

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890257

研究課題名（和文） 心臓再灌流障害における活性酸素生成源の同定と薬物治療への応用

研究課題名（英文） Identification of the source of reactive oxygen species during heart reperfusion and application to pharmacotherapy

研究代表者

石原 康宏（ISHIHARA YASUHIRO）

徳島文理大学 香川薬学部 薬理学講座 助教

研究者番号：80435073

研究成果の概要：

心筋梗塞は、国内外に多くの罹患者がおり、死因の上位に位置する。心筋梗塞の治療は、経皮的冠動脈形成術や血栓溶解療法により行われるが、これらの治療により血流が回復した直後、心筋はさらに障害を受ける（再灌流障害）。心臓再灌流障害には活性酸素が関与するため、その治療薬として抗酸化薬の開発が進められてきたが、その治療効果は低く、臨床応用には至っていない。抗酸化剤よりも効率的に細胞内活性酸素量を減らすためには、活性酸素生成源に直接作用し活性酸素生成を阻害する薬剤が必要である。しかしながら、心臓再灌流障害における活性酸素生成源は未だに特定されていない。

申請者は、薬物代謝酵素であるチトクロム P450 が基質代謝の有無に関わらず活性酸素を生成すること、また、チトクロム P450 より生成された活性酸素により細胞が障害されることを報告し、チトクロム P450 が生理的、病態生理的に活性酸素生成源となっている可能性を提示した。さらに、ランゲンドルフ灌流心を用いた実験により、チトクロム P450 阻害薬が再灌流障害を抑制することを示し、心臓虚血・再灌流障害において、チトクロム P450 が活性酸素生成源となっていることを示唆した。本研究では、*in vivo*心筋梗塞モデルラットを用いて、チトクロム P450 が心臓虚血・再灌流障害における活性酸素生成源であることを示し、チトクロム P450 阻害薬の再灌流障害治療薬としての可能性を探ることを目的とする。

ラット冠状動脈左前下行枝を 1 時間結紮後に、24 時間再灌流するラット心筋梗塞モデルを用いた。再灌流 24 時間後、梗塞巣の大きさを評価したところ、コントロールでは虚血領域の約 50% に梗塞巣が見られた。チトクロム P450 阻害薬であるスルファフェナゾール、または、シメチジンを再灌流時に投与したところ、再灌流による梗塞巣の進展を濃度依存的に抑制した。その抑制作用は、シメチジンと比較して、スルファフェナゾール方が強かった。また、チトクロム P450 阻害薬は、再灌流障害で悪化した心機能を改善した。次に、チトクロム P450 と酸化ストレスとの関連を調べた。チトクロム P450 阻害薬投与時の心筋中過酸化脂質量を測定したところ、再灌流により増加した過酸化脂質は、チトクロム P450 阻害薬投与により減少した。また、心筋中の活性酸素量を調べたところ、再灌流により増大した心筋活性酸素は、チトクロム P450 阻害薬の投与により減弱した。次に、チトクロム P450 阻害薬の *in vivo*における心筋チトクロム P450 阻害活性を、テストステロン代謝を指標に測定した。スルファフェナゾールは、心筋チトクロム P450 を有意に阻害する一方、シメチジンは、心筋チトクロム P450 を阻害する傾向が見られたものの、有意差は認められなかった。

以上の結果は、心臓虚血・再灌流障害における活性酸素生成源はチトクロム P450 であることを示している。チトクロム P450 阻害薬は、心筋チトクロム P450 の阻害により活性酸素生成を抑制し、酸化ストレスを減弱することにより再灌流障害に奏功する。チトクロム P450 阻害により梗塞巣の進展が抑制されるだけでなく心機能も改善することから、チトクロム P450 阻害薬は有効な再灌流治療薬となる可能性を秘めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：チトクロム P450、心筋梗塞、再灌流障害、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

心臓が一定時間以上虚血になると、心筋細胞は壊死し心筋梗塞巣（死細胞の集団）が形成される。その後、血流を再開しても、心筋梗塞巣は回復せずさらに拡大してしまう（再灌流障害）。再灌流障害には活性酸素が関与するため、その治療薬として抗酸化薬の開発が進められてきた。しかし、抗酸化薬はすでに生成した活性酸素を消去する薬物であるため治療効果は低く、臨床応用には至っていない。抗酸化薬よりも効率的に細胞内活性酸素量を減らすためには、活性酸素生成源に直接作用し活性酸素生成を阻害する薬物が必要である。しかしながら、再灌流障害における活性酸素生成源は未だに特定されていない。

申請者は、最近、薬物代謝酵素チトクロム P450 が生成する活性酸素により培養細胞が障害されることを明らかにした (Ishihara et al., Free Radic. Res. 39:163-173,2005, Ishihara et al., J. Biol. Chem. 281:6726-6733,2006, Fig.1)。チトクロム P450 は心臓にも多く局在するため、チトクロム P450 が心臓再灌流障害における活性酸素生成源となっている可能性がある。そこで、申請者は、ランゲンドルフ式灌流心を用いて、チトクロム P450 の虚血・再灌流障害に及ぼす影響を調べたところ、チトクロム P450 阻害薬である SKF-525A、及び、シメチジンの前処置により再灌流障害が抑制されることが示された。また、Granville からも、摘出心臓を用いた *in vitro* 実験系において、チトクロム P450 阻害剤が再灌流障害を抑制することを報告している (Granville et al. PNAS 101:1321-1326,2004)。しかしながら、上記の知見はすべて培養細胞や摘出心臓を用いた *in vitro* 実験系により得られたものである。

これら *in vitro* 実験系では血液の再灌流を行うことができないため、再灌流障害を正確に再現できない。再灌流障害におけるチトクロム P450 由来活性酸素の役割を明らかにするためには、*in vivo* の系での検討が必要である。

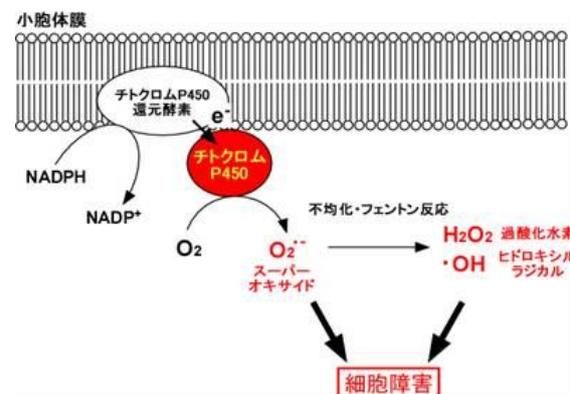


Fig 1. チトクロム P450 による活性酸素生成機構

チトクロム P450 は、チトクロム P450 還元酵素より受け取った電子を分子状酸素に付加し、スーパーオキシドを生成する。スーパーオキシドは、それ自身が細胞毒性を示すほか、過酸化水素やヒドロキシルラジカルに変換されて、細胞を障害する。

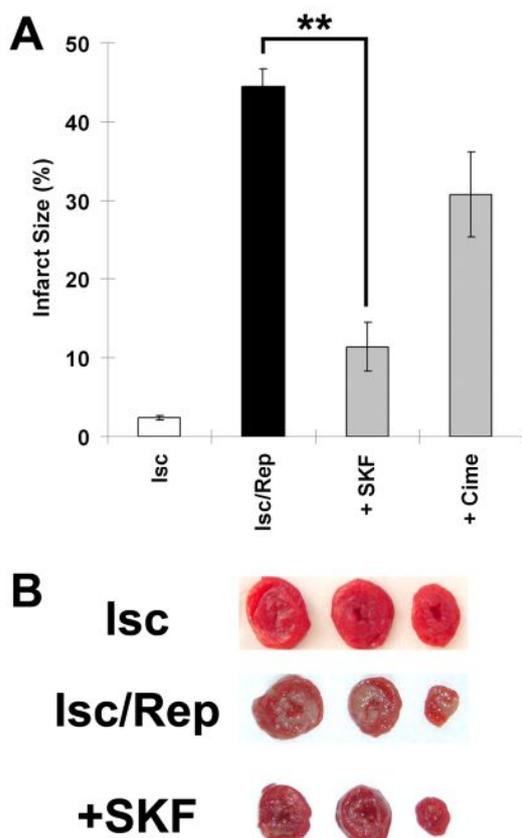


Fig 2. チトクロム P450 阻害薬による再灌流障害の抑制

ラットより摘出した心臓をランゲンドルフ式灌流装置に取り付け、30分虚血、2時間再灌流を行った後、梗塞巣の進展を triphenyltetrazolium chloride (TTC) 法により評価した。A, 梗塞巣の割合, B, TTC 染色後の心臓写真 (赤色; 生細胞, 白色; 梗塞部位)。再灌流により引き起こされる梗塞巣の進展は、チトクロム P450 阻害薬である SKF (50 μ M) や cimetidine (100 μ M) 処置により抑制される。

(Isc ; 虚血, Isc/Rep ; 虚血-再灌流)

2. 研究の目的

本研究は、*in vivo* 心筋梗塞モデルラットを用いて、以下の2点を明らかにすることを目的とする。

(I) チトクロム P450 が心臓再灌流障害における活性酸素生成源である

(II) チトクロム P450 阻害剤処置により、再灌流障害における心循環動態の悪化が軽減する

具体的な研究内容は以下の通りである。

(I) チトクロム P450 が心臓再灌流障害における活性酸素生成源である

心筋梗塞モデルラットの心筋組織中活性酸素量を測定し、再灌流障害において活性酸

素量が増加していることを示す。さらに、チトクロム P450 を阻害した後、再灌流障害を誘発したときの活性酸素量及び心筋梗塞巣の進展を測定することによって、チトクロム P450 由来活性酸素により心臓再灌流障害が起きることを明らかにする。

(II) チトクロム P450 阻害剤処置により、再灌流障害における循環器動態の悪化が軽減する

チトクロム P450 阻害剤を前処置した後、心臓再灌流障害を誘導する。心循環動態 (血圧、左心室圧、左心室圧上昇速度 [dP/dt ; 心臓収縮力の指標]、心拍数、心電図) を測定し、阻害剤処置により梗塞巣が縮小するだけでなく、心循環動態の悪化も軽減することを明らかにする。

3. 研究の方法

(i) 心臓虚血-再灌流障害の誘導と梗塞巣進展の評価

ラット冠状動脈左前下行枝 (LAD) 結紮後に血流を再開するラット心筋梗塞モデルを用いる。ラットを麻酔下に開胸し、LAD を1時間結紮した後、覚醒下に再灌流を24時間行った。また、ラットに電極を取り付け、心電図を測定して、心電図の波形より虚血状態を確認した。再灌流24時間後、エバンスブルーにより虚血部位と非虚血部位を分けた後、心筋の非梗塞部位を triphenyltetrazolium chloride (TTC) により染色し、梗塞部位および非梗塞部位の秤量により、障害の程度を評価した。

(ii) チトクロム P450 阻害薬の投与

スルファフェナゾールは、0.1M 水酸化ナトリウムに、シメチジンは0.5M 塩酸に溶解し、再灌流直後に大腿静脈より投与した。

(iii) 心循環動態の測定

再灌流24時間後、頸動脈より左心室内にミラーカテーテル (圧センサー付カテーテル) を挿入し、左心室圧、及び、心筋収縮力の指標である dp/dt を測定した。また、大腿動脈より圧センサーに直結したカテーテルを挿入し、血圧及び心拍数を測定した。

(iv) 過酸化脂質の測定

再灌流24時間後、心臓を摘出、脱血し、虚血部位と非虚血部位に分けた。それぞれの部位におけるマロンジアルデヒド量を定量し、脂質過酸化の指標とした。心筋組織を凍結破砕した後、1.15% KCl 溶液中でホモジナイズした。この懸濁液とチオバルビツール酸を100 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、生じた反応性生物 (TBARS) を532nm で定量した。検量線

には、1,1,3,3-Tetraethoxypropane を用いた。

(v) 心筋活性酸素量の測定

雄性 Wistar ラットを麻酔下に開胸し、LAD を 1 時間結紮した後、覚醒下に再灌流を 10 分間行った。活性酸素反応性色素であるジヒドロエチジウム (DHE) を心尖より左心室内に投与した後 (2mM 溶液を 1mL 投与)、心臓を摘出し、凍結切片を作製した。各切片を共焦点蛍光顕微鏡下で観察し、エチジウムの蛍光を検出した。

(vi) 心筋チトクロム P450 活性の測定

薬物を大腿動脈より投与し、1 時間後に心臓を摘出して心筋ミクロソーム画分を調整し、ミクロソームにおけるテストステロン代謝活性を指標としてチトクロム P450 活性を評価した。

心筋ミクロソームは、脱血した心臓より、多段階遠心法により取得した (Ishihara et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214: 109–117, 2006)。心筋ミクロソーム 0.1mg に対してテストステロンを終濃度 1mM で添加し、NADPH の存在下で代謝反応を 37°C で 3 時間行った。テストステロン、及び、その代謝物を酢酸エチルで抽出した後、酢酸エチルを気化させ、残渣をメタノールに溶解して、測定用サンプルとした。サンプル中のテストステロン代謝物であるアントロステンジオンを HPLC、及び、紫外光吸収により定量した。HPLC 条件は以下の通りである。

column, ODS-3 (3.0×250mm, 4 µm) (GL Science, Tokyo, Japan); column temperature, 40 °C; flow rate 0.5 ml/min;

UV detection, 246 nm. The mobile phase consisted of water (solvent A), methanol (solvent B) and acetonitrile (solvent C), and analysis was initiated with an isocratic elution of 60% A, 25% B and 15% C for 17 min, followed by 45% A, 40% B and 15% C for 6 min and finally 45% A, 45% B and 10% C thereafter. The total run time is 50 min per sample.

4. 研究成果

(i) 心臓虚血-再灌流障害の誘導と心機能及び梗塞巣進展の評価

心臓虚血-再灌流障害の誘導には、ラット冠状動脈左前下行枝 (LAD) 結紮後に血流を再開するラット心筋梗塞モデルを用いた。ラットを麻酔下に開胸し、LAD を 1 時間結紮した後、覚醒下に再灌流を 24 時間行った。左心室圧及び心収縮力の指標である dp/dt を測定した後、心臓を摘出し、梗塞巣の進展を triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色により評価した。

1 時間虚血、24 時間再灌流により、虚血部位の約 50% に心筋梗塞巣が認められた。チトクロム P450 阻害薬であるスルファフェナゾール、シメチジンを再灌流時に投与したところ、これらの阻害薬は、濃度依存的に心筋梗塞巣の進展を抑制した (Fig. 3A)。また、スルファフェナゾールの梗塞巣進展抑制作用は、シメチジンのそれと比較して強かった。さらに、スルファフェナゾール投与により、再灌流障害による心機能の悪化が有意に抑制された (Fig. 3B, C)。

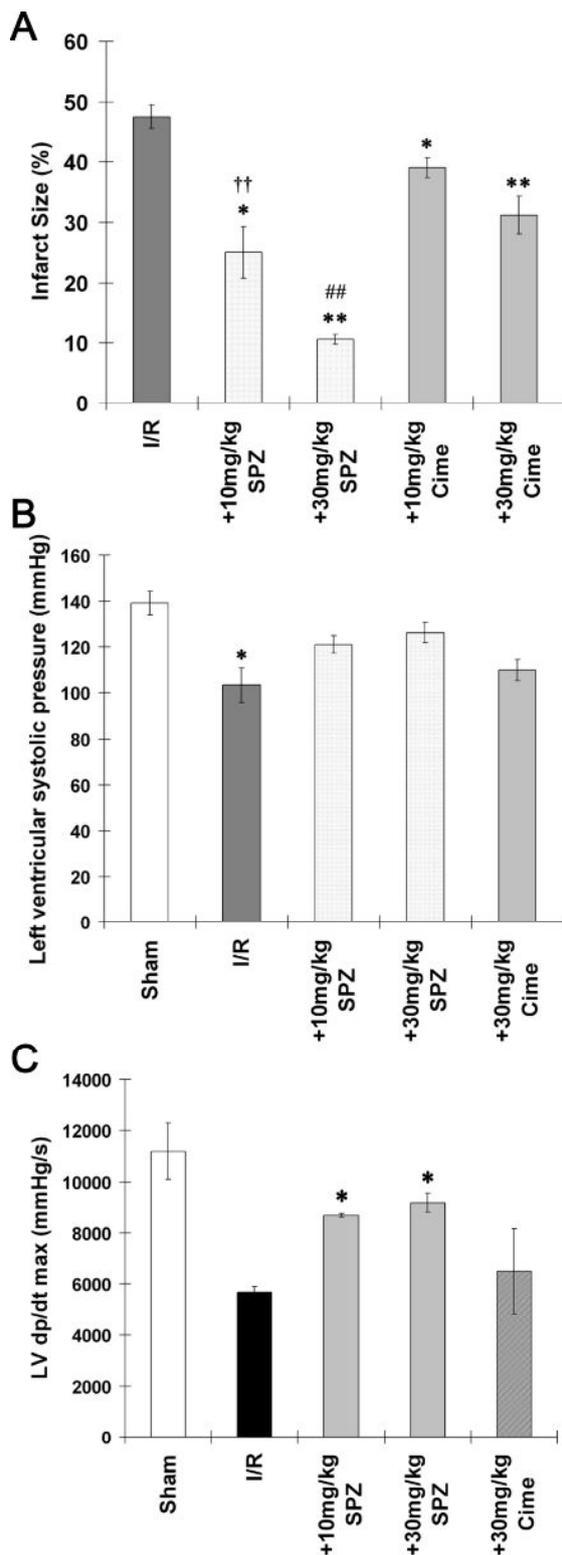


Fig 3. CYP 阻害薬による梗塞巣進展の抑制 (A) と心機能の改善 (B, C)

雄性 Wistar ラットを麻酔下に開胸し、LAD を 1 時間結紮した後、覚醒下に再灌流を 24 時間行った。チトクロム P450 阻害薬は、再灌流直後に大腿静脈より投与した。再灌流 24 時間後、心室圧測定用カテーテルを大動脈より左心室内に挿入し、収縮期左心室圧及び

心筋収縮力の指標である dp/dt max を測定した。これらのパラメーターの測定後、心臓を取り出し、エバンスブルー染色により虚血部位、非虚血部位を分離した後、TCC 染色により梗塞巣の進展を評価した。(A) チトクロム P450 阻害薬による梗塞巣進展抑制効果。梗塞巣の進展は、虚血領域に対する梗塞領域の比を用いて評価した。(B) チトクロム P450 阻害薬による収縮期左心室圧の低下抑制効果。(C) チトクロム P450 阻害薬による dp/dt max の低下抑制効果。左心室の収縮能の指標として、dp/dt max を測定した。

Sham; sham-operated rat, I/R; ischemia-reperfusion, SPZ; sulfaphenazole, Cime; cimetidine.

(ii) チトクロム P450 阻害薬の活性酸素生成抑制作用

LAD を 1 時間結紮した後、覚醒下に再灌流を 24 時間行い、心臓虚血・再灌流障害を誘導した。再灌流 24 時間後に心臓を摘出し、虚血領域、非虚血領域に分けた後、TBARS の測定を行った。再灌流障害により虚血領域における脂質過酸化量は大きく増大した。スルファフェナゾールの投与は、用量依存的に脂質過酸化を抑制した (Fig.4A)。シメチジンも、脂質過酸化を抑制したものの、スルファフェナゾールほどの作用は認められなかった。

次に、再灌流時における心筋活性酸素量を測定した。測定には、スーパーオキシドによりエチジウムへと変換し、核内で DNA と結合して蛍光を発する色素 DHE を使用した。再灌流 10 分後に DHE を左心室へ投与した。心臓を摘出し、虚血領域、非虚血領域に分けた後、凍結切片を作製した。各切片を共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、心筋活性酸素量を評価した。再灌流により増大した心筋活性酸素量は、スルファフェナゾール投与により大きく減少した (Fig.4B)。シメチジンも、活性酸素生成抑制作用を有していたものの、スルファフェナゾールほどの作用は認められなかった。

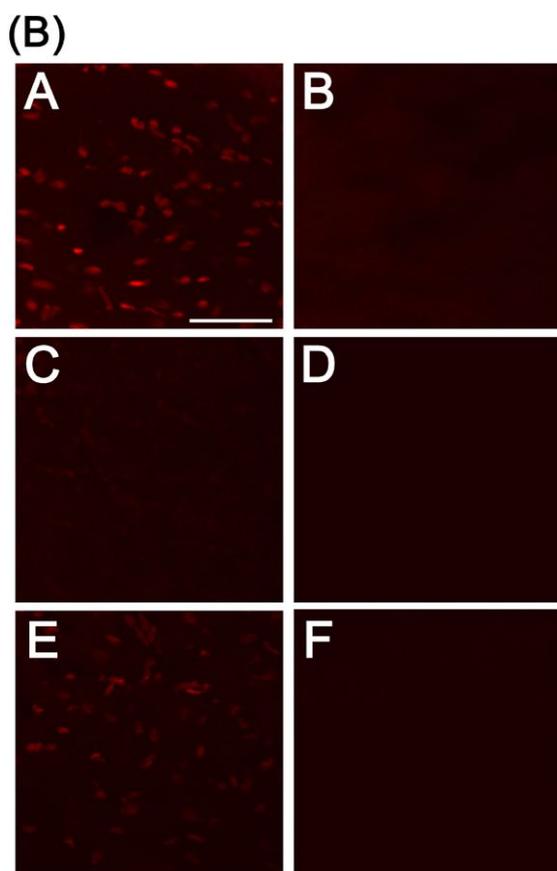
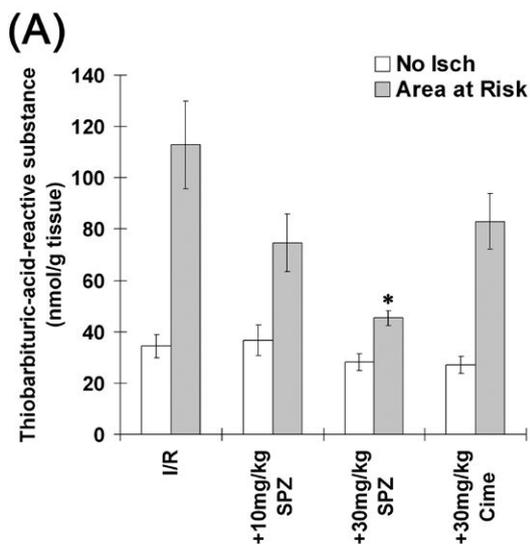


Fig 4. チトクロム P450 阻害薬による (A) 心筋過酸化脂質及び (B) 心筋活性酸素の生成抑制

雄性 Wistar ラットを麻酔下に開胸し、LAD を 1 時間結紮した後、覚醒下に再灌流を 24 時間行った。チトクロム P450 阻害薬は、再灌流直後に大腿静脈より投与した。(A) 再灌流 24 時間後、心臓を摘出し、エバンスブルー染色により虚血部位、非虚血部位を分離した後、過酸化脂質量を測定した。(B) 再灌流 10 分後に DHE を左心室内に投与した後、心臓を摘出し、凍結切片を作製した。各切片

を共焦点蛍光顕微鏡下で観察し、エチジウムの蛍光を検出した。A; 虚血領域 I/R, B; 非虚血領域 I/R, C; 虚血領域 30mg/kg SPZ, D; 非虚血領域 30mg/kg SPZ, E; 虚血領域 30mg/kg Cime, F; 非虚血領域 30mg/kg Cime.

I/R; ischemia-reperfusion, SPZ; sulfaphenazole, Cim; cimetidine; No Isch, 非虚血領域, Area at Risk; 虚血領域.

(iii) CYP 阻害薬の *in vivo* チトクロム P450 阻害作用

ラットに大腿静脈よりスルファフェナゾール、または、シメチジンを投与した。1 時間後、心臓を摘出し、心ミクロソーム分画を調整した。このミクロソーム分画におけるテストステロンのアンドロステンジオンへの代謝活性を測定し、心筋チトクロム P450 活性の指標とした。

ラット心筋チトクロム P450 活性は、Sham 群と比較して、スルファフェナゾール投与群において有意に低下した。シメチジン投与群でも活性は低下傾向にあったが、有意差は認められなかった (Fig.5)。従って、チトクロム P450 阻害薬、特に、スルファフェナゾールによる再灌流障害抑制作用は、心筋チトクロム P450 阻害に起因すると考えられる。

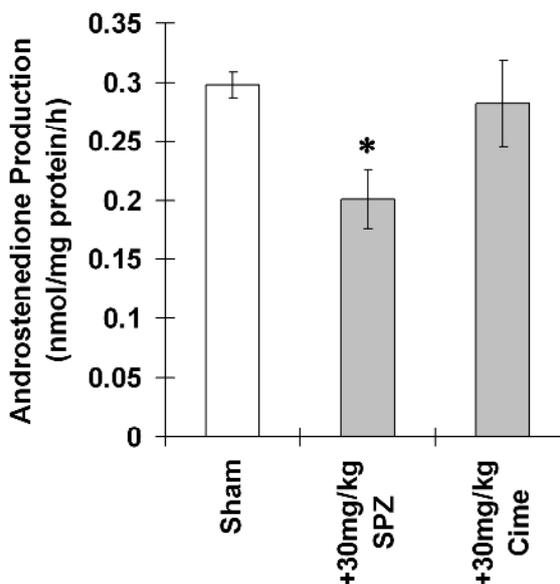


Fig 5. チトクロム P450 阻害薬の *in vivo* 心筋チトクロム P450 阻害能の評価

チトクロム P450 阻害薬を大腿静脈より投与し、1 時間後に心臓を摘出して、心筋ミクロソームを調整した。ミクロソームにおけるテストステロンのアンドロステンジオンへの代謝を測定した。

SPZ; sulfaphenazole, Cim; cimetidine.

心筋梗塞などの虚血性心疾患は、世界中に

多くの罹患者がみられ、発病後の予後も悪いことから死因の上位を占める。重度の虚血性心疾患の治療は、経皮的冠動脈形成術や血栓溶解療法により行われる。しかし、これらの治療により心筋組織が虚血から回復した後も、心筋組織はさらに障害される（再灌流障害）。再灌流障害を治療若しくは予防する薬は現時点では上市されておらず、開発が待たれている。私たちは、本研究において、チトクロム P450 阻害薬が心臓再灌流障害における活性酸素生成を抑制し、その結果、梗塞巣の進展が抑制されることを示した。チトクロム P450 阻害薬による心保護作用は、再灌流時投与でも認められることから、チトクロム P450 阻害薬は、心臓再灌流障害の治療（予防）薬となる可能性を秘めている。本研究は、心臓再灌流障害治療（予防）のコンセプトを与えた点で、非常に意義深いものである。しかしながら、チトクロム P450 阻害薬を、心臓再灌流障害治療（予防）薬として開発するためには、幾つかの課題を克服しなければならない。私たちは、本研究を進展させるべく、以下の2点について研究を開始した。

(I) チトクロム P450 由来活性酸素による再灌流障害の機序の探索

(II) 再灌流障害抑制作用の強いスルファフェナゾール誘導体の開発

まず、チトクロム P450 阻害薬の心筋保護の機序を明らかにする必要がある。即ち、再灌流時において産生する活性酸素がどのような機序で心筋障害を引き起こすかを明らかにする。また、本研究においては、スルファフェナゾールが高い心筋保護効果を示した。スルファフェナゾールは、直接、活性酸素を消去することも報告されている (Khan et al. JPET 323:813-821,2007)。そこで、スルファフェナゾールより種々の誘導体を合成し、チトクロム P450 阻害能、活性酸素消去能、再灌流障害抑制効果について構造活性相関を調べ、再灌流障害抑制作用が強い薬物を探索する。以上の研究により、心臓再灌流障害という現在、薬物治療が存在しない領域に薬物治療が確立できればと思い、日々、実験に励んでいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. **Ishihara Y.**, Sekine M., Hatano A. and Shimamoto N. Sustained Contraction and Endothelial Dysfunction Induced by Reactive Oxygen Species in Porcine Coronary Artery. *Biol. Pharm. Bull.* 31(9), 1667-1672 (2008).
2. **Ishihara Y.**, Sekine M., Nakazawa M. and Shimamoto N. Suppression of Myocardial Ischemia-Reperfusion

Injury by Inhibitors of Cytochrome P450 in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* In Press (2009)

[学会発表] (計5件)

1. 第29回日本フリーラジカル学会学術集会/日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第31回大会 合同学会 持続的酸化ストレスによって引き起こされるカスパーゼ非依存的肝細胞アポトーシスの機序. **石原 康宏**, 嶋本 典夫.
2. 第81回 日本薬理学会年会 Oxygen radicals-induced contraction and endothelial damage of porcine coronary artery. **Yasuhiro Ishihara**, Ai Hatano and Norio Shimamoto.
3. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会 酸化ストレスにより引き起こされる EGFR-ERK 活性化を介したアポトーシス. **石原 康宏**, 関根 雅也, 竹内 健治, 伊藤 文昭, 嶋本 典夫.
4. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 Hepatocyte apoptosis induced by endogenous oxidative stress is mediated through EGFR-ERK activation. **Yasuhiro Ishihara**, Kenji Takeuchi, Fumiaki Ito and Norio Shimamoto.
5. 第82回 日本薬理学会年会 Enhancement of quinone-induced hepatotoxicity by cytochrome P450 inhibition in rats. **Yasuhiro Ishihara**, Satomi Ishii, Yufu Sakai and Norio Shimamoto.

[その他]

ホームページ:

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph01/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原 康宏 (YASUHIRO ISHIHARA)

徳島文理大学 香川薬学部 薬理学講座 助教

研究者番号: 80435073