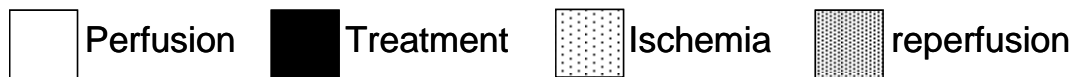
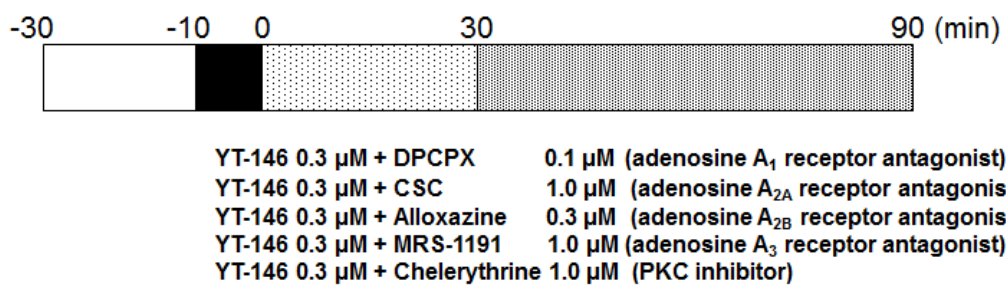


Fig. 18. Perfusion protocol of isolated rat hearts.

## 2.2 結果

### 2.2.1 YT-146 の虚血前投与による心筋直接的な保護作用の検討

#### 2.2.1.1 YT-146 による冠動脈灌流量への影響

YT-146 を虚血前投与した時のラット摘出灌流心臓の冠動脈灌流量 (CF) を Table.1 に示す。YT-146 投与前 (Baseline) の各群の CF は 17.2~17.7 mL/min で、いずれも薬物処置を行っていない vehicle 群のそれと同様の値となった。YT-146 を 0.03、0.1 及び 0.3  $\mu\text{M}$  の濃度で投与すると、CF は用量依存的に増加した (Post agent)。再灌流終了時 (Rep 60 min) に vehicle 群の CF は 6.2 mL/min まで減少したが、YT-146 0.1 及び 0.3  $\mu\text{M}$  投与群では vehicle 群のそれよりも高値を示した。

TABLE 1. Changes in the coronary flow value of the perfused hearts (mL/min)

Groups	Baseline	Post agent	Rep 5 min	Rep 10 min	Rep 30 min	Rep 60 min
Vehicle	17.7 $\pm$ 1.1	17.0 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.8	6.8 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 0.7
YT-146 0.03 $\mu\text{M}$	17.2 $\pm$ 0.3	21.7 $\pm$ 1.3 *	8.7 $\pm$ 0.2 *	8.2 $\pm$ 0.3	8.2 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.6
YT-146 0.1 $\mu\text{M}$	17.3 $\pm$ 0.6	27.7 $\pm$ 1.0 *	10.0 $\pm$ 0.4 *	10.5 $\pm$ 0.3 *	9.8 $\pm$ 0.4 *	8.8 $\pm$ 0.4 *
YT-146 0.3 $\mu\text{M}$	17.3 $\pm$ 0.8	30.2 $\pm$ 0.6 *	12.0 $\pm$ 0.4 *	11.8 $\pm$ 0.5 *	11.0 $\pm$ 0.9 *	10.5 $\pm$ 0.8 *

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments.

\* significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ).

### 2.2.1.2 YT-146 による再灌流後の左心室発生圧に及ぼす効果

虚血/再灌流時、灌流心臓の心収縮力の指標である左心室発生圧 (LVDP) を Fig.19 に示す。虚血前の各実験群の LVDP は 144.7~152.2 mmHg となり、いずれの実験群間でも同様の心収縮力であった。つまり、YT-146 が正常灌流の心収縮力に直接影響することは無いことが示された。虚血の開始後 3 分以内に、LVDP は 0 mmHg に低下し、虚血期間中は 0 mmHg (拍動停止状態) で推移した。再灌流開始後、vehicle 群の LVDP は徐々に回復し、再灌流終了時のそれは虚血前値の約 30% となった。一方、0.1 及び 0.3  $\mu$ M YT-146 虚血前投与により、再灌流終了後の LVDP 回復は促進され、それぞれ虚血前値の約 40% 及び 60% まで回復した。

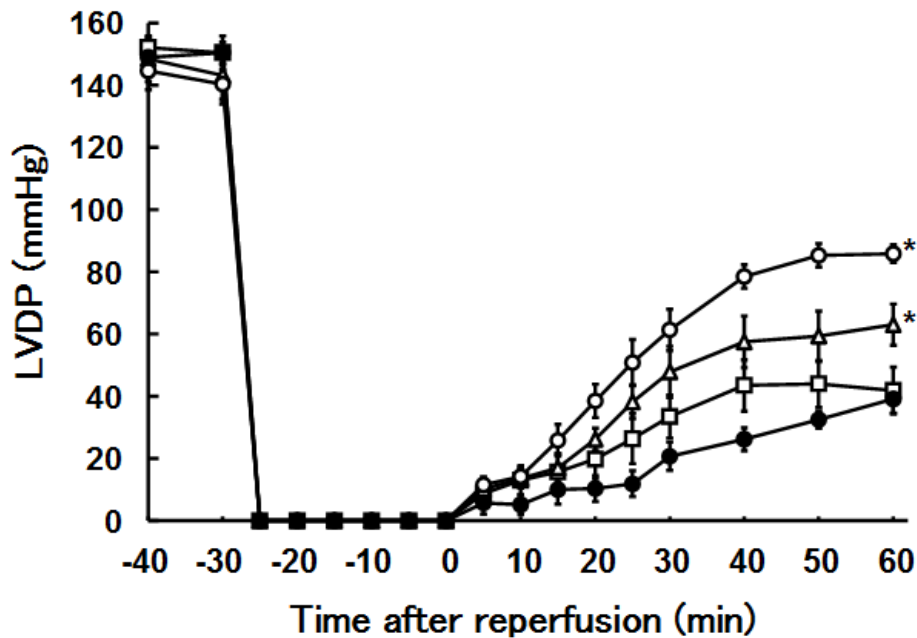


Fig. 19. Time course of change in LVDP of the 30-min ischemic/60-min reperfusion. Data are shown for vehicle treated control hearts (●), hearts treated before ischemia with YT-146 0.03  $\mu$ M (□), 0.1  $\mu$ M (Δ) and 0.3  $\mu$ M (○). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ).

### 2.2.1.3 YT-146 による虚血/再灌流時の左心室拡張末期圧に及ぼす効果

灌流心臓の虚血/再灌流時における左心室拡張末期圧 (LVEDP) を Fig.20 に示す。Vehicle 群の LVEDP 値は虚血開始後上昇した。LVEDP は、再灌流開始直後にさらに上昇し、その 5 分後に最大値 ( $135\pm 5.7$  mmHg) に達した。LVEDP は再灌流時間の経過とともに斬減したが、再灌流終了時でも  $82.3\pm 1.7$  mmHg の高値となり、再灌流心臓での拡張障害の誘発が示された。一方、 $0.1$  及び  $0.3$   $\mu\text{M}$  YT-146 投与群では虚血/再灌流時の LVEDP 上昇が vehicle 群のそれよりも抑制され、再灌流 5 分後にはそれぞれ  $101.0\pm 6.1$  及び  $98.2\pm 10.8$  mmHg を、再灌流終了時に値はそれぞれ  $53.5\pm 4.8$  及び  $51.7\pm 4.4$  mmHg の低値となり、再灌流時の心筋拡張能の改善が示された。

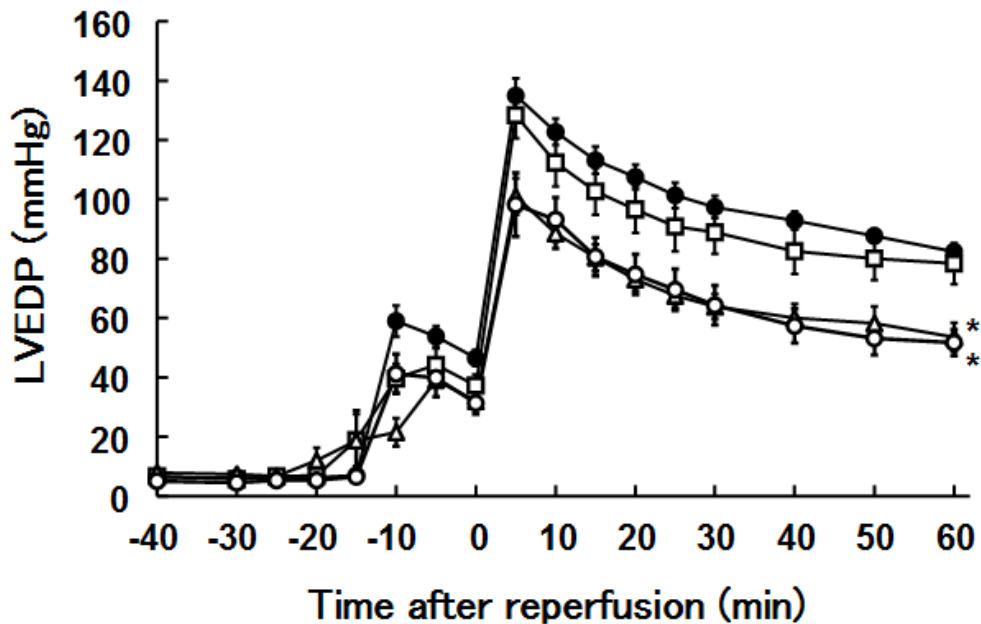


Fig. 20. Time course of change in LVEDP of the 30-min ischemic/60-min reperfusion. Data are shown for vehicle treated control hearts (●), hearts treated before ischemia with YT-146  $0.03$   $\mu\text{M}$  (□),  $0.1$   $\mu\text{M}$  (Δ) and  $0.3$   $\mu\text{M}$  (○). Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group ( $p<0.05$ ).

#### 2.2.1.4 YT-146 による再灌流心臓から灌流液中へ遊離したクレアチンキナーゼ活性への効果

再灌流心臓から灌流液へ流出した全クレアチンキナーゼ (CK) 活性を Fig.21 に示す。Vehicle 群の灌流液中の CK 活性は  $15.9 \pm 1.8 \times 10^4$  IU であった。YT-146 処置群では、CK 活性が薬物投与量に応じて低下し、0.3  $\mu$ M 投与群では vehicle 群のその約 50% となった。

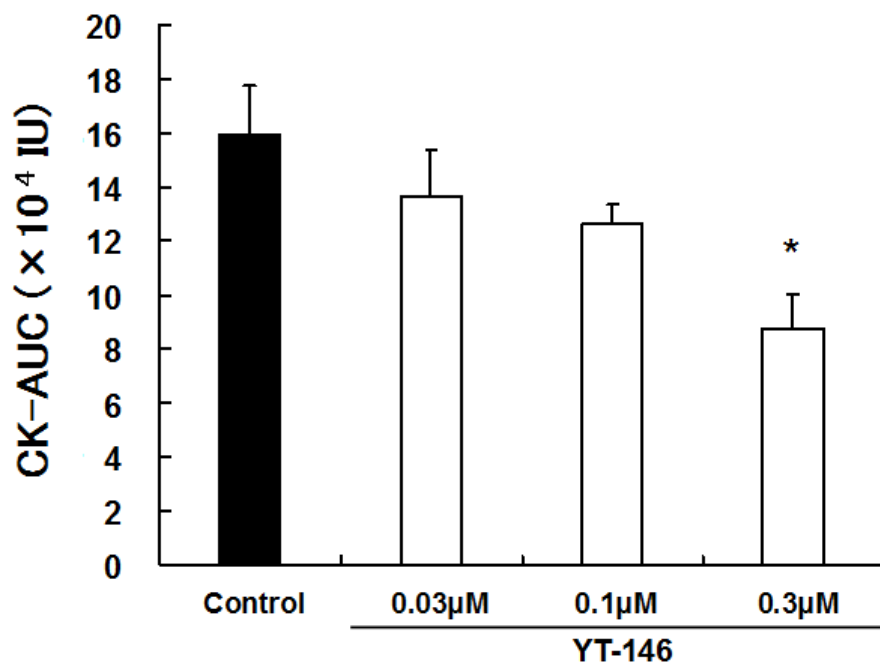


Fig. 21. Effects of YT-146 on AUC of creatine kinase calculated from the activity and amount of coronary effluent during 60-min of reperfusion. Hearts were either vehicle treated control or treated with YT-146 at dose of 0.03  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M and 0.3  $\mu$ M. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ).

以上の結果から、YT-146 0.03  $\mu$ M 投与群では、虚血前の CF を増加させたが、再灌流時の CF、LVDP 及び LVEDP 値を改善せず、かつ再灌流心臓からの CK 遊離を抑制しなかった。YT-146 0.1  $\mu$ M 投与群では再灌流時の CF 及び LVDP の有意な増加と LVEDP 上昇は軽減したものの、再灌流時の CK 活性上昇を減少させる傾向に留まった。一方、YT-146 0.3  $\mu$ M 投与群ではこれら評価指標の全てで改善が認められたことから、以降の実験で灌流心臓に作用させる YT-146 濃度を 0.3  $\mu$ M とした。

## 2.2.2 YT-146 の心筋直接的な保護作用に寄与するアデノシン受容体サブタイプの検討

### 2.2.2.1 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による冠動脈灌流量に及ぼす効果

虚血/再灌流障害に対する YT-146 による心筋保護に関与するアデノシン受容体について検討するため、アデノシン受容体サブタイプへのアンタゴニスト DPCPX (A<sub>1</sub> アンタゴニスト)、CSC (A<sub>2A</sub> アンタゴニスト)、alloxazine (A<sub>2B</sub> アンタゴニスト) あるいは MRS-1191 (A<sub>3</sub> アンタゴニスト) のいずれかを YT-146 と同時投与した。各アンタゴニストを同時投与した時の CF 値を Table.2 に示す。

DPCPX、alloxazine あるいは MRS-1191 は、YT-146 投与による虚血前の CF 増加に影響しなかった。一方、CSC は YT-146 による CF 増加を抑制した。

再灌流時の CF は、CSC 及び alloxazine 同時投与群で YT-146 単独投与群と同程度に保持され、vehicle 群と比較して有意な高値を示した。一方、DPCPX 同時投与群の CF は YT-146 単独投与群のそれよりも低値になった。MRS-1191 同時投与群の CF 値は、vehicle 群のそれと同様の値となった。

TABLE 2. Changes in the coronary flow value of the perfused hearts (mL/min)

Groups	Baseline	Post agent	Rep 5 min	Rep 10 min	Rep 30 min	Rep 60 min
Vehicle	17.7 ± 1.1	17.0 ± 0.6	7.0 ± 0.6	7.3 ± 0.8	6.8 ± 0.5	6.2 ± 0.7
YT-146 (0.3 μM)	17.3 ± 0.8	30.2 ± 0.6 <sup>*</sup>	12.0 ± 0.4 <sup>*</sup>	11.8 ± 0.5 <sup>*</sup>	11.0 ± 0.9 <sup>*</sup>	10.5 ± 0.8 <sup>*</sup>
YT-146 + DPCPX	18.3 ± 1.0	28.3 ± 0.5 <sup>*</sup>	7.3 ± 0.8 <sup>#</sup>	6.7 ± 0.2 <sup>#</sup>	7.0 ± 0.7 <sup>#</sup>	5.8 ± 0.7 <sup>#</sup>
YT-146 + CSC	18.2 ± 0.7	14.3 ± 0.4 <sup>#</sup>	9.8 ± 0.4 <sup>*</sup>	10.0 ± 0.4 <sup>*</sup>	10.2 ± 0.7 <sup>*</sup>	9.7 ± 0.6 <sup>*</sup>
YT-146 + Alloxazine	17.3 ± 0.6	26.5 ± 0.4 <sup>*</sup>	10.2 ± 0.5 <sup>*</sup>	9.8 ± 0.4 <sup>*</sup>	9.7 ± 0.2 <sup>*</sup>	9.2 ± 0.2 <sup>*</sup>
YT-146 + MRS1191	16.8 ± 1.1	28.5 ± 0.7 <sup>*</sup>	10.5 ± 0.4 <sup>*</sup>	10.0 ± 0.3 <sup>*</sup>	9.0 ± 0.3	7.7 ± 0.3

Each value represents the mean ± S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group (p<0.05). #, significantly different from the YT-146 alone treated group (p<0.05).



### 2.2.2.2 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による左心室発生圧に及ぼす効果

アデノシン A<sub>1</sub>、A<sub>2A</sub>、A<sub>2B</sub> 及び A<sub>3</sub> 受容体のアンタゴニストと YT-146 の組合せ投与した時の虚血/再灌流時における左心室発生圧 (LVDP) を Fig.22 に示す。CSC、alloxazine あるいは MRS-1191 の同時投与は YT-146 による再灌流終了時の LVDP 回復促進に影響を与えず、それぞれ虚血前値の 55.9±5.1、52.1±1.9 及び 47.5±1.7% となった。一方、DPCPX との組合せ投与では、YT-146 による再灌流時の LVDP 回復は打ち消され、vehicle 群のそれと同様の 31.7±4.6% となった。

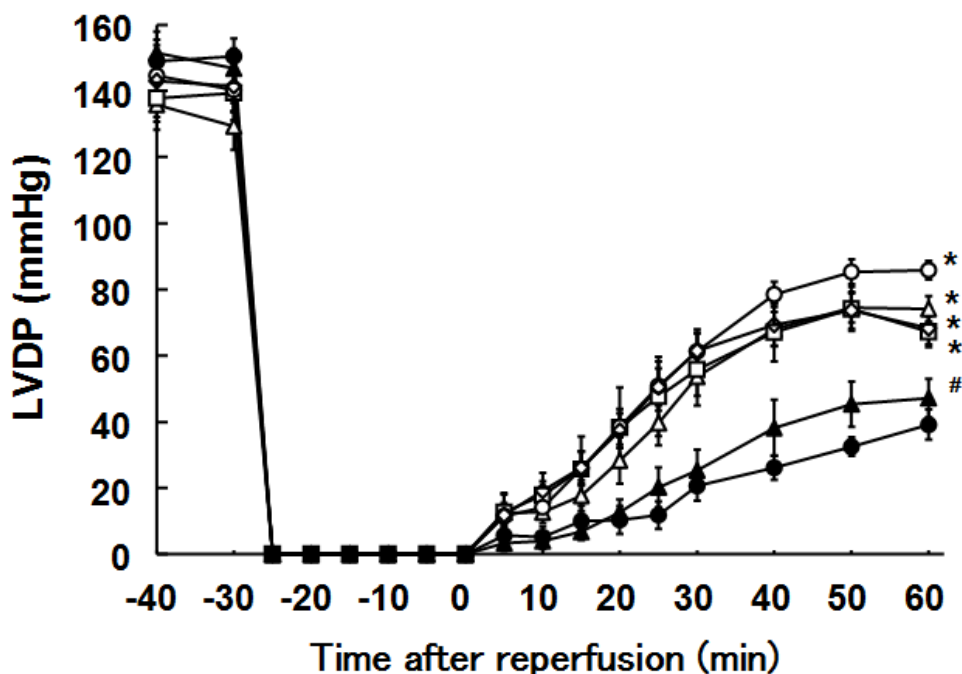


Fig. 22. Time course of change in LVDP of the 30-min ischemic/60-min reperfusion. Data are shown for vehicle treated control hearts (●), hearts treated before ischemia with YT-146 0.3 μM (○), YT-146 0.3 μM + A<sub>1</sub> AR antagonist DPCPX 0.1 μM (▲), YT-146 0.3 μM + A<sub>2A</sub> AR antagonist CSC 1.0 μM (△), YT-146 0.3 μM + A<sub>2B</sub> AR antagonist alloxazine 0.3 μM (□) and YT-146 0.3 μM + A<sub>3</sub> AR antagonist MRS1191 1.0 μM (◇). Each value represents the mean±S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group (p<0.05). #, significantly different from the YT-146 alone treated group (p<0.05).

### 2.2.2.3 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による左心室拡張末期圧に及ぼす効果

アデノシン A<sub>1</sub>、A<sub>2A</sub>、A<sub>2B</sub> 及び A<sub>3</sub> 受容体アンタゴニストを YT-146 の組合せ投与した時の左心室拡張末期圧 (LVEDP) を Fig.23 に示す。CSC、alloxazine あるいは MRS-1191 との組合せ投与は YT-146 による再灌流時の LVEDP への効果に影響を与えなかった。一方、DPCPX との組合せ投与を行うと、YT-146 の LVEDP 上昇を軽減させる効果は消失した。

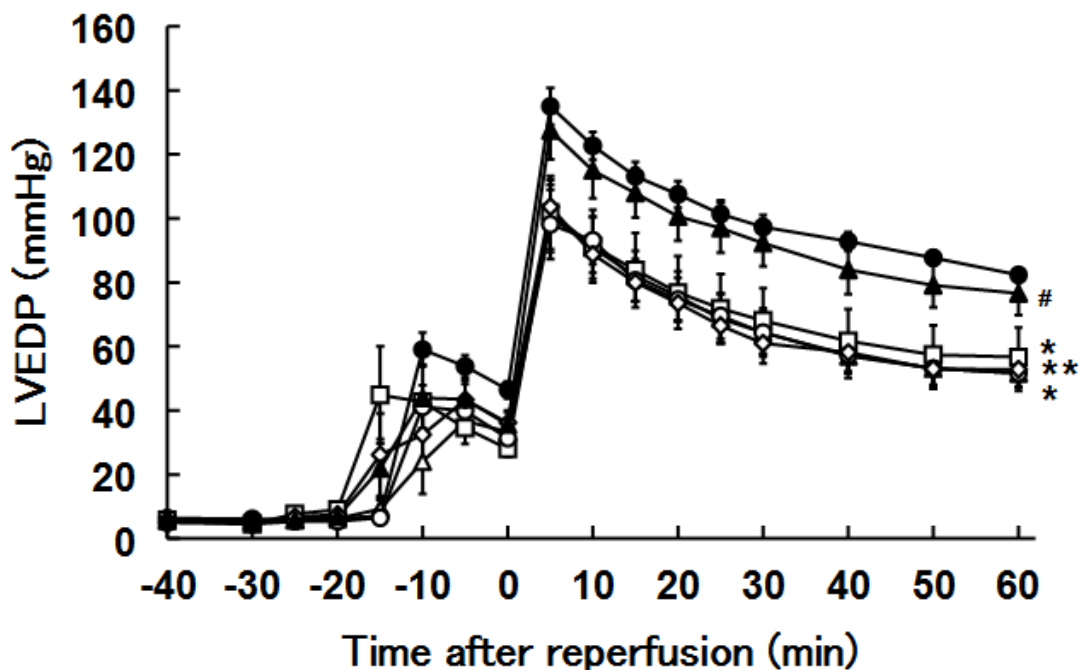


Fig. 23. Time course of change in LVEDP of the 30-min ischemic/60-min reperfusion. Data are shown for vehicle treated control hearts (●), hearts treated before ischemia with YT-146 0.3  $\mu$ M (○), YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>1</sub> AR antagonist DPCPX 0.1  $\mu$ M (▲), YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>2A</sub> AR antagonist CSC 1.0  $\mu$ M (Δ), YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>2B</sub> AR antagonist alloxazine 0.3  $\mu$ M (□) and YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>3</sub> AR antagonist MRS1191 1.0  $\mu$ M (◇). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group (p < 0.05). #, significantly different from the YT-146 alone treated group (p < 0.05).

#### 2.2.2.4 YT-146 とアデノシン受容体アンタゴニスト組合せ投与による再灌流液中クレアチンキナーゼ活性に及ぼす効果

再灌流心臓から流出したクレアチンキナーゼ (CK) 活性を Fig.24 に示す。CSC、alloxazine あるいは MRS-1191 との組合せ投与は YT-146 による再灌流時に心臓から灌流液中に流出した CK 活性の低下に影響しなかった。一方、DPCPX との同時投与では YT-146 処置を行ったにも関わらず、vehicle 群のそれと同様の CK 活性となった。

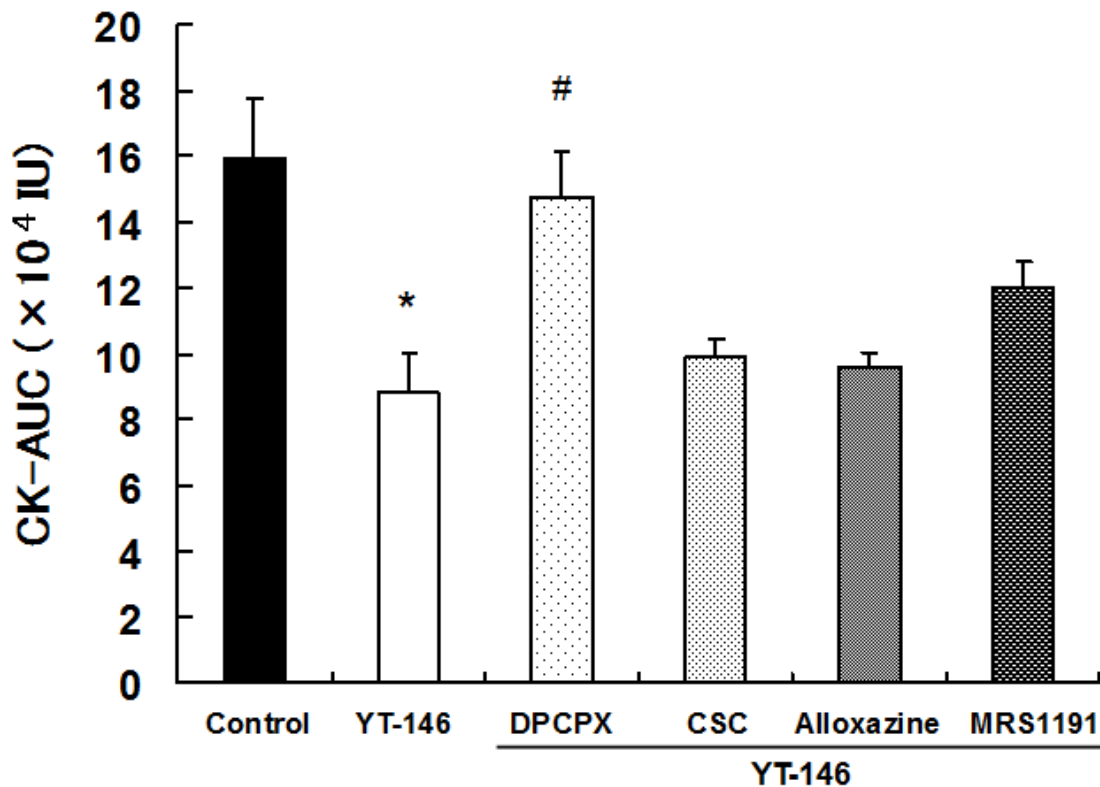


Fig. 24. AUC of creatine kinase calculated from the activity and amount of coronary effluent during 60-min of reperfusion. Hearts were either vehicle treated control or treated with YT-146 0.3  $\mu$ M, YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>1</sub> AR antagonist DPCPX 0.1  $\mu$ M, YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>2A</sub> AR antagonist CSC 1.0  $\mu$ M, YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>2B</sub> AR antagonist alloxazine 0.3  $\mu$ M, YT-146 0.3  $\mu$ M + A<sub>3</sub> AR antagonist MRS1191 1.0  $\mu$ M. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group (p<0.05). #, significantly different from the YT-146 alone treated group (p<0.05).

## 2.2.3 YT-146 の心保護作用に対する PKC の関与

### 2.2.3.1 YT-146 と PKC 阻害薬組合せ投与による冠動脈灌流量への効果

YT-146 による心保護効果への PKC の関与について検討するため、PKC 阻害薬の chelerythrine を YT-146 と組合せ投与した。試験の結果、chelerythrine は YT-146 投与時 (Post agent) の冠動脈灌流量 (CF) 増加に影響を与えなかった。その一方で、PKC 阻害薬と YT-146 の組合せ投与群では、再灌流後 (Rep 60 min) の CF が YT-146 単独投与群のそれよりも低値を示した (Table.3)。

TABLE 3. Changes in the coronary flow value of the perfused hearts (mL/min)

Groups	Baseline	Post agent	Rep 5 min	Rep 10 min	Rep 30 min	Rep 60 min
Vehicle	17.7 ± 1.1	17.0 ± 0.6	7.0 ± 0.6	7.3 ± 0.8	6.8 ± 0.5	6.2 ± 0.7
YT-146 (0.3 μM)	17.3 ± 0.8	30.2 ± 0.6	12.0 ± 0.4	11.8 ± 0.5	11.0 ± 0.9	10.5 ± 0.8
YT-146 + Chelerythrine	17.2 ± 0.5	27.8 ± 0.5 *	7.5 ± 0.2 <sup>#</sup>	7.2 ± 0.3 <sup>#</sup>	7.2 ± 0.7 <sup>#</sup>	6.2 ± 0.7 <sup>#</sup>

Each value represents the mean ± S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group (p<0.05). #, significantly different from the YT-146 alone treated group (p<0.05).

### 2.2.3.2 YT-146 と PKC 阻害薬組合せ投与による左心室発生圧及び左心室拡張末期圧への効果

Chelerythrine と YT-146 を組合せ投与した時の虚血/再灌流時における左心室発生圧 (LVDP) を Fig.26 (a) に、左心室拡張末期圧 (LVEDP) を Fig.26 (b) に示す。YT-146 による再灌流後の LVDP 回復促進効果は chelerythrine の同時投与により消失した。YT-146 による再灌流時の LVEDP 上昇抑制効果も chelerythrine との組合せ投与で消失傾向を示した。

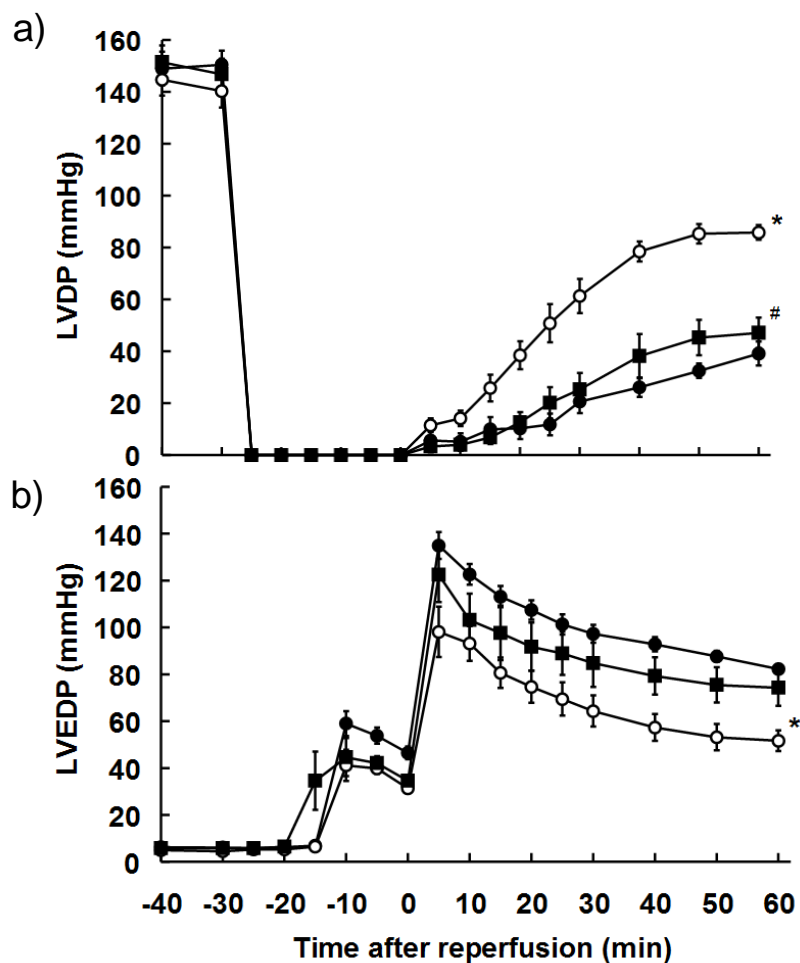


Fig. 26. Time course of change in LVDP (a) and LVEDP (b) of the 30-min ischemic/60-min reperfusion. Data are shown for vehicle treated control hearts (●), hearts treated before ischemia with YT-146 0.3 μM (○), YT-146 0.3 μM + PKC inhibitor chelerythrine 1.0 μM (■). Each value represents the mean±S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group (p<0.05). #, significantly different from the YT-146 alone treated group (p<0.05).

### 2.2.3.3 YT-146 と PKC 阻害薬組合せ投与による再灌流液中のクレアチンキナーゼ活性への効果

再灌流心臓から灌流液中に流出したクレアチンキナーゼ (CK) 活性を Fig.27 に示す。YT-146 による CK 活性の低下は chelerythrine との組合せ投与により消失し、vehicle 群のそれと同様の値となった。

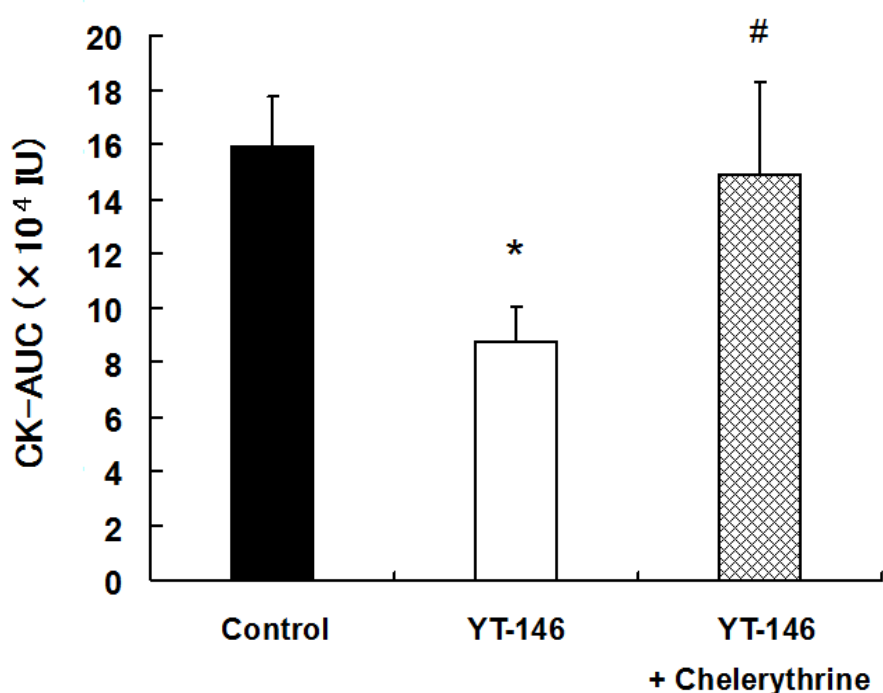


Fig. 27. AUC of creatine kinase calculated from the activity and amount of coronary effluent during 60-min of reperfusion. Hearts were either vehicle treated control or treated with YT-146 0.3  $\mu$ M, YT-146 0.3  $\mu$ M + PKC inhibitor chelerythrine 1.0  $\mu$ M. Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 experiments. \*, significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ). #, significantly different from the YT-146 alone treated group ( $p < 0.05$ ).

## 2.3 考察

本章では、血液成分を含まない塩類緩衝液（Krebs-Henseleit 緩衝液）を用いてラット摘出心臓を灌流し、虚血/再灌流を行った。その結果、YT-146 処置により、薬物の用量依存的に再灌流時の心機能回復が促進されることを見出した。同時に、YT-146 は再灌流後の LVEDP 上昇を抑制し、かつ灌流実験で心筋細胞壊死の指標とされる心筋組織からのクレアチンキナーゼ逸脱を減少させた。これらの結果から、YT-146 の虚血前投与が、虚血に対して心筋への直接的な保護作用を発揮し、灌流心への虚血/再灌流障害を軽減したと考えられた。

前章の研究で、*in vivo* イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルで YT-146 の静脈内投与が心筋梗塞サイズを縮小させることを示した。YT-146 は、アデノシン受容体  $A_{2A}$  受容体への親和性が高く、この受容体刺激を介して抗炎症作用を示し、再灌流障害に対する心保護効果を発揮すると考えられた。しかしながら、アデノシン  $A_{2A}$  受容体は主に好中球<sup>51,52)</sup>、T-リンパ球<sup>53)</sup>及び心筋肥満細胞で発現することから<sup>54)</sup>、その心保護作用は *in vivo* 実験条件での虚血/再灌流障害モデルで観察される。その一方で、アデノシン  $A_{2A}$  受容体アゴニストが、心筋組織に直接作用した時の心筋保護の有無については未だに不明である。Cargnoni らは選択的なアデノシン  $A_{2A}$  受容体アゴニストの CGS21680 が、緩衝液で灌流したウサギ心臓の虚血/再灌流障害に対し心筋保護作用を示すことを報告した<sup>55)</sup>。Reid らも心筋のアデノシン  $A_{2A}$  受容体刺激が p44/42ERK の活性化を介し、虚血/再灌流障害に対して心筋保護作用を示すことを報告した<sup>56)</sup>。その一方で、Finegan らや、Zucchi らは、本実験のような緩衝液用いたラット摘出心の虚血/再灌流障害モデルにおいて、CGS21680 が心保護作用を示さないことを報告した<sup>57,58)</sup>。

本実験でも、YT-146 は虚血前の投与において、冠動脈拡張により CF を増加させると同時に再灌流障害を軽減し、虚血後の心機能回復を促進させた。そこで、虚血/再灌流障害への YT-146 の心保護作用におけるアデノシン  $A_{2A}$  受容体刺激の寄与について検討するため、YT-146 とアデノシン  $A_{2A}$  受容体アンタゴニスト CSC を組合せて投与した。CSC の存在下で YT-146 の CF 増加作用は完全に消失したものの、YT-146 処置による再灌流時の心機能回復の亢進は、わずかに減少するに留まった。加えて、心筋組織からの YT-146 による CK 逸脱の抑制も CSC の影響を受けなかった。本試験結果は YT-146 の虚血/再灌流障害に対する心筋直接的な保護作用にアデノシン  $A_{2A}$  受容体の寄与は小さいことを示唆した。つまり、YT-146 は冠血管や心筋のアデノシン  $A_{2A}$  受容体を刺激し、心筋組織への灌流液供給を増大させるものの、この冠灌流量の増大が再灌流時の心機能回復促進、すなわち虚血心筋保護の主たる役割ではないことを示唆した。

アデノシン  $A_2$  受容体には、アデノシン  $A_{2A}$  受容体の他にアデノシン  $A_{2B}$  受容体がある。そこで、アデノシン  $A_{2B}$  受容体の虚血心筋保護の可能性について検討した<sup>59)</sup>。

アデノシン A<sub>2B</sub> 受容体への選択的アゴニスト BAY60-6583 は、ウサギ及びラット摘出灌流心臓での虚血/再灌流障害モデルで、心筋梗塞サイズを縮小したとの報告がある<sup>60)</sup>。しかしながら、YT-146 とアデノシン A<sub>2B</sub> 受容体アンタゴニストの alloxazine を虚血前に YT-146 と組合せて投与しても、YT-146 の心保護作用は影響されなかった。受容体結合実験で YT-146 のアデノシン A<sub>2B</sub> 受容体に対する親和性は非常に低い (Ki=16,100 nM) ため<sup>61)</sup>、本実験で作用させた YT-146 の濃度では、虚血/再灌流障害に対する心筋保護作用へのアデノシン A<sub>2B</sub> 受容体の寄与は小さいと考えられた。これらの結果から、本実験系での YT-146 の心筋保護作用は、アデノシン A<sub>2</sub> 受容体を介するものではないと考えられた。

次に、アデノシン A<sub>3</sub> 受容体の虚血心筋保護への寄与について検討した。ウサギを用いた *in vivo* 試験では、アデノシン A<sub>3</sub> 受容体刺激が虚血/再灌流障害に対し心筋保護作用を示すと報告されている<sup>62,63)</sup>。Tracey らはアデノシン A<sub>3</sub> 受容体選択的アゴニストの CP-532,903 がウサギ摘出心臓を用いた虚血/再灌流実験で心筋梗塞サイズを縮小する可能性を示した<sup>64)</sup>。しかしながら、ラットではアデノシン A<sub>3</sub> 受容体遺伝子のノックアウトが虚血耐性を発揮することが報告されるなど<sup>65,66)</sup>、アデノシン A<sub>3</sub> 受容体刺激による心保護作用は未だに議論されている。なお、Carr らはヒト心房筋標本において、アデノシン A<sub>3</sub> 受容体アゴニストが虚血プレコンディショニング様作用を示すことを報告するが<sup>67)</sup>、ヒト心筋細胞でのアデノシン A<sub>3</sub> 受容体タンパク質の存在は未だ確認されていない<sup>68)</sup>。本試験において、YT-146 による虚血後の心機能回復の促進および再灌流心臓からの CK 逸脱の軽減は、アデノシン A<sub>3</sub> 受容体アンタゴニストの MRS-1191 との組合せ投与によって打ち消されなかった。つまり、本実験系では YT-146 の心筋保護作用発揮はアデノシン A<sub>3</sub> 受容体を介するものではないことが示された。

本実験では、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストの DPCPX と組合せて投与した場合のみ、YT-146 による虚血後の心機能の回復亢進及び CK 逸脱軽減などの心筋保護作用が打ち消された。様々な実験で、心臓のアデノシン A<sub>1</sub> 受容体刺激は虚血/再灌流障害から心筋を保護することが示されている<sup>31,69-71)</sup>。さらに、最も強力な虚血心筋保護作用を発揮する虚血プレコンディショニングは、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストの投与あるいは心臓のアデノシン A<sub>1</sub> 受容体遺伝子のノックアウトで減弱されることが報告される<sup>72,73)</sup>。従って、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体刺激は、心筋での虚血プレコンディショニングにおける虚血耐性獲得の機序の一つと考えられている。Lasley らはラット摘出心において、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体のアゴニストを作用させると、虚血への耐性が上昇すること報告した<sup>69)</sup>。YT-146 のアデノシン A<sub>1</sub> 受容体への親和性は Ki=202.0 nM であり<sup>61)</sup>、アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体に対するその約 1/7 とされる。この YT-146 のアデノシン A<sub>1</sub> 受容体への親和性は、アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体のそれよりは低いものの、アデノシン A<sub>2B</sub> および A<sub>3</sub> 受容体のそれらよりは高い。本実験での心臓に作用させた灌流液中の YT-146 濃度は、0.3 μM つまり 300 nM である。こ



の濃度は上述した YT-146 のアデノシン A<sub>1</sub> 受容体の K<sub>i</sub> 値にほぼ一致する。これらの結果から、ラット摘出心への虚血前投与で、YT-146 はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体を刺激することにより、虚血プレコンディショニング様の虚血耐性を示したと考えられた。

PKC は虚血プレコンディショニングによる心筋保護作用において、細胞内情報伝達で重要な役割を演ずると考えられている。そこで、YT-146 の虚血プレコンディショニング様作用の発揮への PKC の寄与について検討するため、PKC 阻害薬の chelerythrine を YT-146 と組み合わせて投与した。その結果、YT-146 による虚血後の心機能回復亢進作用は、chelerythrine の併用によって打ち消され、YT-146 による心筋保護作用の細胞内情報伝達に PKC 活性化の関与が示された。また、虚血プレコンディショニングでは、短時間虚血の間に ATP の消費により産生されたアデノシンが心筋細胞膜を透過し、細胞外へ放出される。この心筋細胞から放出されたアデノシンが、心筋細胞のアデノシン A<sub>1</sub> 受容体にオートクリンあるいはパラクリンで作用することにより、細胞内情報伝達系の PKC を活性化すると考えられている<sup>74,75)</sup>。さらに、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体刺激により、ラット心室筋細胞で PKC の活性化が確認されている<sup>76,77)</sup>。これらの知見から、YT-146 による虚血心筋保護作用は、虚血プレコンディショニングの虚血心筋保護の機序と同様に、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体刺激およびその後の PKC 活性化を介して発揮されることが示唆された。

## 小活

1. ラット摘出心臓を用いた虚血/再灌流では、YT-146 を虚血前に投与した結果、再灌流時の心機能回復が用量依存的に促進され、虚血/再灌流での左室拡張末期圧の上昇も抑制された。再灌流時の心筋組織からのクレアチンキナーゼ逸脱も軽減された。
2. YT-146 と共にアデノシン A<sub>1</sub>、A<sub>2A</sub>、A<sub>2B</sub> 及び A<sub>3</sub> 受容体アンタゴニストを同時投与したところ、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体アンタゴニストのみが虚血/再灌流障害に対する YT-146 の心筋保護作用を打ち消した。従って、YT-146 の心筋保護作用はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体刺激を介すると考えられた。
3. YT-146 と共に PKC 阻害薬を同時投与したところ、虚血/再灌流障害に対する YT-146 の心筋保護作用を打ち消した。従って、YT-146 の心筋保護作用の細胞内情報伝達に PKC 活性化の関与が示された。

### 第3章 ラット虚血/再灌流心臓における YT-146 のミトコンドリア機能への効果

虚血後の再灌流時の心筋ミトコンドリアのエネルギー産生と心筋収縮能の回復には密接な関係がある<sup>78-80)</sup>。ミトコンドリアはエネルギー産生を司るオルガネラで、心ポンプ機能発揮だけでなく、細胞生存の両者に必須である<sup>81,82)</sup>。従って、虚血/再灌流時に心筋ミトコンドリア機能を維持させることは、虚血/再灌流障害から心筋組織を保護する最も重要な機序の一つである。虚血心筋では、心筋細胞内の電解質平衡に破綻が生じ、ミトコンドリア機能が非可逆的に低下することが知られている<sup>82)</sup>。このミトコンドリア機能の破綻は、虚血心筋細胞で誘発される異常な  $\text{Na}^+$  蓄積 ( $\text{Na}^+$  過負荷) により引き起こされると考えられている<sup>7,8)</sup>。YT-146 処置が、虚血心筋での  $\text{Na}^+$  過負荷に及ぼす効果は明らかにされていない。

前章でラット摘出心臓を用いた虚血/再灌流実験で、YT-146 は虚血/再灌流障害に対し心筋保護作用を発揮することを示した。この YT-146 による心筋保護は、アデノシン  $\text{A}_2$  受容体刺激よりも、むしろアデノシン  $\text{A}_1$  受容体刺激及びその下流の PKC 活性化を介する機序によることが示唆された。つまり、この虚血心筋保護の機序は、虚血プレコンディショニングのそれと同様であることが提示された。虚血プレコンディショニングによる心筋保護の標的となるオルガネラは、ミトコンドリアと考えられている<sup>73)</sup>。しかしながら、虚血/再灌流心臓のミトコンドリア機能への YT-146 の効果については不明である。

そこで本章では、虚血及び虚血/再灌流心臓の  $\text{Na}^+$  過負荷およびミトコンドリア機能に及ぼす YT-146 の効果について検討した。

### 3.1 実験材料及び方法

#### 3.1.1 実験動物

本実験では体重 250-280 g の Wistar 系雄性ラット（日本実験動物株式会社）を用いた。飼料及び水は自由摂取とし、恒温（ $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ）、恒湿（ $55\pm 5\%$ ）定時証明（12 時間明所 7:00-19:00、12 時間暗所 19:00-7:00）の人工環境下で飼育した。

本実験における実験動物の管理と使用に関しては、米国 National Research Council の *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington D.C.,1996) に従った。本研究は東京薬科大学動物実験委員会にて実験計画の審査及び承認を経て行われた。

#### 3.1.2 ラット摘出心 Langendorff 灌流標本の作製

ラットを diethyl ether で麻酔後、速やかに心臓を取り出した。摘出心臓を Langendorff 灌流装置に装着し灌流を開始した。灌流には Krebs-Henseleit 緩衝液（120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , and 11 mM glucose）を用い、定流量（9 mL/min）で行った。灌流液は  $37^{\circ}\text{C}$  に加温し、混合ガス（95% :  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ ）を飽和させ、pH は 7.40 に保った。

左心房を介して左心室に生理食塩液を満たしたラテックスバルーン（3.7 mm）を挿入し、圧トランスデューサー（TP-200、日本光電製）を介して歪圧力アンプ（AP-621G、日本光電製）にて左心室内圧を測定した。心拍数は瞬時心拍計（AT-601G、日本光電製）を用い、左室内圧波より算出した。摘出心の灌流圧は動脈に接続したカニューレの分枝を介して、圧トランスデューサー（TP-200、日本光電製）及び歪圧力アンプ（AP-621G、日本光電製）にて測定した。左室拡張末期圧は 5 mmHg の初期値となるよう、ラテックスバルーンの内圧を調整して負荷した。左心房に電極を設置し、電気刺激装置（SEN-7203、日本光電製）を用いて 300 bpm にて心臓をペーシングし、標本の安定化を 30 分間行った。血行動態は熱ペンレコーダー（WT-645G、日本光電製）にて連続的に記録した。左心室発生圧（LVDP）は左心室収縮期圧（LVSP）から、左心室拡張末期圧（LVEDP）を差し引くことにより算出した。

#### 3.1.3 試験プロトコール

試験プロトコールを Fig.29 に示す。30 分間の通常灌流による安定化の後、心臓への灌流液の供給を停止して虚血を導入した。虚血中の心臓は、11 mM glucose の代わりに 11 mM Tris-HCl で置換し、混合ガス（95% :  $\text{N}_2$ 、5% :  $\text{O}_2$ ）で平衡化させた Krebs-Henseleit 緩衝液中に浸され、組織温の低下による心筋保護を避けるため、緩衝液温を  $37^{\circ}\text{C}$  に維持した。30 分の虚血の後、心臓への灌流液供給を再開し、心臓を 60 分間再灌流した。再灌流初期の心室細動発生を回避するために再灌流開始から 15 分間は停止した以外は、心臓に装着した電極で刺激すること（心臓ペーシング）で 1 min

当たり 300 回の収縮弛緩を灌流心臓に行わせた。

前章と同様に、YT-146 は Krebs-Henseleit 緩衝液に溶解し、大動脈に通じるカニューレから終濃度 0.3  $\mu\text{M}$  で虚血 10 分前から虚血開始時までの 10 分間のみ作用させた。正常灌流群では、正常酸素分圧下にて YT-146 有りあるいは無しの条件で 90 分間の灌流を行った (normoxic group)。

### 3.1.4 心筋細胞内 $\text{Na}^+$ 含量の定量

心筋細胞  $\text{Na}^+$  含量は既報に従って測定した<sup>8)</sup>。虚血、再灌流あるいは正常酸素灌流終了時に氷冷した

320 mM sucrose、20 mM Tris-HCl (pH7.4) で心臓を 1 分間灌流することで、血管内腔および細胞外領域の灌流液を洗い流した。心臓から左心室壁の一部を採取し、細切後、120°C で 24 時間乾燥させた。乾重量を測定後、組織を 60%  $\text{HNO}_3$  にて 180°C で消化・蒸発乾固させた。残渣を 0.75N  $\text{HNO}_3$  で懸濁し、原子吸光光度計 (AA-680、Shimadzu, Kyoto Japan) を用いて心筋細胞  $\text{Na}^+$  含量を測定した。

### 3.1.5 ミトコンドリアの単離と $\text{Na}^+$ 含量の定量

虚血前、虚血後及び再灌流後の心臓から左心室壁の一部を採取し、氷冷した緩衝液 (180 mM KCl, 0.5% fatty acid-free BSA, 10 mM EDTA (pH 7.4)) 中にて細切後に、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。得られたホモジネートを 2°C、800×g で 10 分間遠心した後、その上清をさらに 2°C、8000×g で 10 分間遠心した。得られた沈殿を sucrose 緩衝液 (320 mM sucrose, 0.25% BSA, 20 mM Tris-HCl (pH 6.8)) で懸濁し、ミトコンドリア画分を得た。

ミトコンドリア画分の  $\text{Na}^+$  含量は 3.1.4 記載の方法で原子吸光光度計にて測定した。ミトコンドリア画分のタンパク質量は Lowry 法で測定した。

### 3.1.6 心筋組織 ATP 及びクレアチンリン酸の定量

心筋の ATP 及び creatine phosphate (CrP) 含量を既報に従って測定した<sup>83)</sup>。正常灌流後、虚血終了時あるいは再灌流終了時に、心臓をあらかじめ液体窒素で冷却したアルミニウムクランプを用いたフリーズクランプ法にて瞬時に凍結した。凍結組織を粉碎し、0.3N  $\text{HClO}_4$  と 0.25 mM EDTA 溶液を加え、ポリトロンホモジナイザー (model RT 10-35, Kinematica, Littau, Switzerland) にてホモジナイズした後、4°C、8000×g にて 15 分間遠心分離した。上清を 2.5 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  で中和し、生じた  $\text{KClO}_4$  を除去するため、再度同条件にて遠心分離した上清を心筋高エネルギーリン酸測定用試料とした。

試料中の ATP は HPLC を用いて定量した。HPLC による測定にはイオン交換カラム (100×7.6 mm、Asahipak ES-502N, Shoko Tsushou, Tokyo) を使用し、移動層には 250 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ +15%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (pH 6.5) を用いた。CrP の測定は CrP を ATP に変換後、上記測定方法で総 ATP 量を定量し、初期 ATP 量を差し引くことで算出した。

### 3.1.7 心筋ミトコンドリア酸素消費速度の測定

ミトコンドリア酸素消費速度 (oxygen consumption rate, OCR) は心筋脱膜化標本 (skinned fiber) を用い、既報に従って測定した<sup>84)</sup>。正常灌流後、虚血終了時あるいは再灌流終了時の心臓から左心室筋の一部を採取し、McIlwain Tissue Chopper (Mick Lab. Engineering Co., NY) を用いて細切し、幅 0.3-0.4 mm、長さ 3-4 mm の小片を作製した。この小片を溶液 A (10 mM EGTA, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM taurine, 0.5 mM dithiothreitol, 20 mM imidazole, 160 mM potassium MOPS, 5 mM ATP, and 15 mM CrP (pH 7.0)、4°C) 中で洗浄した。その後、75 µg/mL の saponin を含む 1 mL の溶液 A 中で、20 分間の脱膜処理を行い、skinned fiber を作製した。脱膜処理後、標本を溶液 B (medium A without ATP and CrP, but supplemented with 0.5% BSA, 4°C) 中で 10 分間のインキュベートすることにより、saponin を除去した。

1 mL の溶液 B 中の skinned fiber を測定試料とし、OCR は Clark 型酸素電極を用いて測定した (30°C)。測定試料に 5 mM glutamate、3 mM malate 及び 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を添加した時に測定される OCR を V<sub>0</sub> とした。さらに、1 mM ADP 及び 7.5 mM creatine を添加した時に測定される OCR 値を最大 OCR (V<sub>max</sub>) とした。V<sub>max</sub> と V<sub>0</sub> の差を ADP から ATP に変換されるために必要な酸素量 OCR (V<sub>ADP</sub>) とした。酸素消費速度測定後に skinned fiber を 0.5 mL の 2 N NaOH (60°C) 中で 30 分間可溶化し、タンパク質量を測定した。

Sodium lactate 存在下の心筋ミトコンドリア OCR の測定では、0.3 µM YT-146 処置あるいは未処置の灌流心臓から作製した skinned fiber を 6.25 から 50 mM の sodium lactate と共にインキュベーションした。

### 3.1.8 Skinned fiber 中の Na<sup>+</sup> 濃度の測定

Skinned fiber 中の Na<sup>+</sup> 濃度は既報に従って測定した<sup>85)</sup>。膜透過性 Na<sup>+</sup> 指示薬である sodium-binding benzofuran isophthalate-acetoxymethyl ester (SBFI/AM) を 1 mM となるよう DMSO に溶解した。次に、3 µL の 25% (w/v) Pluronic F-127<sup>R</sup> と 3 µL の 1 mM SBFI/AM の混和物に 200 µL のインキュベーション緩衝液 (1.5 mM Tris-ATP, pH7.4) を加えた。さらに 400 µL のインキュベーション緩衝液に懸濁した skinned fiber (0.3 µM の YT-146 有りあるいは無しにて灌流した心臓から作製) と混和し、25°C で 30 分間インキュベートした。Skinned fiber 内のミトコンドリアに SBFI/AM を取り込ませた後、試料液を 25°C、8000×g で 5 分間遠心することにより、ミトコンドリアに取り込まれなかった SBFI/AM を除去した。試料液はさらに 6.25 から 50 mM の sodium lactate と共にインキュベーションした。

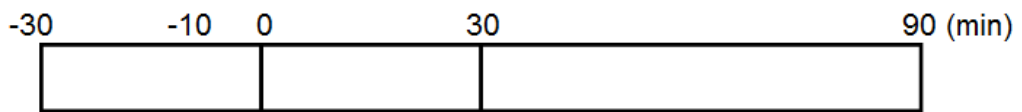
Skinned fiber 中の Na<sup>+</sup> 濃度の測定では、600 µL の試料液を 1 mL のセルに入れ、細胞内イオン測定装置 (CAF110、JASCO 製) を用いて、340 と 380 nm の励起光による 500 nm の蛍光を検出した。6.25 から 50 mM の sodium lactate の添加によるミトコン

ドリアの Na<sup>+</sup> の取り込み量は 2 波長励起により放射された蛍光強度比で評価した。

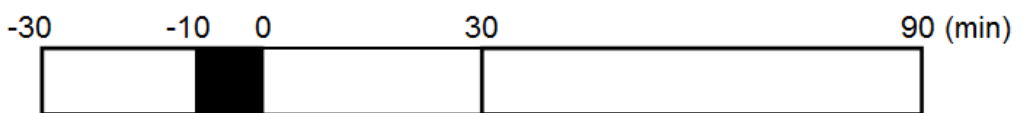
### 3.1.9 統計解析

試験結果は平均値±標準誤差にて表した。統計学的解析は EXSAS (CAC EXICARE 製) を用いて行った。有意差の検定には一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、必要に応じて Bonferroni または Dunnett の多重比較を用いた。検定は 95% の信頼度 (p<0.05) をもって有意差ありと判定した。

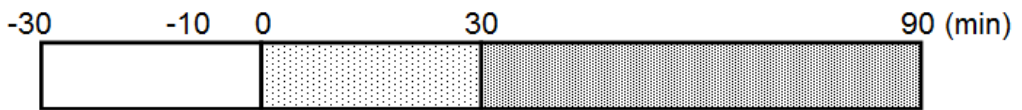
#### Normoxia untreated



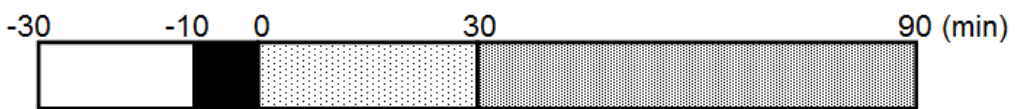
#### Normoxia YT-146 treated



#### Ischemia/reperfusion untreated



#### Ischemia/reperfusion YT-146 treated



心筋高エネルギーリン酸  
ミトコンドリア酸素消費速度  
心筋Na<sup>+</sup>含量  
ミトコンドリアNa<sup>+</sup>含量



Perfusion



Treatment



Ischemia



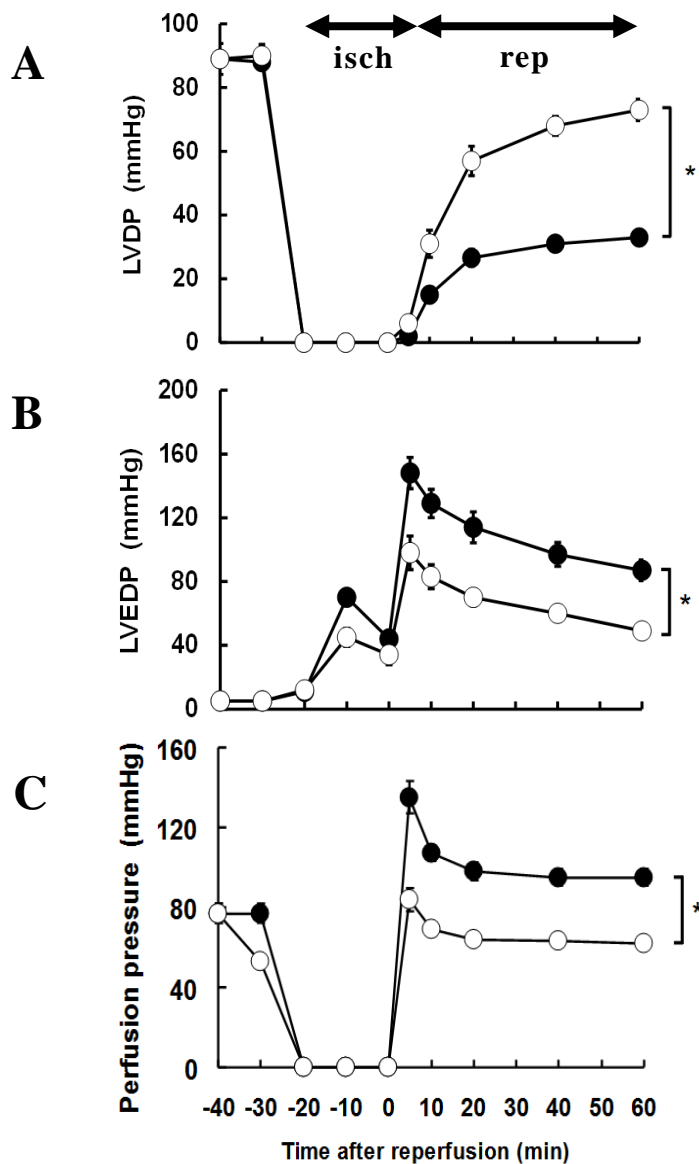
reperfusion

Fig. 29. Perfusion protocol of isolated rat hearts.

## 3.2 結果

### 3.2.1 YT-146 処置の左心室発生圧、左心室拡張末期圧及び灌流圧に及ぼす効果

Fig. 30 に YT-146 未処置あるいは処置群における虚血/再灌流時の左心室発生圧 (LVDP, A)、左心室拡張末期圧 (LVEDP, B) 及び灌流圧 (C) を示す。YT-146 処置群における再灌流時の LVDP 回復は未処置群のそれよりも促進された ( $73.0 \pm 3.4$  mmHg vs.  $33.0 \pm 2.5$  mmHg)。LVEDP 及び灌流圧は YT-146 処置群で有意な低値を示し、YT-146 による心保護作用が確認された。



**Fig. 30.** Time course of change in LVDP (A), LVEDP (B) and perfusion pressure (C) during the 30-min ischemia (isch) / 60-min reperfusion (rep). Data are shown for hearts treated with (○) and without 0.3 μM YT-146 (●). Each value represents the mean±SEM (n=5). \*Significant difference from the group without YT-146 treatment (p<0.05).



### 3.2.2 YT-146 処置の心筋組織 ATP 及びクレアチンリン酸含量への効果

YT-146 未処置あるいは処置群における心筋 ATP 及びクレアチンリン酸 (CrP) 含量を Fig.31 に示す。YT-146 未処置群の虚血前 ATP 及び CrP 含量は、それぞれ  $23.6 \pm 0.5$  及び  $34.0 \pm 1.3$   $\mu\text{mol/g dry tissue}$  であった。正常灌流 (Nor) を 30 分あるいは 90 分間行った群において、これら高エネルギーリン酸の値は、虚血前のそれらと同様の値となり、正常灌流の灌流時間による影響は無かった。一方、虚血心筋 (Isch) の ATP 及び CrP 含量は虚血前のそれぞれ 12% 及び 2% に減少し、再灌流後のそれらの値はそれぞれ 33% 及び 30% の回復に留まった。一方、YT-146 処置群の虚血終了時の ATP 及び CrP 含量は未処置群のそれらと同じレベルまで減少したが、再灌流後のそれら含量は虚血前の 76% 及び 66% まで回復した。

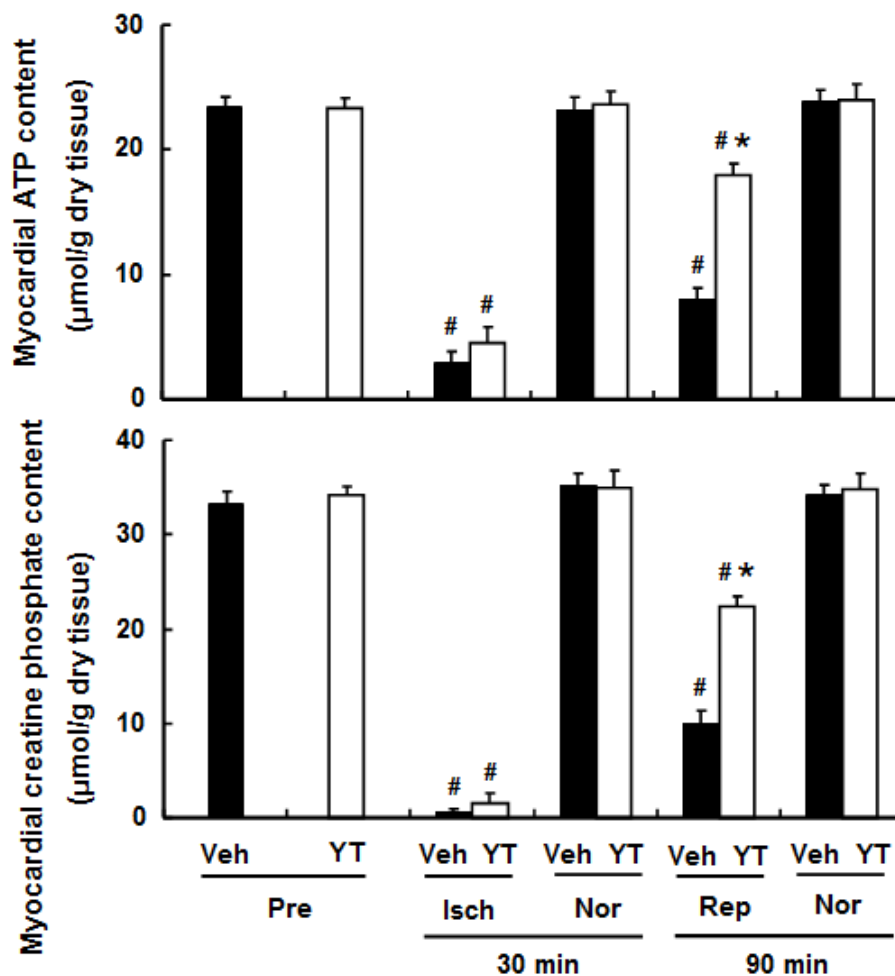


Fig. 31. Myocardial ATP (upper panel) and creatine phosphate (lower panel) contents at the ends of preischemia (Pre), ischemia (Isch), reperfusion (Rep), and normoxic perfusion (Nor) from hearts treated without (vehicle treated, Veh; closed columns) or with  $0.3 \mu\text{M}$  YT-146 (YT; open columns). Each value represents the mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). \*Significant difference from the corresponding vehicle treated ischemic or ischemic/reperfused hearts group ( $p < 0.05$ ). #Significant difference from the corresponding normoxic group ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.3 YT-146 処置のミトコンドリア酸素消費速度への効果

YT-146 未処置あるいは処置群の灌流心から作製した skinned fiber における虚血前、虚血後及び再灌流後のミトコンドリア酸素消費速度 (OCR) を Fig.32 に示す。虚血前の OCR は  $52.6 \pm 1.2$  nano-atomO/min/mg protein であった。YT-146 未処置群における虚血後のミトコンドリア OCR は、虚血前値の約 45% に低下し、再灌流後では虚血前値の約 30% と、さらに低下した。一方、YT-146 処置群の虚血終了時および再灌流終了時のミトコンドリア OCR は、未処置群のそれよりも高値に保たれており、それぞれ虚血前値の約 80% 及び 85% であった。なお、正常灌流心では、いずれの時点でも YT-146 未処置及び処置群間でのミトコンドリア OCR に差は無く、好氣的な条件下での灌流時間及び薬物処置はミトコンドリア OCR に影響しないことが示された。

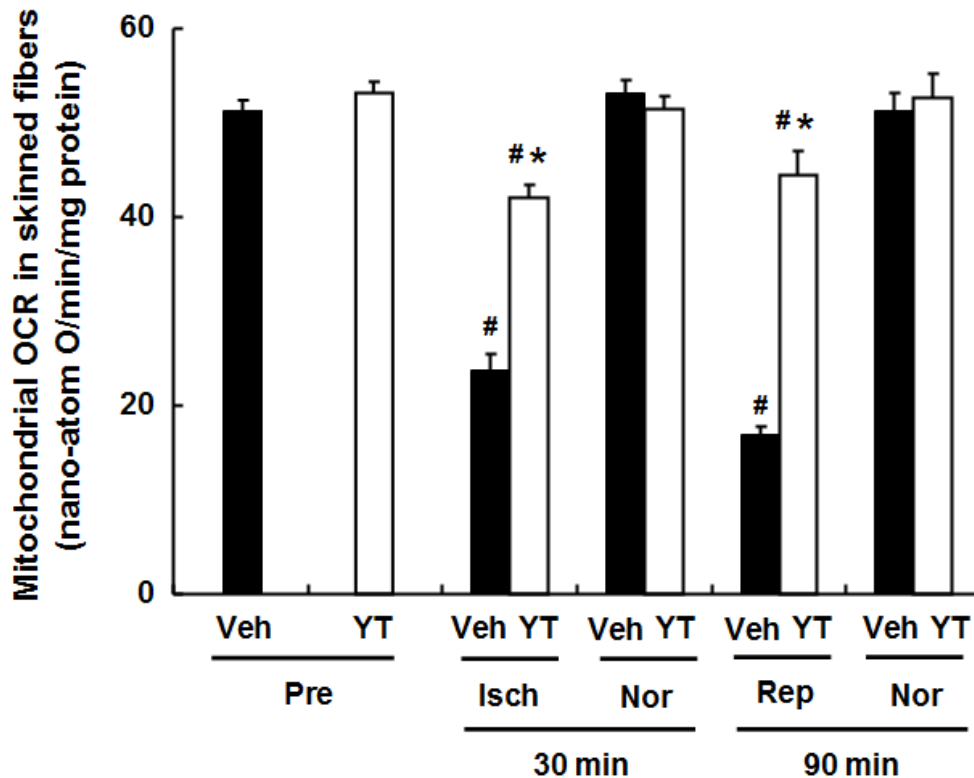


Fig. 32. Mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) of left ventricular skinned fibers prepared following presichemia (Pre), ischemia (Isch), reperfusion (Rep), and normoxic perfusion (Nor) from hearts without (vehicle treated, Veh; closed columns) or with  $0.3 \mu\text{M}$  YT-146 treatment (YT; open columns). Each value represents the mean $\pm$ SEM (n=5). \*Significant difference from the corresponding vehicle treated ischemic or ischemic/reperfused hearts group (p<0.05). #Significant difference from the corresponding normoxic group (p<0.05).

### 3.2.4 YT-146 処置の心筋内 Na<sup>+</sup> 含量への効果

YT-146 未処置あるいは処置群における虚血前、虚血後及び再灌流後の心筋 Na<sup>+</sup> 含量を Fig.33 に示す。虚血前の心筋 Na<sup>+</sup> 含量の値は 54.57±0.68 μmol/g dry tissue であった。YT-146 未処置群において、虚血後の心筋 Na<sup>+</sup> 含量は虚血前値の約 2 倍に増加し、再灌流後にはさらに高値となった。YT-146 処置群では、虚血後の心筋 Na<sup>+</sup> 含量は未処置群のそれと同様の値になった。一方、再灌流後の心筋 Na<sup>+</sup> 含量は 67.11±2.26 μmol/g dry tissue となり、YT-146 非投与群の 129.99±6.43 μmol/g dry tissue よりも低値となった。正常灌流心では、灌流時間および YT-146 処置に関わらず心筋 Na<sup>+</sup> 含量はいずれも約 55 μmol/g dry tissue となった。

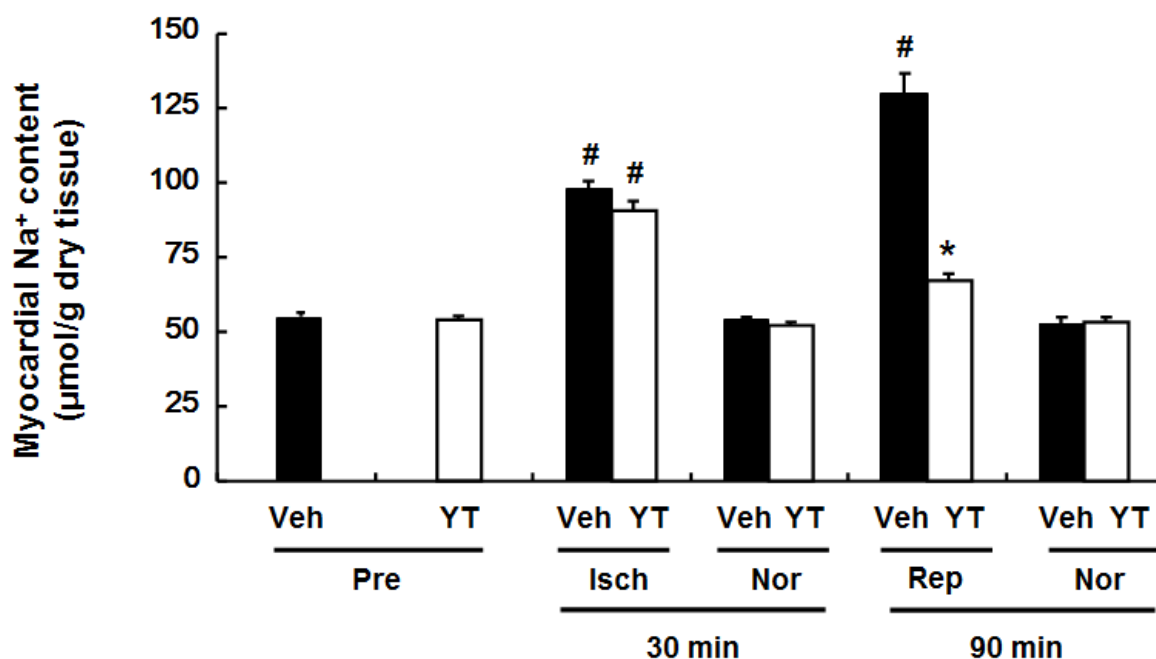


Fig. 33. Myocardial Na<sup>+</sup> content at the ends of preischemia (Pre), ischemia (Isch), reperfusion (Rep), and normoxic perfusion (Nor) from hearts without (vehicle treated, Veh; closed columns) or treated with 0.3 μM YT-146 (YT; open columns). Each value represents the mean±SEM (n=5). \*Significant difference from the corresponding vehicle treated ischemic or ischemic/reperfused hearts group (p<0.05). #Significantly different from the corresponding normoxic group (p<0.05)..

### 3.2.5 YT-146 処置のミトコンドリア内 Na<sup>+</sup> 含量への効果

YT-146 未処置あるいは処置群における虚血前、虚血後及び再灌流後の心筋ミトコンドリア画分の Na<sup>+</sup> 含量を Fig.34 に示す。虚血前の心筋ミトコンドリア画分の Na<sup>+</sup> 含量は 35.04±2.79 µmol/g dry tissue であった。YT-146 未処置群におけるミトコンドリア画分の Na<sup>+</sup> 含量は虚血後及び再灌流後にそれぞれ虚血前値の約 2.5 倍及び 2.1 倍に増加した。一方、YT-146 処置群では、虚血後及び再灌流後の Na<sup>+</sup> 含量はそれぞれ 64.05±3.29 及び 43.44±3.74 µmol/g dry tissue となり、虚血前値の約 1.8 倍及び 1.2 倍となり、YT-146 未処置群のそれと比較していずれも低値となった。つまり、YT-146 処置群の心筋では、虚血時のミトコンドリアでの Na<sup>+</sup> 蓄積が軽減されることが示された。正常灌流心では、YT-146 未処置及び処置に関わらずミトコンドリア画分の Na<sup>+</sup> 含量は、いずれも虚血前値と同様の値となった。

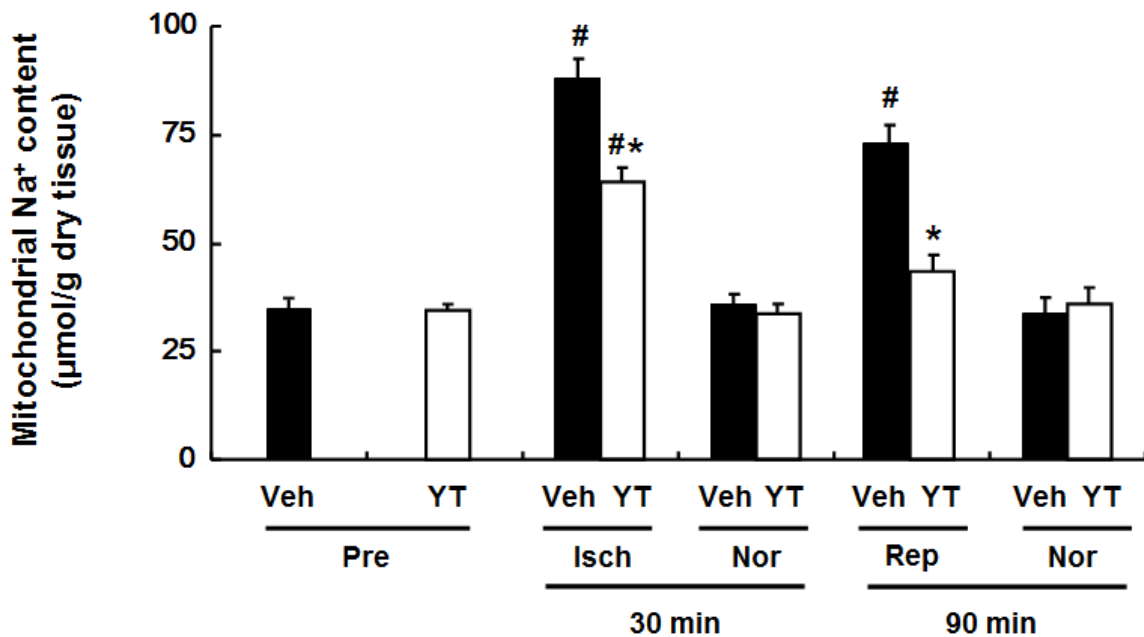


Fig. 34. Mitochondrial Na<sup>+</sup> content at the ends of preischemia (Pre), ischemia (Isch), reperfusion (Rep), and normoxic perfusion (Nor) from hearts without (vehicle treated, Veh; closed columns) or treated with 0.3 µM YT-146 (YT; open columns). Each value represents the mean±SEM (n=5). \*Significant difference from the corresponding vehicle treated ischemic or ischemic/reperfused hearts group (p<0.05). #Significantly different from the corresponding normoxic group (p<0.05).

### 3.2.6 YT-146 処置の Skinned fiber 中の Na<sup>+</sup> 濃度の評価

YT-146 未処置あるいは処置群の灌流心臓から作製した skinned fiber 中のミトコンドリアの SBFI シグナル変化を Fig.35 に示す。Skinned fiber を様々な濃度の sodium lactate (6.25~50 mM) 存在下でインキュベートした結果、sodium lactate の濃度に依存して SBFI シグナル強度が上昇した。一方、YT-146 処置群の心筋から作製した skinned fiber では、sodium lactate 存在下での SBFI シグナル強度の上昇度合いが軽減された。つまり YT-146 処置群の心筋では、sodium lactate によるミトコンドリア内の Na<sup>+</sup> 蓄積が軽減されることが示された。なお、sodium lactate 濃度の上昇による浸透圧変化が SBFI シグナル強度に与える影響を検討するため、skinned fiber を様々な濃度の choline chloride と共にインキュベートした。その結果、choline chloride は SBFI シグナルを変化させなかったことから、浸透圧変化によるシグナルへの影響は無いと考えられた。

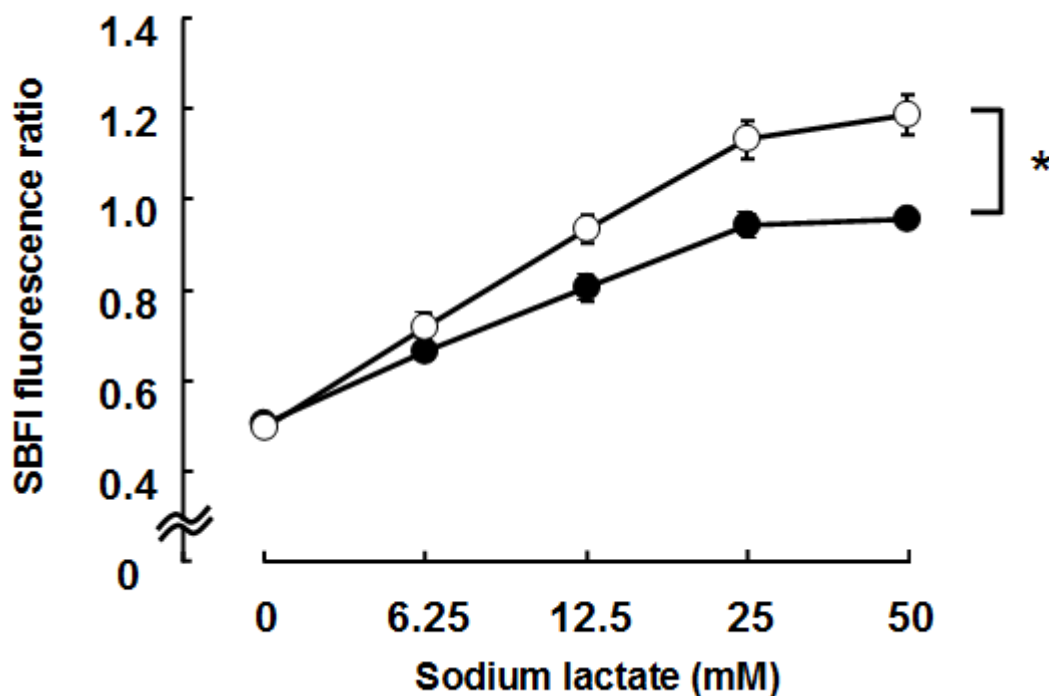


Fig. 35. Sodium lactate-induced increase in fluorescence ratio of sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) -loaded skinned fibers. Skinned fibers prepared from perfused hearts treated with (●) and without 0.3 μM YT-146 (○) were incubated with SBFI-AM, a membrane-permeable Na<sup>+</sup> indicator. After removing unloaded indicator into cardiac mitochondria, the skinned fibers were incubated in 6.25 mM to 50 mM sodium lactate. Each value represents the mean ± SEM of 5 experiments. \*Significant difference from the group without YT-146 treatment (p<0.05).

### 3.2.7 Sodium lactate 存在下におけるミトコンドリア酸素消費速度に及ぼす YT-146 の効果

ミトコンドリアの ATP 産生能への Na<sup>+</sup> の作用を検討するため、正常灌流心臓から作製した skinned fiber の酸素消費速度 (OCR) を、sodium lactate 存在下あるいは非存在下で測定した結果を Fig.36 に示す。Skinned fiber を 6.25 から 50 mM の sodium lactate でインキュベートしたところ、OCR 値は sodium lactate 濃度上昇に伴い減少した。YT-146 処置した心臓から作製した skinned fiber で同様の検討を行ったところ、sodium lactate 濃度上昇による OCR 低下の度合いは軽減された。つまり、YT-146 処置群の心筋組織では sodium lactate によるエネルギー産生能低下への耐性が生じていることが示された。

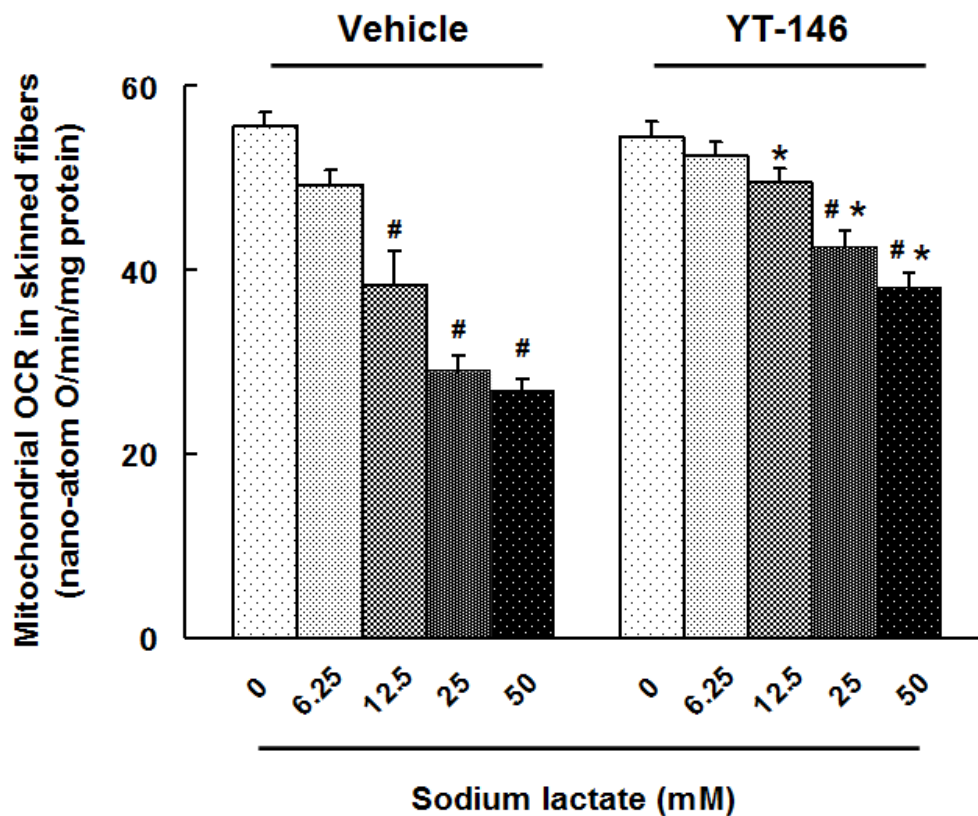


Fig. 36. Sodium lactate-induced decrease in the mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) of skinned fibers prepared from the left ventricular muscles. Skinned fibers were prepared from perfused hearts treated without (left-side chart; vehicle) and with 0.3  $\mu$ M YT-146 (right-side chart; YT-146) and incubated in 6.25 to 50 mM sodium lactate. Each value represents the mean $\pm$ SEM (n=5). \*Significant difference from the corresponding vehicle treated ischemic or ischemic/reperfused hearts group (p<0.05). #Significant difference from the corresponding normoxic group (p<0.05).

### 3.3 考察

第2章の摘出灌流心臓を用いた研究で、YT-146の心筋保護作用はアデノシン A<sub>1</sub> 受容体刺激を介して発揮されると考えられた。一方、ラット摘出心臓を定圧で Langendorff 灌流すると、YT-146 投与によるアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体を介した冠動脈拡張作用で冠動脈灌流量は顕著に増加した。アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体アンタゴニストの同時投与で、YT-146 の再灌流時の心収縮力回復がわずかではあるものの減弱される傾向も観察された。つまり、YT-146 の心筋直接的な保護の機序として、アデノシン A<sub>2A</sub> 受容体刺激を完全に除外できなかった。そこで本章では、ラット摘出心臓を定流量の Langendorff 灌流を行った。その結果、定流量灌流試験においても YT-146 は再灌流時の心収縮機能回復を増加させたことから、虚血/再灌流障害に対する YT-146 の心筋保護効果にアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体刺激を介する冠灌流量増大の寄与は極めて小さいと考えられた。

本試験において、YT-146 処置群の灌流心臓では、再灌流後の心収縮能の回復だけでなく、心筋高エネルギーリン酸含量の回復も促進された。これらの結果は、虚血心筋でのミトコンドリアのエネルギー産生能の保持を示唆した。虚血心筋において Na<sup>+</sup> チャネル及び Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE) を介した細胞外領域 (extracellular space) から細胞内への Na<sup>+</sup> の過剰な流入によって誘発される Na<sup>+</sup> 過負荷は、ミトコンドリアのエネルギー産生能力を非可逆的に減少させることが示されている<sup>86,87)</sup>。しかしながら、本試験において虚血終了時に心筋組織の Na<sup>+</sup> 含量を測定したところ、YT-146 処置群の心筋 Na<sup>+</sup> 含量は未処置群のそれと同様のレベルまで増大しており、YT-146 が虚血心筋での Na<sup>+</sup> 過負荷を軽減させる能力は低かった。そこで虚血心筋のミトコンドリアへの YT-146 の作用について検討した。虚血終了時の心筋ミトコンドリア画分の Na<sup>+</sup> 含量は、虚血前値のその2倍以上に増大し、心筋組織だけでなく心筋ミトコンドリアでも Na<sup>+</sup> 過負荷が生じていることを見出した。一方、YT-146 処置群の心筋組織のミトコンドリア画分の Na<sup>+</sup> 含量は、未処置群のそれよりも低値となった。このことは、虚血による心筋ミトコンドリアでの Na<sup>+</sup> 過負荷が YT-146 により抑制されることを示唆するものである。つまり、YT-146 は虚血心筋組織への Na<sup>+</sup> 過負荷を抑制しないが、ミトコンドリアでの Na<sup>+</sup> 過負荷を抑制することにより、虚血時のミトコンドリアエネルギー産生能力を保持すると考えられた。

さらに、YT-146 によるミトコンドリアへの Na<sup>+</sup> 過負荷抑制がオルガネラのエネルギー産生能に及ぼす効果について検討した。YT-146 処置した正常灌流のみを行った心臓から skinned fiber を作製した。この skinned fiber を虚血心筋で蓄積する嫌氣的代謝物として想定した sodium lactate 存在下でインキュベートした。その結果 Na<sup>+</sup> 指示薬である SBF1 蛍光強度比が上昇し、sodium lactate がミトコンドリア内の Na<sup>+</sup> 濃度を上昇させることを示した。上述したように、虚血心筋では細胞外からの Na<sup>+</sup> 流

入により、心筋細胞内の  $\text{Na}^+$  含量が増大する。虚血心筋では、ミトコンドリアからのエネルギー供給が停止するので、嫌氣的解糖系が亢進する。この嫌氣的代謝により、乳酸が蓄積される。虚血心筋細胞内で、蓄積された乳酸と流入した  $\text{Na}^+$  から sodium lactate が形成されると考えられる。同様に、skinned fiber を用い、sodium lactate 存在下でミトコンドリア酸素消費速度を測定した。インキュベーション溶液中の sodium lactate 濃度上昇に伴いミトコンドリア酸素消費速度は低下した。つまり、虚血心筋での  $\text{Na}^+$  過負荷はミトコンドリアへの  $\text{Na}^+$  流入を誘発し、その結果ミトコンドリアのエネルギー産生を低下させると考えられた。一方、YT-146 処置群の心筋から作製した skinned fiber では、sodium lactate 存在下のミトコンドリアからの SBFI 蛍光強度の増加が軽減された。Sodium lactate 存在下のミトコンドリア酸素消費速度の低下も軽減された。

第二章で、YT-146 はアデノシン  $\text{A}_1$  受容体刺激と PKC 活性化を介して虚血心筋保護作用を発揮することを示した。本章で確認された虚血心筋ミトコンドリアへの  $\text{Na}^+$  流入軽減もこれら機序を介していることが推察された。虚血心筋での PKC の活性化は、ミトコンドリア  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルを開口させることが報告されている<sup>88,89)</sup>。ミトコンドリア  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルの開口はミトコンドリア膜電位を脱分極させる<sup>90)</sup>。このミトコンドリアマトリックスへの  $\text{K}^+$  流入によるミトコンドリア内膜の脱分極はミトコンドリア内への  $\text{Na}^+$  を含めたカチオン流入を減少させることとなる<sup>91)</sup>。つまり、YT-146 は PKC 活性化によるミトコンドリア  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル開口を介してミトコンドリア  $\text{Na}^+$  過負荷を軽減する機序が考えられた。加えて、虚血心筋における PKC 活性化は mitochondrial permeability transition pore (MPTP) の開口を抑制することも知られている。この MPTP の開口抑制は、心筋細胞を保護する可能性が考えられている<sup>92)</sup>。MPTP はストレス刺激に応じて開口し、ミトコンドリア内すなわちマトリックスへ様々なカチオンを流入させることから<sup>93)</sup>、ミトコンドリアへの  $\text{Na}^+$  流入が、この MPTP 開口により誘発されると考えられる。ラット新生仔培養心筋細胞を用いた実験では、アデノシン  $\text{A}_1$  アゴニストが PKC 活性化を介して低酸素刺激時の MPTP 開口を抑制することが報告されている<sup>94)</sup>。この MPTP 開口抑制が虚血心筋での YT-146 によるミトコンドリア  $\text{Na}^+$  過負荷軽減に寄与した可能性がある。

これらの結果から、YT-146 は  $\text{Na}^+$  過負荷に陥った虚血心筋細胞でのミトコンドリアへの  $\text{Na}^+$  流入を軽減した結果、虚血心筋でのミトコンドリアエネルギー産生能が保持され、再灌流時の ATP 再生産を介して心収縮力回復を促進させる機序が考えられた。



## 小活

1. ラット摘出心に、YT-146 の虚血前投与で、再灌流時の心機能回復が促進された。本灌流方法は定流量灌流なので、心筋組織に供給される灌流液量は、冠動脈径に関わらず一定であることから、YT-146 による虚血心筋保護効果へのアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体の寄与は小さいと考えられた。
2. YT-146 処置群では、再灌流時の心筋高エネルギーリン酸含量の回復が促進された。加えて、虚血心筋から作製された *skinned fiber* を用いた実験から、YT-146 処置により、虚血時の心筋ミトコンドリア酸素消費速度が保持されたことが示された。これらの結果から、YT-146 処置により虚血心筋ミトコンドリアエネルギー産生能が保持されたことが示唆された。
3. YT-146 処置は、虚血心筋での Na<sup>+</sup> 過負荷を抑制しなかった。その一方で、虚血終了時点の心筋ミトコンドリア画分での Na<sup>+</sup> 蓄積を抑制した。*Skinned fiber* を用いた実験で、*sodium lactate* 存在下でのミトコンドリア内 Na<sup>+</sup> 濃度の上昇を YT-146 は軽減した。同じく、*sodium lactate* 存在下での *skinned fiber* のミトコンドリア酸素消費速度低下も YT-146 処置は軽減した。

## 総括

本研究では、心筋虚血/再灌流障害から心筋組織を保護する薬物としてのアデノシン受容体アゴニスト YT-146 の可能性について検討し、以下の知見を得た。

### [第 1 章]

麻酔下開胸イヌの LAD 結紮による心筋虚血/再灌流障害モデルを用い、YT-146 の静脈内投与による虚血/再灌流障害抑制効果について検討した。

第 1 節では、YT-146 を再灌流直前に急速静脈内投与することによる心筋梗塞サイズに及ぼす効果について検討した。YT-146 はアデノシン A<sub>2</sub> 受容体の活性化を介して、用量依存的に再灌流直後の心筋組織血流量を増加させ、心筋梗塞サイズを縮小した。心筋梗塞サイズの縮小の程度は、虚血プレコンディショニング効果によるものと同程度であった。

第 2 節では、YT-146 を再灌流時に静脈内持続投与することによる心保護作用について検討した。再灌流 15 分前から 75 分間の静脈内持続投与により、YT-146 は再灌流直後の心筋組織血流量の増加無しに心筋梗塞サイズを縮小した。再灌流直前の急速静脈内投与と再灌流時の静脈内持続投与を組み合わせることで、より大きな心筋保護作用を得ることができた。

### [第 2 章]

ラット摘出心臓の Langendorff 定圧灌流標本を用いた。本モデルで虚血/再灌流を行うと、YT-146 の虚血前投与で、再灌流時の心機能回復が用量依存的に促進された。各種アデノシン受容体サブタイプのアнтаゴニストを用いた実験で、YT-146 の心筋保護作用はアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体ではなく、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体を介して発揮されることを示した。さらに、アデノシン A<sub>1</sub> 受容体の情報伝達系下流に、PKC 活性化の関与も示した。

### [第 3 章]

YT-146 の虚血心筋のミトコンドリアエネルギー産生能に及ぼす効果について検討した。ラット摘出心臓への YT-146 処置により、虚血/再灌流後の心筋高エネルギーリン酸含量回復が促進された。虚血時の心筋から作製した *skinned fiber* のミトコンドリア酸素消費量は、YT-146 処置群で保持されていた。一方、YT-146 処置群の心臓で虚血時の心筋組織での Na<sup>+</sup> 過負荷は抑制されなかったが、ミトコンドリアでの Na<sup>+</sup> 過負荷は軽減された。*Skinned fiber* に sodium lactate を負荷する *in vitro* 試験で、YT-146 処置群の心筋から作製された標本で、ミトコンドリア内への Na<sup>+</sup> 蓄積が軽減された。YT-146 処置群の心筋から作製された *skinned fiber* では sodium lactate 存在下でもミトコンドリア酸素消費量の低下が軽減された。これらの結果から、ラット摘出心にお

いて YT-146 は  $\text{Na}^+$  過負荷状態にある虚血心筋のミトコンドリア  $\text{Na}^+$  増加を抑制することでオルガネラのエネルギー産生能を維持し、虚血後の左心室収縮能回復を促進させる機序を提示した。

まず、本研究ではアデノシン受容体アゴニスト YT-146 の心筋虚血/再灌流障害に対する心筋保護薬としての可能性について検討した。YT-146 は *in vivo* イヌ心筋虚血/再灌流障害モデルで、虚血時の再灌流前からの静脈内投与で心筋梗塞サイズを縮小させた。実験動物による心筋梗塞モデルで、虚血前静脈内投与により再灌流後の心筋梗塞サイズを縮小させる薬物は多数報告されが、臨床的な適用を勘案すると、本実験プロトコールが適切な薬物処置になると考えられる<sup>95)</sup>。YT-146 はその臨床からの要求を満たす薬物として期待できる。

次に、YT-146 はアデノシン受容体サブタイプのアнтаゴニストを用いた薬理学的手法を用いることにより、アデノシン  $\text{A}_1$  受容体を介して虚血心筋保護を発揮することを新たに示した。加えて、このアデノシン  $\text{A}_1$  受容体刺激後の細胞内情報伝達には PKC が関与することも示した。つまり、アデノシン  $\text{A}_1$  受容体刺激および PKC 活性化を介して、虚血心筋保護作用を発揮する機序を提示した。

さらに、YT-146 が虚血心筋でのミトコンドリアの  $\text{Na}^+$  過負荷を軽減し、ミトコンドリアのエネルギー産生能を保持させることを示した。虚血/再灌流障害からの心筋保護には、心筋ミトコンドリア機能の保持が重要である。この虚血心筋のミトコンドリア機能保持が、再灌流時の心収縮能を回復させるためのエネルギーの再生産を介して心機能回復を促進させたと考えられた。これら一連の試験結果より、YT-146 の心筋虚血におけるミトコンドリア  $\text{Na}^+$  過負荷軽減の機序として、アデノシン  $\text{A}_1$  受容体刺激/PKC 活性化を介したミトコンドリア  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルや MPTP の開口抑制が考えられた (Fig.37)。

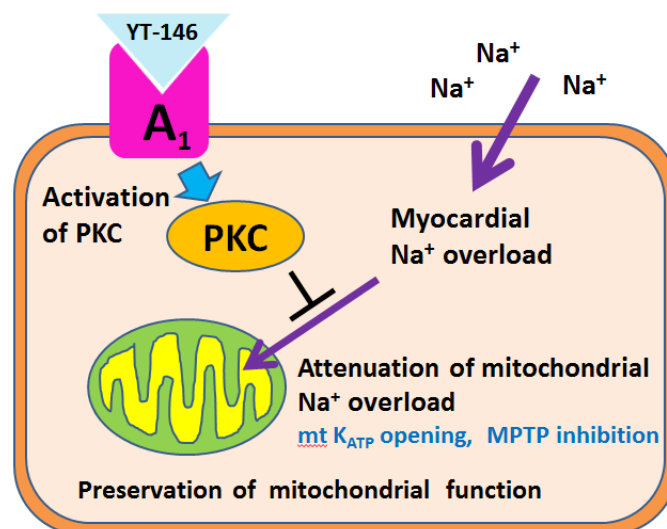


Fig. 37. Schematic illustration of the mechanism for preservation of mitochondrial function by YT-146

以上、本研究により、アデノシン受容体アゴニスト YT-146 は虚血/再灌流障害に対して心筋保護に有益な効果をもたらす薬物であることが示された。同時に、YT-146 によるアデノシン A<sub>1</sub> 受容体刺激を介して虚血/再灌流時のミトコンドリア機能を維持させる新たな虚血心筋保護の機序を提示した。

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻、並びに本論文の御校閲を戴きました東京薬科大学分子細胞病態薬理学教室教授 田野中浩一先生に心からの感謝の意を表します。

本研究に対し御理解と御支援を戴きましたトーアエイヨー株式会社 内堀剛洋氏、相原和行博士、馬目与市博士に厚く御礼申し上げます。

本研究に際して種々の御協力を戴きました東京薬科大学分子細胞病態薬理学教室の皆様方に深く御礼申し上げます。

論文審査にて御指導を賜りました東京薬科大学大学院薬学研究科 立川英一先生、馬場広子先生および高木教夫先生に御礼申し上げます。

最後に本論文の作成への家族の理解と支援に感謝します。

## 参考文献

- 1) Sato N, Kajimoto K, Asai K, Mizuno M, Minami Y, Nagashima M, Murai K, Muanakata R, Yumino D, Meguro T, Kawana M, Nejima J, Satoh T, Mizuno K, Tanaka K, Kasanuki H, Takano T. Acute decompensated heart failure syndromes (ATTEND) registry. A prospective observational multicenter cohort study: rationale, design, and preliminary data. *Am Heart J.* **159**, 949-955 e941 (2010).
- 2) Hamaguchi S, Yokoshiki H, Kinugawa S, Tsuchihashi-Makaya M, Yokota T, Takeshita A, Tsutsui H. Effects of atrial fibrillation on long-term outcomes in patients hospitalized for heart failure in Japan: a report from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Circ J.* **73**, 2084-2090 (2009).
- 3) Michels KB, Yusuf S. Does PTCA in acute myocardial infarction affect mortality and reinfarction rates? A quantitative overview (meta-analysis) of the randomized clinical trials. *Circulation.* **91**, 476-485 (1995).
- 4) Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest.* **76**, 1713-1719 (1985).
- 5) Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol.* **21**, 537-545 (1993).
- 6) Burns RJ, Gibbons RJ, Yi Q, Roberts RS, Miller TD, Schaer GL, Anderson JL, Yusuf S. The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis. *J Am Coll Cardiol.* **39**, 30-36 (2002).
- 7) Meng HP, Lonsberry BB, Pierce GN. Influence of perfusate pH on the postischemic recovery of cardiac contractile function: involvement of sodium-hydrogen exchange. *J Pharmacol Exp Ther.* **258**, 772-777 (1991).
- 8) Tanonaka K, Kajiwara H, Kameda H, Takasaki A, Takeo S. Relationship between myocardial cation content and injury in reperfused rat hearts treated with cation channel blockers. *Eur J Pharmacol.* **372**, 37-48 (1999).
- 9) Tani M, Neely JR. Role of intracellular  $\text{Na}^+$  in  $\text{Ca}^{2+}$  overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of  $\text{H}^+$ - $\text{Na}^+$  and  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Circ Res.* **65**, 1045-1056 (1989).
- 10) Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* **67**, 1016-1023 (1983).
- 11) Verma S, Fedak PW, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, Li RK, Dhillon B, Yau TM. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation.* **105**, 2332-2336 (2002).
- 12) Ragosta M, Camarano G, Kaul S, Powers ER, Sarembock IJ, Gimple LW. Microvascular

- integrity indicates myocellular viability in patients with recent myocardial infarction. New insights using myocardial contrast echocardiography. *Circulation*. **89**, 2562-2569 (1994).
- 13) Camarano G, Ragosta M, Gimple LW, Powers ER, Kaul S. Identification of viable myocardium with contrast echocardiography in patients with poor left ventricular systolic function caused by recent or remote myocardial infarction. *Am J Cardiol*. **75**, 215-219 (1995).
  - 14) Agati L, Voci P, Bilotta F, Luongo R, Autore C, Penco M, Iacoboni C, Fedele F, Dagianti A. Influence of residual perfusion within the infarct zone on the natural history of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction: a myocardial contrast echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol*. **24**, 336-342 (1994).
  - 15) Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schroder R, Tiemann R, Machnig T, Neuhaus KL. The Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. **38**, 1644-1650 (2001).
  - 16) Tsujita K, Shimomura H, Kaikita K, Kawano H, Hokamaki J, Nagayoshi Y, Yamashita T, Fukuda M, Nakamura Y, Sakamoto T, Yoshimura M, Ogawa H. Long-term efficacy of edaravone in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*. **70**, 832-837 (2006).
  - 17) Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ross AM, Alexander RW, Stone GW. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur Heart J*. **27**, 2400-2405 (2006).
  - 18) Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **35**, 581-606 (1995).
  - 19) Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*. **68**, 213-237 (1929).
  - 20) Belardinelli L, Linden J, Berne RM. The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovasc Dis*. **32**, 73-97 (1989).
  - 21) Gellai M, Schreiner GF, Ruffolo RR, Jr., Fletcher T, DeWolf R, Brooks DP. CVT-124, a novel adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist with unique diuretic activity. *J Pharmacol Exp Ther*. **286**, 1191-1196 (1998).
  - 22) Wilcox CS, Welch WJ, Schreiner GF, Belardinelli L. Natriuretic and diuretic actions of a highly selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist. *J Am Soc Nephrol*. **10**, 714-720 (1999).
  - 23) Norton GR, Woodiwiss AJ, McGinn RJ, Lorbar M, Chung ES, Honeyman TW, Fenton RA, Dobson JG, Jr., Meyer TE. Adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated antiadrenergic effects are

- modulated by A<sub>2a</sub> receptor activation in rat heart. *Am J Physiol.* **276**, H341-349 (1999).
- 24) Churchill PC, Churchill MC. A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptor activation inhibits and stimulates renin secretion of rat renal cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther.* **232**, 589-594 (1985).
  - 25) Berne RM. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res.* **47**, 807-813 (1980).
  - 26) Edwards RJ, MacDermot J, Wilkins AJ. Prostacyclin analogues reduce ADP-ribosylation of the alpha-subunit of the regulatory Gs-protein and diminish adenosine (A<sub>2</sub>) responsiveness of platelets. *Br J Pharmacol.* **90**, 501-510 (1987).
  - 27) Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, Taft S, Vinten-Johansen J. Adenosine A<sub>2</sub> receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther.* **280**, 301-309 (1997).
  - 28) Morairty S, Rainnie D, McCarley R, Greene R. Disinhibition of ventrolateral preoptic area sleep-active neurons by adenosine: a new mechanism for sleep promotion. *Neuroscience.* **123**, 451-457 (2004).
  - 29) Ely SW, Mentzer RM, Jr., Lasley RD, Lee BK, Berne RM. Functional and metabolic evidence of enhanced myocardial tolerance to ischemia and reperfusion with adenosine. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **90**, 549-556 (1985).
  - 30) Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, Virmani R. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation.* **76**, 1135-1145 (1987).
  - 31) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A<sub>1</sub> adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* **84**, 350-356 (1991).
  - 32) Moser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol.* **256**, C799-806 (1989).
  - 33) Garratt KN, Holmes DR, Jr., Molina-Viamonte V, Reeder GS, Hodge DO, Bailey KR, Lobl JK, Laudon DA, Gibbons RJ. Intravenous adenosine and lidocaine in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J.* **136**, 196-204 (1998).
  - 34) Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol.* **45**, 1775-1780 (2005).
  - 35) Kogi K, Uchibori T, Aihara K, Yamaguchi T, Abiru T. Pharmacological profile of the 2-alkynyladenosine derivative 2-octynyladenosine (YT-146) in the cardiovascular system. *Jpn J Pharmacol.* **57**, 153-165 (1991).



- 36) Abiru T, Yamaguchi T, Watanabe Y, Kogi K, Aihara K, Matsuda A. The antihypertensive effect of 2-alkynyladenosines and their selective affinity for adenosine A<sub>2</sub> receptors. *Eur J Pharmacol.* **196**, 69-76 (1991).
- 37) Reffelmann T, Hale SL, Li G, Kloner RA. Relationship between no reflow and infarct size as influenced by the duration of ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **282**, H766-772 (2002).
- 38) De Bruyne B, Pijls NH, Barbato E, Bartunek J, Bech JW, Wijns W, Heyndrickx GR. Intracoronary and intravenous adenosine 5'-triphosphate, adenosine, papaverine, and contrast medium to assess fractional flow reserve in humans. *Circulation.* **107**, 1877-1883 (2003).
- 39) Taniyama Y, Ito H, Iwakura K, Masuyama T, Hori M, Takiuchi S, Nishikawa N, Higashino Y, Fujii K, Minamino T. Beneficial effect of intracoronary verapamil on microvascular and myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* **30**, 1193-1199 (1997).
- 40) Marzilli M, Orsini E, Marraccini P, Testa R. Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation.* **101**, 2154-2159 (2000).
- 41) Sugimoto K, Ito H, Iwakura K, Ikushima M, Kato A, Kimura R, Tanaka K, Masuyama T, Ogihara T, Kawano S, Fujii K. Intravenous nicorandil in conjunction with coronary reperfusion therapy is associated with better clinical and functional outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* **67**, 295-300 (2003).
- 42) Van Wylen DG, Willis J, Sodhi J, Weiss RJ, Lasley RD, Mentzer RM, Jr. Cardiac microdialysis to estimate interstitial adenosine and coronary blood flow. *Am J Physiol.* **258**, H1642-1649 (1990).
- 43) Bache RJ, Cobb FR, Greenfield JC, Jr. Effects of increased myocardial oxygen consumption on coronary reactive hyperemia in the awake dog. *Circ Res.* **33**, 588-596 (1973).
- 44) Pitarys CJ, 2nd, Virmani R, Vildibill HD, Jr., Jackson EK, Forman MB. Reduction of myocardial reperfusion injury by intravenous adenosine administered during the early reperfusion period. *Circulation.* **83**, 237-247 (1991).
- 45) Schlack W, Schafer M, Uebing A, Schafer S, Borchard U, Thamer V. Adenosine A<sub>2</sub>-receptor activation at reperfusion reduces infarct size and improves myocardial wall function in dog heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* **22**, 89-96 (1993).
- 46) Budde JM, Velez DA, Zhao Z, Clark KL, Morris CD, Muraki S, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Comparative study of AMP579 and adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury during 24 h of reperfusion. *Cardiovasc Res.* **47**, 294-305 (2000).
- 47) Yamamuro A, Akasaka T, Tamita K, Yamabe K, Katayama M, Takagi T, Morioka S.

- Coronary flow velocity pattern immediately after percutaneous coronary intervention as a predictor of complications and in-hospital survival after acute myocardial infarction. *Circulation*. **106**, 3051-3056 (2002).
- 48) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. **74**, 1124-1136 (1986).
- 49) Kitakaze M, Minamino T, Node K, Komamura K, Shinozaki Y, Chujo M, Mori H, Inoue M, Hori M, Kamada T. Role of activation of ectosolic 5'-nucleotidase in the cardioprotection mediated by opening of K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol*. **270**, H1744-1756 (1996).
- 50) Harada N, Okajima K, Katsuragi T. [Adenosine reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury by inhibiting leukocyte activation]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 114 Suppl 1, 159P-167P (1999).
- 51) Bullough DA, Magill MJ, Firestein GS, Mullane KM. Adenosine activates A<sub>2</sub> receptors to inhibit neutrophil adhesion and injury to isolated cardiac myocytes. *J Immunol*. **155**, 2579-2586 (1995).
- 52) Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively. *J Clin Invest*. **85**, 1150-1157 (1990).
- 53) Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, French BA, Linden J. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A<sub>2A</sub> receptor activation is due to its action on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Circulation*. **114**, 2056-2064 (2006).
- 54) Rork TH, Wallace KL, Kennedy DP, Marshall MA, Lankford AR, Linden J. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor activation reduces infarct size in the isolated, perfused mouse heart by inhibiting resident cardiac mast cell degranulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **295**, H1825-1833 (2008).
- 55) Cargnoni A, Ceconi C, Boraso A, Bernocchi P, Monopoli A, Curello S, Ferrari R. Role of A<sub>2A</sub> receptor in the modulation of myocardial reperfusion damage. *J Cardiovasc Pharmacol*. **33**, 883-893 (1999).
- 56) Reid EA, Kristo G, Yoshimura Y, Ballard-Croft C, Keith BJ, Mentzer RM, Jr., Lasley RD. In vivo adenosine receptor preconditioning reduces myocardial infarct size via subcellular ERK signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **288**, H2253-2259 (2005).
- 57) Finegan BA, Lopaschuk GD, Gandhi M, Clanachan AS. Inhibition of glycolysis and enhanced mechanical function of working rat hearts as a result of adenosine A<sub>1</sub> receptor stimulation during reperfusion following ischaemia. *Br J Pharmacol*. **118**, 355-363 (1996).
- 58) Zucchi R, Yu G, Ghelardoni S, Ronca F, Ronca-Testoni S. A<sub>3</sub> adenosine receptor stimulation modulates sarcoplasmic reticulum Ca<sup>(2+)</sup> release in rat heart. *Cardiovasc Res*.

- 50**, 56-64 (2001).
- 59) Kuno A, Critz SD, Cui L, Solodushko V, Yang XM, Krahn T, Albrecht B, Philipp S, Cohen MV, Downey JM. Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A<sub>2b</sub>-dependent signaling during early reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* **43**, 262-271 (2007).
- 60) Xi J, McIntosh R, Shen X, Lee S, Chanoit G, Criswell H, Zvara DA, Xu Z. Adenosine A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* **47**, 684-690 (2009).
- 61) Konno T, Murakami A, Uchibori T, Nagai A, Kogi K, Nakahata N. Involvement of adenosine A<sub>2a</sub> receptor in intraocular pressure decrease induced by 2-(1-octyn-1-yl)adenosine or 2-(6-cyano-1-hexyn-1-yl)adenosine. *J Pharmacol Sci.* **97**, 501-509 (2005).
- 62) Auchampach JA, Rizvi A, Qiu Y, Tang XL, Maldonado C, Teschner S, Bolli R. Selective activation of A<sub>3</sub> adenosine receptors with N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circ Res.* **80**, 800-809 (1997).
- 63) Liu GS, Richards SC, Olsson RA, Mullane K, Walsh RS, Downey JM. Evidence that the adenosine A<sub>3</sub> receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. *Cardiovasc Res.* **28**, 1057-1061 (1994).
- 64) Tracey WR, Magee WP, Oleynek JJ, Hill RJ, Smith AH, Flynn DM, Knight DR. Novel N6-substituted adenosine 5'-N-methyluronamides with high selectivity for human adenosine A<sub>3</sub> receptors reduce ischemic myocardial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **285**, H2780-2787 (2003).
- 65) Cerniway RJ, Yang Z, Jacobson MA, Linden J, Matherne GP. Targeted deletion of A<sub>(3)</sub> adenosine receptors improves tolerance to ischemia-reperfusion injury in mouse myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **281**, H1751-1758 (2001).
- 66) Guo Y, Bolli R, Bao W, Wu WJ, Black RG, Jr., Murphree SS, Salvatore CA, Jacobson MA, Auchampach JA. Targeted deletion of the A<sub>3</sub> adenosine receptor confers resistance to myocardial ischemic injury and does not prevent early preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* **33**, 825-830 (2001).
- 67) Carr CS, Hill RJ, Masamune H, Kennedy SP, Knight DR, Tracey WR, Yellon DM. Evidence for a role for both the adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> receptors in protection of isolated human atrial muscle against simulated ischaemia. *Cardiovasc Res.* **36**, 52-59 (1997).
- 68) Borea PA, Varani K, Vincenzi F, Baraldi PG, Tabrizi MA, Merighi S, Gessi S. The A<sub>3</sub> adenosine receptor: history and perspectives. *Pharmacol Rev.* **67**, 74-102 (2015).
- 69) Lasley RD, Rhee JW, Van Wylen DG, Mentzer RM, Jr. Adenosine A<sub>1</sub> receptor mediated protection of the globally ischemic isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* **22**, 39-47

- (1990).
- 70) Black RG, Jr., Guo Y, Ge ZD, Murphree SS, Prabhu SD, Jones WK, Bolli R, Auchampach JA. Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Circ Res.* **91**, 165-172 (2002).
  - 71) Matherne GP, Linden J, Byford AM, Gauthier NS, Headrick JP. Transgenic A<sub>1</sub> adenosine receptor overexpression increases myocardial resistance to ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 6541-6546 (1997).
  - 72) Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A<sub>1</sub> receptors, K<sub>ATP</sub> channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol.* **264**, H1327-1336 (1993).
  - 73) Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning. *Circ Res.* **84**, 973-979 (1999).
  - 74) Nojiri M, Tanonaka K, Yabe K, Kawana K, Iwai T, Yamane M, Yoshida H, Hayashi J, Takeo S. Involvement of adenosine receptor, potassium channel and protein kinase C in hypoxic preconditioning of isolated cardiomyocytes of adult rat. *Jpn J Pharmacol.* **80**, 15-23 (1999).
  - 75) Liang BT. Protein kinase C-dependent activation of K<sub>ATP</sub> channel enhances adenosine-induced cardioprotection. *Biochem J.* **336 ( Pt 2)**, 337-343 (1998).
  - 76) Henry P, Demolombe S, Puceat M, Escande D. Adenosine A<sub>1</sub> stimulation activates delta-protein kinase C in rat ventricular myocytes. *Circ Res.* **78**, 161-165 (1996).
  - 77) Miyazaki K, Komatsu S, Ikebe M, Fenton RA, Dobson JG, Jr. Protein kinase Cepsilon and the antiadrenergic action of adenosine in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **287**, H1721-1729 (2004).
  - 78) Ferrari R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* **28 Suppl 1**, S1-10 (1996).
  - 79) Nohl H, Koltover V, Stolze K. Ischemia/reperfusion impairs mitochondrial energy conservation and triggers O<sub>2</sub><sup>-</sup> release as a byproduct of respiration. *Free Radic Res Commun.* **18**, 127-137 (1993).
  - 80) Takeo S, Tanonaka K, Iwai T, Motegi K, Hirota Y. Preservation of mitochondrial function during ischemia as a possible mechanism for cardioprotection of diltiazem against ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol.* **67**, 565-574 (2004).
  - 81) Andres J, Flameng W, van Belle H. Energetic state of the postischemic myocardium and its relation to contractile failure. *J Physiol Pharmacol.* **45**, 91-103 (1994).
  - 82) Regitz V, Paulson DJ, Hodach RJ, Little SE, Schaper W, Shug AL. Mitochondrial damage during myocardial ischemia. *Basic Res Cardiol.* **79**, 207-217 (1984).
  - 83) Iwai T, Tanonaka K, Koshimizu M, Takeo S. Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *Br J Pharmacol.* **129**, 1219-1227 (2000).
  - 84) Sanbe A, Tanonaka K, Hanaoka Y, Katoh T, Takeo S. Regional energy metabolism of

- failing hearts following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* **25**, 995-1013 (1993).
- 85) Jung DW, Apel LM, Brierley GP. Transmembrane gradients of free Na<sup>+</sup> in isolated heart mitochondria estimated using a fluorescent probe. *Am J Physiol.* **262**, C1047-1055 (1992).
- 86) Iwai T, Tanonaka K, Inoue R, Kasahara S, Kamo N, Takeo S. Mitochondrial damage during ischemia determines post-ischemic contractile dysfunction in perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* **34**, 725-738 (2002).
- 87) Motegi K, Tanonaka K, Takenaga Y, Takagi N, Takeo S. Preservation of mitochondrial function may contribute to cardioprotective effects of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger inhibitors in ischaemic/reperfused rat hearts. *Br J Pharmacol.* **151**, 963-978 (2007).
- 88) Sato T, Sasaki N, O'Rourke B, Marban E. Adenosine primes the opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels: a key step in ischemic preconditioning? *Circulation.* **102**, 800-805 (2000).
- 89) Wang Y, Hirai K, Ashraf M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K<sup>(+)</sup> channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res.* **85**, 731-741 (1999).
- 90) Holmuhamedov EL, Jovanović S, Dzeja PP, Jovanović A, Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol.* **275**, H1567-1576 (1998).
- 91) Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol.* **519**, 347-360 (1999).
- 92) Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* **113**, 1535-1549 (2004).
- 93) Hunter DR, Haworth RA. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* **195**, 453-459 (1979).
- 94) Xiang F, Huang YS, Zhang DX, Chu ZG, Zhang JP, Zhang Q. Adenosine A<sub>1</sub> receptor activation reduces opening of mitochondrial permeability transition pores in hypoxic cardiomyocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **37**, 343-349 (2010).
- 95) Gumina RJ, Mizumura T, Beier N, Schelling P, Schultz JJ, Gross GJ. A new sodium/hydrogen exchange inhibitor, EMD 85131, limits infarct size in dogs when administered before or after coronary artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther.* **286**, 175-183 (1998).