

令和元年6月18日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20360

研究課題名(和文) 虚血性皮弁壊死に対する新薬開発-強力な抗酸化作用を介して壊死進行を抑制する-

研究課題名(英文) Topical Application of Nitrosonifedipine, a Novel Radical Scavenger, Ameliorates Ischemic Skin Flap Necrosis in a Mouse Model

研究代表者

福永 豊 (Fukunaga, Yutaka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：50748069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はニトロソニフェジピンの抗酸化作用が皮弁壊死に対する治療に応用できると考え、虚血性皮弁壊死モデルを用いて壊死抑制効果の検討を行った。9-10週齢のC57BL/6マウスの背部に1×3cmの乱軸型皮弁を作成しニトロソニフェジピン 30 mg/kgもしくは同量の溶媒を皮弁内に局所投与した。生着域、酸化ストレス、アポトーシス、血管内皮障害、血管新生について評価した。ニトロソニフェジピンは酸化ストレス抑制、アポトーシス抑制、血管内皮障害抑制を介して虚血性皮弁壊死を抑制することが示された。ニトロソニフェジピン局所投与は臨床的にも新しい虚血性皮弁壊死予防法の候補と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点では皮弁壊死予防のために血流を改善する目的でプロスタグランジン製剤や抗凝固剤などが使用されているが、これらとは違った作用機序の薬剤を開発することで多面的に皮弁壊死に対してアプローチすることができ、合併症発生頻度減少、重症度軽減につながることを期待される。今回の研究により皮弁壊死を予防する新たな薬剤としてニトロソニフェジピンが有効である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Nitrosonifedipine (NO-NIF) has been demonstrated to possess potent radical scavenging ability. We evaluated the potential of NO-NIF in ameliorating ischemic skin flap necrosis in a mouse model. A random pattern skin flap was elevated on the dorsum of C57BL/6 mice. NO-NIF was administered by topical injection immediately after surgery and every 24 hours thereafter. Flap survival was evaluated on postoperative day 7. Tissue samples from the skin flaps were harvested on postoperative days 1 and 3 to analyse oxidative stress, apoptosis and endothelial dysfunction. We demonstrated that NO-NIF ameliorated ischemic skin flap necrosis by reducing oxidative stress, apoptosis and endothelial dysfunction. NO-NIF is considered to be a candidate for the treatment of ischemic flap necrosis.

研究分野：形成外科

キーワード：皮弁壊死 ニトロソニフェジピン 酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の切除術後や外傷による欠損に対して皮弁術は一般的な術式である。皮弁術の合併症として虚血性皮弁壊死は特に下腿の再建や糖尿病患者などで起こりやすく、深部臓器の露出や感染を引き起こす可能性があるためその予防や治療の確立は重要な課題である。

虚血性皮弁壊死には活性酸素(ROS)が関与していることが報告されており、スーパーオキシドディスムターゼやデフェロキサミンなどが抗酸化作用を介して皮弁壊死を抑制するという動物実験結果が報告されている。血流を改善する目的でプロスタグランジン製剤や抗凝固剤などが使用されているが、これらとは違った作用機序の薬剤を開発することで多面的に皮弁壊死に対してアプローチすることができ、合併症発生頻度減少、重症度軽減につながることを期待される。

ニトロソニフェジピンは徳島大学薬理学分野の研究協力者が開発し臨床応用に向けて研究を進めており、本研究でNO-NIFの虚血性皮弁壊死改善効果が確認されれば、新規治療薬として臨床応用される可能性がある。本研究では全身投与ではなく局所投与を行うことで全身的副作用や投与量過多といった臨床応用への課題が軽減されることも期待される。

### 2. 研究の目的

降圧薬であるニフェジピンの代謝産物、ニトロソニフェジピンは強力な抗酸化作用を示すことが報告されており、これが皮弁壊死に対する治療に応用できると考えた。本研究では動物モデルを用いて虚血性皮弁に対するニトロソニフェジピンの壊死抑制効果を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

9-10週齢のC57BL/6マウスの背部に1×3cmの乱軸型皮弁を作成し術直後から1日毎にニトロソニフェジピン30mg/kgもしくは同量の溶媒を皮弁内に局所投与し、それぞれ投薬群、対照群とした。術後7日目に皮弁生着域の評価を行った。術後1,3日目の組織を採取し、TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)法によるMalondialdehyde計測、TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)染色、western blotによるp38MAPK(Mitogen-activated Protein Kinase)のリン酸化タンパク、eNOS(endothelial nitric oxide synthase)タンパク、VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)タンパク、VEGF(vascular endothelial growth factor)タンパク発現の計測を行った。術後7日目のレクチン灌流染色を行い血管数を計測した。レーザースペックル血流計を用いて、術前、術直後、術後1,2,3,5,7日目に皮弁近位部、遠位部の血流を測定した。

### 4. 研究成果

投薬群では対照群に比べて有意に皮弁生着域が拡大した( $51.81 \pm 6.85\%$  vs.  $78.29 \pm 7.04\%$ ,  $p=0.021$ ) (図1)。

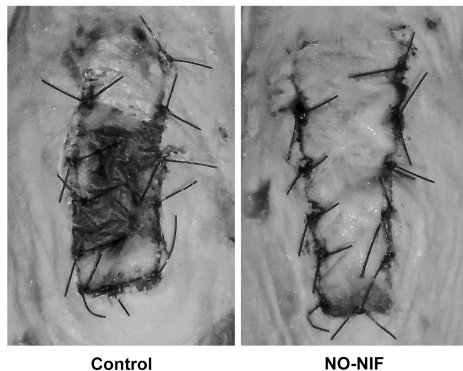


図1. 皮弁生着域

Malondialdehydeは術後1日目では両群間に差を認めなかったが、術後3日目では投薬群で有意に減少しており、皮弁内における酸化ストレスがニトロソニフェジピン投与によって抑制されていることが示された( $2.31 \pm 0.28\mu\text{mol/g protein}$  vs.  $4.21 \pm 0.32\mu\text{mol/g protein}$ ,  $p=0.001$ ) (図2)。

A

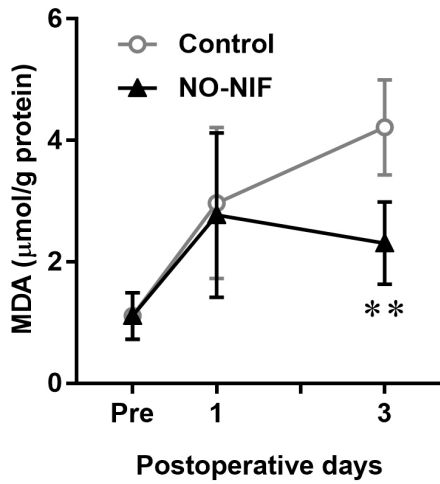


図2. Malondialdehyde(MDA)発現

投薬群では対照群に比べて有意に TUNEL 陽性細胞数が減少していた ( $15.46 \pm 1.91$  cells/field vs.  $4.005 \pm 1.191$  cells /field,  $P=0.0009$ )。投薬群では対照群に比べて p38 MAPK リン酸化タンパク発現が有意に減少しており ( $p=0.0015$ )、ニトロソニフェジピンによって酸化ストレスによるアポトーシスが抑制されていることが示唆された。投薬群では対照群に比べて有意に eNOS タンパクが増加し ( $p=0.023$ )、VCAM-1 タンパクが減少していることが認められた ( $p=0.038$ )。これらからニトロソニフェジピン投与によって血管内皮障害が軽減されていると考えられた。しかし、血管数は両群間に差は認められず、血管新生の重要な因子である VEGF タンパクの発現にも両群間に差は認められなかった。これらからニトロソニフェジピンは血管新生には影響しないことが示唆された。

以上の結果から、ニトロソニフェジピンは酸化ストレス抑制、アポトーシス抑制、血管内皮障害抑制を介して虚血性皮弁壊死を抑制することが示された。

レーザースペックル血流計による血流評価を行ったが両群に差を認めず、壊死している部位と壊死していない部位で比べても差がないことから、皮弁下の血流を反映している可能性があり正確な評価ができていないと考えられた(図3)。

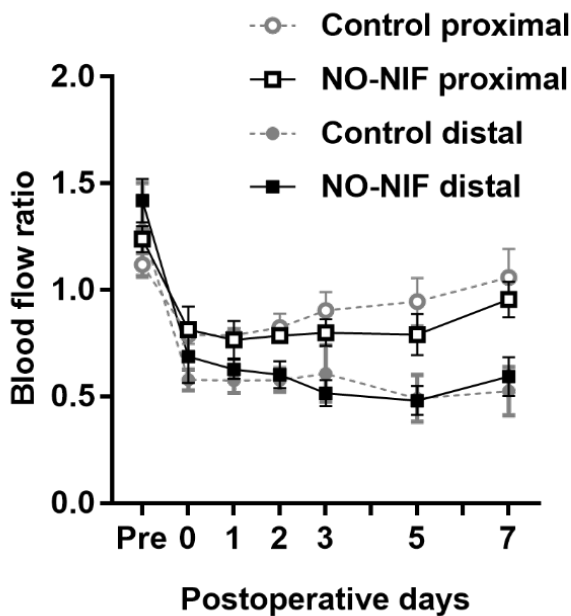


図3. レーザースペックル血流計による血流測定

〔雑誌論文〕(計1件)

Yutaka Fukunaga, Yuki Izawa-Ishizawa, Yuya Horinouchi, Eriko Sairyō, Yasumasa Ikeda, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Yoshiro Abe, Ichiro Hashimoto, Toshiaki Tamaki, Topical Application of Nitrosonifedipine, a Novel Radical Scavenger, Ameliorates Ischemic Skin Flap Necrosis in a Mouse Model, Wound Repair and Regeneration, 査読有, vol.25, No.2, 2017, pp. 217-223.

〔学会発表〕(計2件)

福永 豊, 虚血性皮弁壊死モデルにおける抗酸化薬ニトロソニフェジピンの壊死抑制効果, 日本形成外科学会基礎学術集会, 2017.

Yutaka Fukunaga, Topical Application of Nitrosonifedipine, a Novel Free Radical Scavenger, Ameliorate the Ischemic Skin Flap Necrosis, Plastic surgery the meeting, 2016.

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。