

氏名（本籍）	ささもり じゅん 笹森 潤（福島県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 343 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査） 教授 田野中 浩一 教授 高木 教夫 教授 立川 英一 教授 馬場 広子

論文内容の要旨

心筋梗塞を含む虚血性心疾患の患者数は、我が国の医療費を圧迫する一因となっている慢性心不全の基礎疾患の中で最多となる。この虚血性心疾患のうち最も重篤な急性心筋梗塞 (AMI) は、血栓の塞栓化による冠動脈閉塞で誘発される。AMI 患者の救命のためには、梗塞領域への血液の再灌流が急務となる。心筋虚血が短時間で解除されると、再灌流時に心機能は速やかに回復し、その予後は良好である。一方、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促進され、心収縮不全に陥る。この再灌流による逆説的な現象は「虚血/再灌流障害」と呼ばれ、本障害による心筋梗塞領域のさらなる拡大が予後不良の一因となっている。従って AMI の治療では急性期の血流再開に加え、同時に虚血/再灌流障害から心筋細胞を保護する処置が求められる。

アデノシンはプリンヌクレオシドの一種で、細胞膜上の 4 種類のアデノシン受容体 (A_1 、 A_{2A} 、 A_{2B} 、 A_3) のリガンドとして様々な生理活性を発揮する。アデノシンは各種実験動物で、心筋虚血/再灌流障害を軽減させることが知られている。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、虚血/再灌流障害から心筋組織を保護するには、高用量かつ長時間のアデノシン投与が要求される。

YT-146 (Fig.1) はアデノシンの 2 位に置換基が導入されたアデノシン受容体アゴニストで、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。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。

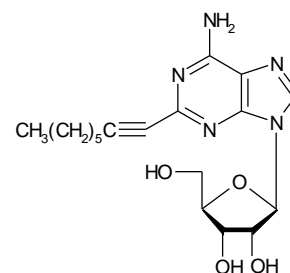


Fig.1. Chemical structure of YT-146

第一章 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

第一章では、麻酔下開胸イヌの虚血 (90 分間) / 再灌流 (300 分間) モデルを用い、YT-146 の心筋虚血/再灌流障害抑制効果について検討した。再灌流直前に 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の YT-146 を急速静脈内投与したところ、全身血行動態に影響せず、薬物の用量に依存して心筋梗塞サイズが縮小された (Fig.2)。YT-146 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の心筋梗塞サイズ減少効果は、最も強力な心筋虚血耐性を示す虚血プレコンディショニング処置と同程度であった。

本実験で YT-146 は、冠血管拡張作用を介して再灌流直後の反応性充血を用量依存的に増加させた。イヌ虚血/再灌流モデルを用いた研究では、アデノシン及びその誘導体の冠動脈拡張作用を介した再灌流初期の冠血流量増大が、心筋壊死の抑制あるいは心機能の改善に寄与すると推測されている。本実験条件下でも、YT-146 は心筋虚血領域での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と考えられた。

一方、イヌ心筋組織血流量を増加させない用量の YT-146 を再灌流開始の 15 分前から持続投与しても、心筋梗塞サイズが縮小された。この結果から、YT-146 の心筋保護には血管拡張以外の作用の関与も推察された。この薬物投与は虚血時から行われており、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。

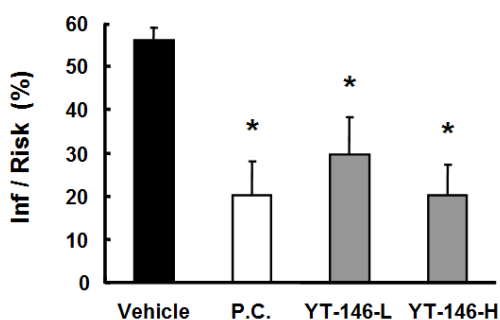


Fig.2. Effects of YT-146 and ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced myocardial infarct size in dogs. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 5 dogs. Inf/Risk, ratio of infarct size vs. risk area. Groups: vehicle, ischemic preconditioning (P.C.), 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YT-146 (YT-146-L), and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ YT-146 (YT-146-H). *, significantly different from the vehicle group ($P < 0.05$).

第二章 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

第一章で YT-146 は虚血時からの投与により冠血管拡張以外の作用を介して虚血/再灌流障害の抑制効果を発揮することが示唆された。そこで、第二章では、YT-146 の心筋への直接的な保護作用について検討するため、ラット摘出灌流心標本を用いた。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 緩衝液を用いて虚血/再灌流を行った。

YT-146 を虚血前に灌流心臓に作用させると、薬物の用量に依存して再灌流時の心機能回復が促進された。同時に、YT-146 は灌流実験で心筋細胞壊死の指標とされる心筋組織から灌流液へ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 が、心筋組織の虚血/再灌流障害を軽減したと考えられた。

次に、YT-146 処置によ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を行った。その結果、アデノシン A_{2A} 、 A_{2B} 及び A_3 受容体アンタゴニストは YT-146 による再灌流時の心機能回復促進を打ち消さなかったことから、これらアデノシン受容体サブタ

イプ刺激を介した虚血心筋保護への寄与は小さいと考えられた。一方、YT-146 とアデノシン A₁ 受容体アンタゴニストの組合せのみが YT-146 による虚血後の心機能の回復促進を打ち消した (Fig.3)。従って、YT-146 はアデノシン A₁ 受容体刺激を介し、冠血流増加に依存しない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。

虚血プレコンディショニングでは protein kinase C (PKC) の活性化が、その心筋保護作用の発揮に必須と考えられている。そこで、YT-146 の虚血プレコンディショニング様心筋保護作用への PKC の寄与について検討するため、PKC 阻害薬の chelerythrine を YT-146 と組合せて投与した。その結果、YT-146 による虚血後の心機能回復促進作用は、chelerythrine の併用によって打ち消された (Fig.3)。これらの結果から、YT-146 はアデノシン A₂ 受容体刺激よりも、むしろアデノシン A₁ 受容体刺激及びその下流の PKC 活性化を介して、虚血/再灌流障害から心筋組織を保護すると考えられた。

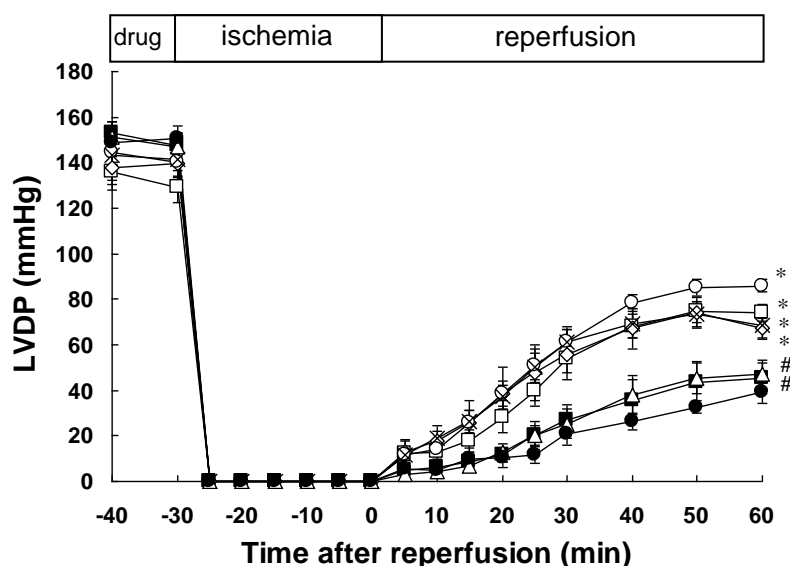


Fig.3. Time course of change in LVDP of the 30-min ischemic/60-min reperfusion. Data are shown for vehicle treated control hearts (●), hearts treated before ischemia with YT-146 0.3 μ M (○), YT-146 0.3 μ M + A₁ adenosine receptor (AR) antagonist DPCPX 0.1 μ M (Δ), YT-146 0.3 μ M + A_{2A} AR antagonist CSC 1.0 μ M (\square), YT-146 0.3 μ M + A_{2B} AR antagonist alloxazine 0.3 μ M (\diamond), YT-146 0.3 μ M + A₃ AR antagonist MRS1191 1.0 μ M (\times) and YT-146 0.3 μ M + PKC inhibitor chelerythrine 1.0 μ M (\blacksquare). 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 ($P < 0.05$).

第三章 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

虚血及び再灌流時の心筋ミトコンドリア機能維持は、再灌流時の心機能回復促進で最も重要な機序の一つである。第二章で、YT-146 はアデノシン A₁ 受容体刺激/PKC 活性化を介して心筋保護作用を発揮することが示された。しかしながら、YT-146 の虚血心筋ミトコンドリアへの作用に関しては不明である。そこで第三章では、虚血及び虚血/再灌流心臓の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。

ラット灌流心臓に、YT-146 を虚血前処置したところ、再灌流時の心収縮能回復が促進された。この心臓では再灌流時に心筋高エネルギーリン酸含量の回復が促進されたことから、虚血/再灌流時の心筋ミトコンドリアエネルギー産生能の保持が示唆された。そこで、虚血心筋から作製した skinned fiber を用い、心筋ミトコンドリア酸素消費量を測定した。その結果、YT-146 処置により虚血時に心筋ミトコンドリアエネルギー産生能が保持されることを見出した (Fig.4)。

虚血心筋の細胞内への Na⁺ 流入による Na⁺ の過剰な蓄積 (Na⁺ 過負荷) は、ミトコンドリアエネルギー産生能を非可逆的に低下させるので、再灌流時の心収縮不全の誘因となる。虚血終了時の心筋組織および心筋ミトコンドリア画分の Na⁺ 含量を測定したところ、YT-146 処置は心筋組織の Na⁺ 含量増大には影響しなかったものの、心筋組織のミトコンドリア画分の Na⁺ 含量増大を軽減した (Fig.4)。つまり、YT-146 は虚血心筋ミトコンドリアでの Na⁺ 過負荷を抑制することにより、ミトコンドリアエネルギー産生能を保持すると考えられた。

虚血心筋では、嫌氣的解糖系代謝物の sodium lactate が蓄積されるので、sodium lactate と skinned fiber をインキュベートすることで Na⁺ 負荷されたミトコンドリアを作製した。このミトコンドリアのエネルギー産生能を酸素消費速度 (OCR) で評価すると、Na⁺ 蓄積量の増大に応じて、ミトコンドリア OCR が低下した。つまり、心筋ミトコンドリアでの Na⁺ 過負荷が、そのエネルギー産生能を低下させることが *in vitro* 試験で示された。そこで、YT-146 処置群の心筋から作製された標本で同様の実験を行うと、sodium lactate 存在下でのミトコンドリアの Na⁺ 過負荷が軽減され、ミトコンドリア OCR の低下も軽減された。これらの結果から、YT-146 は Na⁺ 蓄積状態にある虚血心筋で、ミトコンドリアの Na⁺ 増加抑制を介してオルガネラのエネルギー産生能を保持し、虚血後の心機能回復を促進させると考えられた。第二章で示されたアデノシン A₁ 受容体刺激による PKC の活性化は、ミトコンドリア K_{ATP} チャネル開口および mitochondrial permeability transition pore を抑制することが報告されており、YT-146 による虚血心筋ミトコンドリアでの Na⁺ 過負荷軽減には、これらを介した機序が考えられた。

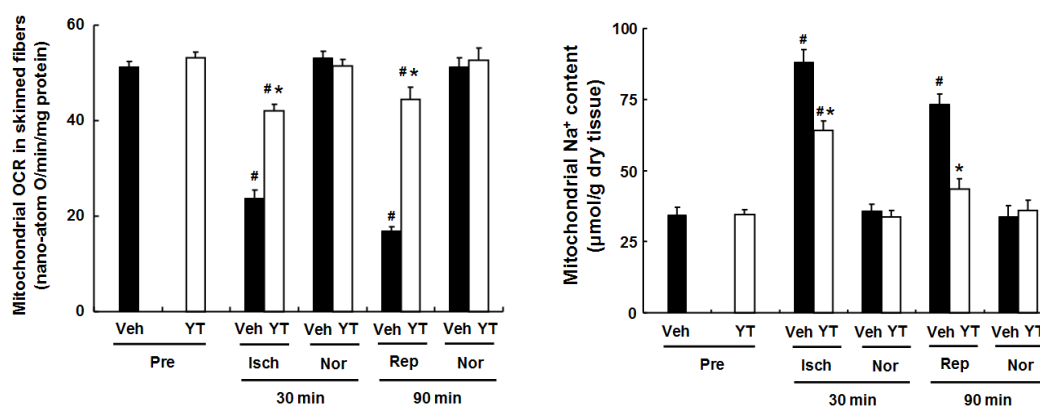


Fig.4. Mitochondrial oxygen consumption rate (left panel) and mitochondrial Na⁺ content (right panel) of left ventricular skinned fibers prepared following pres ischemia (Pre), ischemia (Isch), reperfusion (Rep), and

normoxic perfusion (Nor) from hearts without (vehicle treated, Veh; closed columns) or with 0.3 μ 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 ($P < 0.05$).

以上、本研究結果から、アデノシン受容体アゴニスト YT-146 が *in vivo* 実験系で冠動脈拡張作用等を介して虚血/再灌流障害を抑制することを示した。さらに *in vitro* 実験系で、アデノシン A₁ 受容体刺激および PKC 活性化を介した虚血/再灌流時のミトコンドリア機能保持による YT-146 の新たな虚血心筋保護の機序を提示した。本研究により、YT-146 は虚血/再灌流時の心筋保護に有用な薬物になる可能性が示された。

【研究結果の掲載誌】

1. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **47**, 614-620 (2006).
2. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **57**, 116-173 (2011).
3. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 1946-1953 (2015).

論文審査の結果の要旨

心臓のポンプ機能を低下させる心筋虚血は循環不全の誘因となる。虚血時間が短時間のうちに解除され、再灌流が行われると心機能は速やかに回復する。しかしながら、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、心筋梗塞巣が拡大し心収縮不全に陥る。この再灌流に関する逆説的な現象は虚血/再灌流障害と呼ばれる。アデノシンが虚血/再灌流時の心筋保護作用を発揮することは知られている。しかしながら、その生物学的安定性が低く、アデノシンを心筋保護薬として用いることは難しい。YT-146 は、生体内で安定なアデノシン誘導體として創製された。笹森潤氏の論文は、このアデノシン受容体アゴニスト YT-146 が虚血/再灌流時の心筋組織を保護する可能性について検討したものである。

第 1 章では、麻酔イヌを用いた虚血/再灌流実験で、再灌流時に YT-146 を処置すると、冠動脈血流量を増加させる作用を介して、心収縮力回復を促進させることを示した。さらに、虚血時から YT-146 を処置すると、冠動脈血流量を増加させなくても心機能を回復させることを示した。これらの結果から、YT-146 は、再灌流時の冠動脈血流の増加だけでなく、虚血心筋を保護することにより心筋虚血/再灌流障害を軽減させる可能性が示された。

第 2 章では、生体の循環反射および血液による影響を除外するため、ラット摘出灌流心臓を用いて虚血/再灌流実験を行った。灌流心臓への YT-146 処置は、再灌流時の心収縮力回復を促進させた。この虚血/再灌流障害からの心筋保護に関与するアデノシン受容体サブタイプを検討したところ、冠動脈拡張作用を発揮するアデノシン A₂ 受容体ではなく、虚血プレコンディショニングと同様にアデノシン A₁ 受容体を介する作用であることが示された。さらに protein kinase C (PKC) 阻害薬も YT-146 による心筋保護効果を消失させた。これらの結果は、YT-146 がアデノシン A₁ 受容体に作用し、その細胞内情報伝達系に PKC が関与することを示唆した。

第 3 章では、虚血/再灌流時の心筋エネルギー産生系に及ぼす YT-146 の効果について検討した。虚血心筋での過剰な Na⁺ 蓄積 (Na⁺ 過負荷) が、ミトコンドリアのエネルギー産生能を低下させる。YT-146 処置は、Na⁺ 過負荷を起こした虚血心筋でのミトコンドリアへの Na⁺ 流入を抑制することを示した。同時に、YT-146 処置により、虚血心筋でのエネルギー産生能が保持されることも示した。これらの結果から、YT-146 は虚血心筋で誘発される Na⁺ 過負荷によるミトコンドリアへの Na⁺ 流入抑制を介して、ミトコンドリアのエネルギー産生能を保持するという虚血心筋保護の可能性を示した。この虚血心筋でのミトコンドリアエネルギー産生能の保持が、再灌流時の心筋エネルギー代謝を改善し、心機能回復を促進させると考えられた。

これらの結果から、アデノシン受容体アゴニスト YT-146 は、虚血/再灌流障害から心筋を保護する薬物となる可能性が提示された。したがって、本論文は、博士（薬学）学位申請論文として相応しいものと判断する。