

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10205

研究課題名(和文)新規インドール化合物の心臓血管外科領域における臓器保護への応用

研究課題名(英文) Application of new indole compounds to organ protection in the Cardiovascular surgery

研究代表者

安達 理 (Adachi, Osamu)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30375092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規インドール化合物は、腎、脳の虚血再灌流障害に対する抑制効果が示されている。心臓血管外科領域における臓器保護に対する有効性を検討し、臨床応用に向けた可能性を探求した。脊髄障害は胸腹部大動脈置換術における重篤な合併症である。ウサギを用いた術中脊髄血液低灌流モデルにおいては、脊髄の虚血再灌流抑制効果は認められなかった。また、心臓移植におけるドナー心保護効果を評価した。心移植に先立って、心臓摘出からの経過時間によるラット心筋のATP量の変化について検討した。心臓摘出2時間後には心筋のATP含有量は非投与群と同等に低下していた。今回の検討では脊髄保護、心筋保護効果を実証することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：The new indole compound has depression effect for the ischemic reperfusion injury of the brain and kidney. We examined efficacy for the organ protection in the cardiovascular surgery region. Spinal cord injury is a serious complication in the replacement of the thoracoabdominal artery. In the perioperative spinal cord blood hypoperfusion model using the rabbit, the spinal ischemic reperfusion depression effect was not found. We evaluated a donor cardioprotection effect in the heart transplant. We examined a change of the quantity of rat myocardial ATP by the elapsed time from heart extraction. The myocardial ATP content decreased equally with a non-administration group two hours after the heart extraction. In these examination, we were not able to demonstrate spinal cord and myocardial protection effect.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：インドール化合物 脊髄保護 心移植 ミトコンドリア ATP 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

心臓の移植成績は良好となっているが、早期グラフト機能不全が解決しなければならない課題として残されている。グラフト機能不全が起これば、再度心臓移植を行う必要がある。レシピエントの負担は勿論のこと、善意で臓器を提供して下さったドナーとその遺族の善意を無碍にすることになるため、避けたい合併症の一つである。グラフト機能不全と有意に関連するものとして、ドナー心の虚血再灌流障害が近年注目されている。心臓は虚血にもっとも弱い臓器の一つとされており、再灌流障害により血管内皮障害、微小循環障害、アポトーシスの誘導、炎症の促進などが生じ、結果としてグラフトの機能不全へとつながるとされる。虚血時におけるミトコンドリア機能の維持ができれば、組織の虚血抵抗性の改善、虚血再灌流障害の抑制につながり、心臓移植後のグラフト機能不全の抑制、心臓移植の成績改善につながると考えられる。

また、胸腹部大動脈瘤、広範囲胸部下行大動脈における手術においては、肋間動脈から栄養される脊髄が、術中の虚血再灌流によって障害され、両下肢の運動障害（対麻痺）を引き起こすことがある。現在でもなお、5-10%前後に起こる合併症とされており、患者のADLを著しく落とす合併症の一つである。

2. 研究の目的

今回使用する新規のインドール化合物は、細胞内ATP増加作用、ミトコンドリアストレス下における細胞保護作用を有している。ミトコンドリアを豊富に含む心臓において本化合物が虚血再灌流障害の抑制、組織保護に有効であるかどうかを検証する。また、このインドール化合物を用いて、脳における虚血再灌流障害の抑制がすでに実験的に示されている。脊髄における虚血再灌流障害による対麻痺の抑制効果についても同様に検討する。

3. 研究の方法

臨床応用に向けた新規化合物の最適化に関する試験：新規インドール化合物は非水溶性薬剤であるため、再沈法を用い新規インドール化合物ナノ粒子の分散液として経静脈的投与が可能な臓器保護液の液性薬剤を作製する。これまでの実験ですでに本化合物のナノ粒子化が可能ことが確認され、DMSOの含有率を1%以下という静脈内投与可能であるレベルにまで減量することに成功している。現在本化合物の分散液濃度が0.1mM以上となるとナノ粒子が結晶化してしまいより高濃度の液剤の作製への工夫が課題である。本研究では、そのナノ粒子化インドール化合物分散液の安全性、有効性を確立するとともに、比較的容易である本技術を応用し、現段階では小規模にとどまっている薬剤精製のスケールアップを図る。

新規インドール化合物の修飾、ナノ粒子水分散液の作製：新規化合物の生体内効果を改良するために、新規化合物のバイオアベイラビリティを上げる構造を付加する（薬剤のメチル化など）、用いる置換基、及び連結基の種類を最適化することで分散濃度の向上を図るとともに薬剤の作用速度を制御する方法を確立する（ゲラニオール、コレステロールの化合物への導入）などの化合物の修飾を行う。その上で、「再沈法」を用いて化合物をナノ粒子化する。

動物実験倫理委員会の承認を得た上で、薬剤ナノ粒子の体内動態や化学挙動の評価、安全性の評価・検証：小動物にナノ粒子化した薬剤を投与し、血中、組織中濃度を測定する。薬剤のナノ粒子化に伴う副作用の増加などの有害事象がないことを確認する。薬剤の容量を調整し、至適容量を検証する。

心移植モデルラットの作製：個体Aより心臓を摘出し、臓器保護液にて保存する。その後、個体Bを開腹し、腹部大動脈にアプローチした

のち、摘出心の大動脈基部を腹部大動脈に、肺動脈を下大静脈に吻合し、異所性心移植モデルとする。臓器保護液での心臓の保存時間はこれまでの先行研究に倣い16時間4 を検討している。実験群に関しては以下の3群について行う(各群N=10)。(a)コントロール群：新規化合物を含まない溶媒のみのナノ粒子分散液を経静脈的投与する群、(b)新規インドール化合物ナノ粒子の分散液(低濃度)を経静脈的に投与する群、(c)新規インドール化合物ナノ粒子の分散液(高濃度)を経静脈的に投与する群。新規化合物のドナーラットへの投与時期としては、これまでの脳虚血再灌流モデルに倣い臓器摘出の4時間前に投与することとする。ただし、投与時間、また、(b)、(c)の濃度設定に関してはパイロットスタディを経て変更する可能性がある。評価項目、評価時期としては以下のものを検討している。採血(移植直後、再灌流後3時間後) - EP0、心筋逸脱酵素、乳酸を評価する。心拍 - 移植後の心拍再開までの時間、調律を評価する。病理組織学的検査 - 犠牲死させたのち心臓を摘出し、病理組織学的検査で虚血再灌流障害の程度を評価する。心筋細胞を電子顕微鏡にて観察し、ミトコンドリア構造の障害のレベルも確認する。その他 - 本化合物の心筋虚血再灌流における効果発現機序確認のため、組織内ATPレベル、rt-PCRでIL-6, ICAM-1, TNF-, GADPHの確認、また免疫染色はCD45, 68について行う予定である。

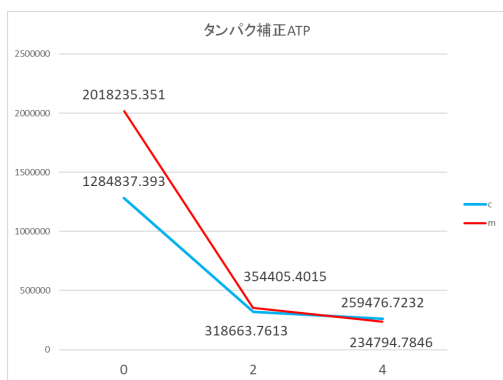
脊髄虚血ウサギモデルの作製：右大腿動脈から5Fr.pediatric balloon-tipped catheterを挿入し、15cm進めた腹部大動脈内でballoonを拡張させ15分間血流を遮断し、脊髄虚血モデルを作成する。実験群に関しては上記同様に3群について行う(各群N=10)。評価項目、評価時期に関しては以下を検討している。神経学的評価(覚醒後、手術48時間後) - 運動機能、感覚機能(温覚・冷覚・痛覚)の評価を行う。病理組織学的検討 - 2回目の神

経学的評価後、ウサギを犠牲死させ、遮断範囲と同じ高さの脊髄と硬膜を標本として採取し、肉眼的に評価する。続いて標本を固定し、HE染色を行い、血液低灌流による神経障害の程度や脊髄再灌流障害の有無などを病理組織学的に評価する。

4. 研究成果

新規インドール化合物をウサギに投与することは初めての試みであったために、まず投与後の血行動態を調べ、投与法の検討を行なった。新規インドール化合物を液体に溶解して投与することで再現性を持った血中濃度を得ることができた。内服後1時間後にピークが来ており、半減期は2.5時間であった。以上の結果をもとに、11羽のウサギに対して実験を行なった。前日、当日、術前と新規インドール化合物をウサギに投与し、脊髄虚血モデルを作成、脊髄保護効果の検証を行ったが、神経学的評価で改善を認めた個体は認められなかった。また同時に6羽のコントロール群も作成し比較したが、差を認めなかった。また病理学的所見においても両群で差を認めなかった。

心臓移植におけるドナー心保護効果の評価した。心移植に先立って、心臓摘出からの経過時間によるラット心筋のATP量の変化について検討した。心臓移植は、そのゴールデンタイムが4時間以内とされており、それ以上経過するとドナー心の機能不全が起こるとされている。まず、インドール化合物を内服させた群(m群)を、心臓摘出から0時間、摘出後2時間、摘出後4時間で心臓のATPを抽出し、インドール化合物を内服させていない群(c群)と比較した。0時間ではm群で有意に心筋内ATP含有量は多かったが、2時間では両群間に有意差を認めなくなっていた(下図)。



インドール化合物内服によって、心筋内のATPが増加することは分かったが、虚血時間とともに減少し、2時間では非内服群と同等まで低下していた。このインドール化合物の効果を少なくとも4時間は持続させる方法が、心移植においてこの化合物を応用するには必要であると考える。

今回の検討では脊髄保護、心筋保護効果を実証することは出来なかった。この先行実験の結果から、ラットの心臓移植は行わない方針とした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 理 (Adachi, Osamu)
 東北大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：30375092

(2) 研究分担者

齋木 佳克 (Saiki, Yoshikatsu)
 東北大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：50372298
 阿部 高明 (Abe, Takaaki)
 東北大学・医工学研究科・教授
 研究者番号：80292209
 笠井 均 (Kasai, Hitoshi)
 東北大学・多元物質科学研究所・教授
 研究者番号：30312680

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()