

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10620

研究課題名(和文) 虚血再灌流後重症不全心に対する新規インドール化合物の心筋保護への応用

研究課題名(英文) Application of new indole compounds to myocardial protection for severe heart failure after ischemia reperfusion

研究代表者

増田 信也 (Masuda, Shinya)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30596094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新規インドール化合物はATP増加作用と、虚血時の細胞保護作用がうたわれている。腎と脳における動物実験で、虚血再灌流障害に対する抑制効果を示されてきた。心移植では虚血再灌流障害による移植心の術後心不全が問題となることがあり、再移植を免れないケースもある。我々は、本化合物の心移植における虚血再灌流障害に対する有効性を検討し、その臨床応用に向けた可能性を探求することとした。ラットの心筋への効果を評価するために、心臓摘出からの心筋ATP含有量の変化について検討した。摘出後2時間で投与群と非投与群にATP量に差は認めず、有意差を示したのは摘出直後のみであり、心筋のATP量に思うような変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心移植では虚血再灌流障害による移植心の術後心不全が問題となることがあり、再移植を免れないケースもある。本邦は諸外国に比べ、ドナー登録者数が少なく、貴重な移植心を虚血再灌流によって機能低下させてしまうようなことは可能な限り避けたい。新規インドール化合物によって心筋の虚血再灌流障害を抑制する事が可能になれば、移植心の心不全を予防することが出来ると考えられる。現段階では時間依存性に心筋のATPは低下してしまうが、今後、投与方法や投与経路を改善することで、良好な結果が期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The novel indole compounds are known to have an ATP-increasing action and a cytoprotective action during ischemia. Animal studies in the kidney and brain have shown inhibitory effects on ischemia reperfusion injury. In heart transplantation, post-operative heart failure after transplantation due to ischemia / reperfusion injury may be a problem, and in some cases retransplantation is inevitable. We decided to investigate the efficacy of this compound for ischemia reperfusion injury in heart transplantation and to explore the possibility for its clinical application.

In order to evaluate the effects on rat myocardium, changes in myocardial ATP content from cardiac extraction were examined. There was no difference in the amount of ATP between the administration group and the non-administration group at 2 hours after the excision, and a significant difference was shown only immediately after the excision, and there was no noticeable change in the myocardial ATP amount.

研究分野：心臓血管

キーワード：心移植 ATP インドール化合物 虚血再灌流障害

## 1. 研究開始当初の背景

心臓手術周術期における心筋への障害が致命的になり得る病態として、大動脈弁狭窄症における肥大心筋症例、再手術の増加に伴う複雑で長時間におよぶ心筋虚血、同一手術内での再心停止による反復する虚血再灌流障害などがあり、人工心肺心停止後の虚血再灌流障害は今日においても避けることのできない大きな予後規定因子である。また、心臓移植における摘出心の虚血再灌流障害によって、移植心の心不全が問題となることがある。欧米諸国に比ベドナーの少ない本邦においては、貴重な移植心を虚血再灌流によって不全心に至らしめることは、是が非でも避けたいところである。近年、本学において「細胞内 ATP 増加」「虚血に対する細胞保護作用」を有するインドール化合物が見出され、腎、脳における虚血再灌流障害に対する抑制効果が実験的に示された。

## 2. 研究の目的

本化合物の心筋虚血再灌流障害に対する有効性を検討し、心停止そのもののリスクの高い症例の心臓手術を可能とすることを将来の目的とする。また、心移植では虚血再灌流障害による移植心の術後心不全が問題となることがあり、再移植を免れないケースもある。我々は、本化合物の心移植における虚血再灌流障害に対する有効性を検討し、その臨床応用に向けた可能性についても探求することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 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

ラット (LEW 種、雄、250-300g) をインドール化合物投与群と非投与群に分け、心臓摘出の 24 時間前と 2 時間前に投与群にはインドール化合物 5 mg/kg、非投与群には溶剤のみを、いずれも経口投与させる。吸入麻酔 (セボフルラン) で全身麻酔後、心臓を摘出し、摘出した心臓はすぐに 4 の生理食塩水に浸し、数回その中で拍動することで、心臓内の血液を排除させる。心停止後、氷冷したシャーレ上で心尖部を 6 等分し、ホタルルシフェラーゼ発光法により心筋内の ATP 含有量を評価する。

### (2) ブタの虚血再灌流モデルの確立

ブタの心虚血再灌流モデルとして、体重 30kg 前後のブタに気管内挿管を行い、吸入麻酔薬 (セボフルラン)、静脈麻酔により全身麻酔を維持する。モニタリングは、心電図、観血的体血圧の他、スワンガンツカテーテルを内頸静脈から肺動脈へ挿入し、肺動脈圧、中心静脈圧を経時的に行う。体血圧は内頸動脈を露出してカテーテルを直接留置し、経時的な血圧変化をモニターし、また血液検体の採取経路としても用いる。全身麻酔下に正中切開を行い、大動脈を同定、人工心肺装着後、これを遮断して、心筋保護液 (St. Thomas 液、10ml/kg) を注入し心停止を得る。40 分後に遮断を解除し、虚血再灌流状態を確立する。今回の実験ではダメージを与えながらも再灌流後の心筋組織内での反応系を究明する狙いから、この際、どのような推移でどの程度心筋がダメージを受け、心機能が低下するかを評価し、時間を設定する必要がある。

### (3) コントロール群、インドール化合物投与群での虚血再灌流後の心機能、心筋障害の評価

コントロール群 (n=5~7)、インドール化合物投与群 (n=5~7) の 2 群に分けて虚血再灌流後の心機能 (左室駆出率・心拍出量・左室拡張終期圧) の測定を行い、障害の程度を評価する。また、採血検査を行い心筋逸脱酵素である CK (クレアチンキナーゼ)-MB、トロポニン T、EPO、乳酸を測定する。

### (4) 虚血再灌流後の心筋組織の病理組織学的検査での心筋障害の評価

心エコー検査により心機能評価を 1 時間ごとにポイント測定し、4 時間後にデータをとってこれらが終了したところで動物を犠牲死させ、虚血再灌流後の心筋組織を病理組織評価と組織計測に提供し、心筋障害を評価する。また、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し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 レベルについて行う予定である。2 群での慢性期 (一か月後) の心筋障害の評価各群 2 頭は慢性期の状態を把握するため一か月後まで生存させた後、心エコー検査による心機能評価を行い、犠牲死させて病理組織学的検査で虚血再灌流障害の程度を評価する。

### (5) 低濃度インドール化合物を投与する群と高濃度インドール化合物を投与する群での追加評価、薬剤量の最適化の検討

低濃度インドール化合物を投与する群 (n=5~7) と高濃度インドール化合物を投与する群 (n=5~7) を作成し、(2)(3) の内容についての評価を行い、薬剤量の最適化を検討する。

### (6) 追加した 2 群での慢性期 (一か月後) の心筋障害の評価

追加した各群 2 頭は慢性期の状態を把握するため一か月後まで生存させた後、心エコー検査による心機能評価を行う。その後、犠牲死させて病理組織学的検査で虚血再灌流障害の程度を評価し、薬剤量の最適化を検討する。心機能をはじめ、各種パラメータの計測、集計、統計処理を行う。また、病理組織検査にて心筋細胞の変化、インドール化合物が心停止を伴う心臓外科手術時における心筋保護効果の可能性を確かめる。

#### 4. 研究成果

ラット (LEW 種、雄、250-300 g) 250-300 g を用いて、本化合物の心筋への効果を評価するために、心臓摘出からの心筋 ATP 含有量の変化について検討した。インドール投与群と非投与群に群分けを行い、投与群にはインドール化合物を 5 mg/kg で経口内服させた。非投与群には溶剤のみを内服させた。心臓摘出の 24 時間前と 2 時間前に投与した。摘出に際しては、セボフルランの吸入麻酔で全身麻酔を行い、仰臥位に固定し、心臓を摘出した。摘出した心臓はすぐに 4 の生理食塩水内に浸し、自然拍動によって心臓内の血液を排出させた。心停止を確認した後、氷冷したシャーレ上で心臓を 6 等分し、ホタルルシフェラーゼ発光法により ATP 含有量を評価した。心筋内の ATP が 2 時間後にはすでにコントロール群 (非内服群) と同等まで低下していた。心移植に応用するにはゴールデンタイムとされる 4 時間は有意な ATP を示すように工夫が必要であった。まず、投与量であるが、現在はこれまでの先行実験で脳、腎での評価に用いられていたものと同量を投与していた。増量させることで容量依存性に心筋内 ATP の増量を計った。しかし、本化合物は非水溶性であり、ラットへの経口投与を考えるとこれ以上の投与には限界があると考えられた。有意差を示したのは摘出直後のみであり、インドール投与によっても心筋の ATP 量に思ような変化を認めなかったため、現在は動物実験を一時中止している。モデルの変更や投与経路、投与方法について検討を重ねているところである。

#### 5. 主な発表論文等

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。