

平成22年 5月17日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790521
 研究課題名（和文） マウス心筋虚血再灌流障害および心筋梗塞モデルにおけるケミカルシャペロンの影響
 研究課題名（英文） The effect of chemical chaperone on myocardial ischemia-reperfusion injury and infarction in mice
 研究代表者
 岡島 正樹（OKAJIMA MASAKI ）
 金沢大学・附属病院・助教
 研究者番号：00361999

研究成果の概要（和文）：心筋虚血再灌流障害において、ケミカルシャペロンである 4-フェニル酪酸（4-PBA）が小胞体ストレスを軽減し、梗塞巣の縮小と心機能保持に寄与する可能性を検討した。同様に心筋梗塞モデルにおいても 4-PBA が心機能保持に寄与するか否かを検討した。その結果、虚血再灌流モデルにおいて、4-PBA は小胞体ストレスを軽減することで梗塞巣を縮小し、心機能を保持し生存率を改善した。一方心筋梗塞モデルでは 4-PBA は線維化を抑制したが心破裂をきたす傾向を認めた。

研究成果の概要（英文）：We assessed the hypothesis that 4-PBA (chemical chaperone) reduces endoplasmic reticulum stress (ER stress) mediated apoptosis and protects against myocardial ischemia-reperfusion injury or myocardial infarction in mice. In result, 4-PBA reduced ER stress mediated apoptosis, decreased infarct size, maintained cardiac function and improved survival ratio in mice with ischemia-reperfusion. On the other hand, 4-PBA inhibited fibrosis and induced cardiac rupture in mice with myocardial infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：心筋虚血

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ER ストレス、虚血再灌流、心筋梗塞、シャペロン

1. 研究開始当初の背景

近年、日本においてもライフスタイルの欧米化に伴い生活習慣病患者が増加、心血管疾患による死亡率が悪性腫瘍疾患や脳血管疾患とならぶ3大死因の一つとなって久しい。

そのような状況で、急性冠症候群の治療において、冠動脈形成術に代表される早期再灌流治療の登場により患者の予後やQOLは大きく改善した。しかし、臨床において早期再灌流に成功したにも関わらず、広範囲な心筋障害

を残す例をしばしば経験することも事実である。そのような現象はアポトーシスに代表される「虚血再灌流障害」と呼ばれ、未だ解決されぬ大きな問題である。しかしながら、そのような虚血再灌流障害を抑制できれば、心筋のダメージが軽減され、心機能が維持されるため、早期再灌流療法に追加されるべき重要な治療戦略となる。

さまざまな臓器における虚血再灌流後アポトーシスのメカニズムとしては、従来の death receptor やミトコンドリアを介する古典的経路の他に、近年小胞体ストレス機構を介した経路が注目されている。心臓においても、*in vitro* の報告では、心筋細胞における虚血再灌流後のアポトーシスに小胞体ストレス応答が大きく関与していることが示された (Szegezdi E et al. Biochem Biophys Res Commun. 1406-11, 2006.)。すなわち、虚血再灌流後の小胞体ストレスを軽減できれば、アポトーシスを抑制することとなり、心筋障害を最小限にとどめることが可能と考えられる。

小胞体ストレスを軽減する薬剤はケミカルシャペロンと言われる。その中でも 4-フェニル酪酸 (4-PBA) は、欧米において、従来サラセミアや尿素サイクル異常症の治療に使用されてきた薬剤だが、近年有用なケミカルシャペロンとして注目されている。実際、*in vivo* では肝臓および中枢神経系の虚血再灌流モデルにおいて、4-PBA が小胞体ストレスを介したアポトーシスを抑制する、との報告がある (Qi X et al. Mol Pharmacol. 899-908, 2004. および Vilatoba M et al. Surgery 342-351, 2005.)。しかし、心筋における効果は未だ報告されていない。

我々は、これまでにマウス心筋虚血再灌流モデルにおいて、マイクロアレイ解析による心筋遺伝子発現プロファイルを検討してきた。結果、心筋において小胞体ストレス関連遺伝子発現が up-regulation していることが確認された。すなわち、*in vivo* においても、心筋虚血再灌流が小胞体ストレス応答を惹起することが確認された。そこで、もしケミカルシャペロンとして知られる 4-PBA が虚血再灌流後に生じる小胞体ストレス応答を軽減し、アポトーシスを抑制することが可能であれば、心機能保持に寄与し、冠動脈形成術に加えるべき治療の一つとなると確信する。

我々はこれまで、例数は少ないが準備実験として、マウス心筋虚血再灌流障害モデルにおいて、4-PBA 前投与が再灌流後の血清 CPK 上昇を抑制し、梗塞巣を縮小することを血清学的および組織学的 (TTC 染色) 検討にて確認してきた。つまり、4-PBA が心筋虚血再灌流障害を抑制する可能性を見出した。今後、例数を増やし、結果を強固なものにするともに、そのメカニズムに迫る。

また、臨床において急性冠症候群患者全例が速やかに再灌流を得ることができるわけではなく、一部梗塞に陥ることはしばしば経験する。そこで再灌流モデルのみならず、心筋梗塞モデルにおいても 4-PBA が生存率を改善するかを検討したい。臨床応用を踏まえ、これらを明らかにすることは重要と考え、本プロジェクトの着想に至った。

2. 研究の目的

上記背景から、我々は、(1) 4-PBA が小胞体ストレスを軽減し、アポトーシスを抑制し、心機能低下を抑制し、総じてマウス心筋虚血再灌流障害を軽減するか否かを *in vivo* で明らかにする。

さらに臨床において、全例速やかに再灌流を得ることができるわけではなく、臨床応用を見据えて、(2) 4-PBA が再灌流モデルのみでなく、心筋梗塞モデルにおいても有用か否かを検討する。

3. 研究の方法

心筋虚血再灌流・梗塞モデルの作成

対象はマウス C57BL/6 (8~10 週)。麻酔後 (ペントバルビタール 100mg/kg 腹腔内投与)、人工呼吸器管理下開胸し、顕微鏡下に冠動脈左前下行枝 (LAD) を 30 分間虚血後、再灌流させ閉胸する。心筋梗塞モデルは再灌流させずに閉胸する。

投与薬剤

4-PBA (図 1) および同量の Phosphate-buffered saline (PBS) は、虚血直前に腹腔内投与する。4-PBA は欧米では臨床使用されているが、副作用はほとんどない薬剤である。我々はまず、これまでの肝および中枢神経における 4-PBA の効果を検討した

報告から、100mg/kg の腹腔内投与量を選択、投与した。

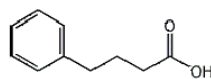


図 1. 4-PBA の構造式

心筋障害の程度の評価

心筋障害の評価は、血清学および組織学的に行う。血清 CPK 値は一般的に梗塞範囲に比例し血清学的マーカーとして臨床の場で広く使用される。マウスにおいても同様で、虚血後 6 時間でピークとなることが報告されている。よって、我々は虚血後 6 時間に採血し 4-PBA 投与群と PBS 投与群で差があるか否かをさらに検討した。また、虚血後 48 時

間でLADを結さつし、Evans blueにて非虚血部位を染色した後、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色し、組織学的に梗塞範囲を同定、そのエリアを4-PBA投与群とPBS投与群で比較した。

アポトーシスの評価

虚血後48時間で心臓を取り出し、OCTコンパウンドを用いて凍結保存し、TUNEL染色にてapoptotic cellの割合を4-PBA投与群とPBS投与群を比較した。

小胞体ストレスの評価

虚血後48時間後の心筋において、小胞体ストレス機構を介するアポトーシスの際、特異に発現あるいは生成されるプロカスペアーゼ12タンパク量を、ウェスタンブロット法を用いてPBA群とPBS群とで比較した。また、小胞体ストレス負荷がかかった際に上昇する内因性シャペロンであるGrp78タンパク量も同様に比較した。

心機能評価

ペントバルビタール腹腔内投与による全身麻酔をしたうえで、人工呼吸器管理下、虚血再還流後21日目の心機能につき、心エコーを用いて、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室短縮率などを比較した。心エコー施行者は、マウスのエコーに精通した者とし、blind label法で行った。

心不全評価

心筋梗塞後7日、心臓および肺を取り出し、それぞれ重量測定し、心重量/肺重量比を比較する。

生存率の検討

術後閉胸し飼育、3週間観察し、生存率を4-PBA投与群とPBS投与群で比較した。

心筋梗塞モデルにおける検討

上記の生存率、心筋障害、小胞体ストレス、アポトーシスのパラメータについて、再灌流モデルのみならず、心筋梗塞モデルにおいても4-PBA群、PBS群で比較する。

心筋梗塞モデルにおける遺伝子解析

我々は、心筋虚血再灌流モデルにおける心筋の小胞体ストレス関連遺伝子発現プロファイルの検討から、心筋虚血再灌流において小胞体ストレスが関与していることは確認しているが、心筋梗塞モデルにおいては未確認である。また小胞体ストレスを抑制することが心筋梗塞に対し利点となるのかも不明である。我々の実験準備段階において、例数は少ないが、心筋梗塞モデルにおける4-PBA

の効果を検討したところ、心破裂例が散見された。そこには心筋梗塞後の線維化に問題がある可能性があり、線維化について組織学的に検討した。また線維化のマーカーなる遺伝子について、RT-PCRを用い、mRNA発現レベルを両群で比較した。

4. 研究成果

(1) 虚血再還流モデル

まず虚血再灌流モデルにおいて、マイクロアレイによる検討では、小胞体ストレス応答関連遺伝子の発現を認め、小胞体ストレス応答の関与が確認された(下表)。

Gene (pathway-associated)	24 hr after ischemia		28 hr after ischemia	
	PBA (n=5)	PBS (n=5)	PBA (n=5)	PBS (n=5)
PKA1 associated genes				
CEBPB	1.22	0.85	0.81	1.25
CEBPB	1.22	1.57	2.21	1.25
PKA related protein associated 8	1.22	1.22	0.79	1.25
Dar1-like domain family, member 1	1.21	1.47	1.47	1.25
ubiquitin-protein degradation 1 like	1.22	1.13	1.47	1.25
nuclear protein localization 4 homolog	1.22	1.71	1.42	1.25
IKK domain containing 2	1.22	1.22	1.45	1.25
SH3BP1 homolog	1.22	0.83	1.22	1.25
MAPK pathway associated genes				
ARF4	1.22	1.25	0.84	1.25
ARF6	2.65	1.12	1.14	1.21
MAP1	1.47	1.12	1.22	1.25
MAP1-like	1.22	1.27	1.41	1.25
SRP90 associated genes				
SRP90 antigen	1.22	1.21	2.25	1.45
Class I (GTPase) homolog 7	2.87	1.22	1.22	1.45
heat shock protein 100	1.22	2.27		
heat shock protein 8	2.22	1.22	0.82	0.82
ubiquitin-protein ligase 2, class II, human ERH1	1.22	1.22	1.45	1.45
ubiquitin-protein ligase 2, class II, human ERH2	1.22	1.22	0.82	1.27
ubiquitin-protein ligase 2, class II, human ERH3	1.22	1.27	0.81	1.25
ubiquitin-protein ligase 2, class II, human ERH4	1.22	1.22	1.22	1.25
ubiquitin-protein ligase 2, class II, human ERH5	1.22	1.21	0.82	1.25

虚血再灌流モデルにおいて、4-PBAは血清CPK-MB値の上昇を抑制し(図1A, $p < 0.05$) TTC染色により評価した梗塞巣のサイズを縮小した(図1B, C, $p < 0.01$)。

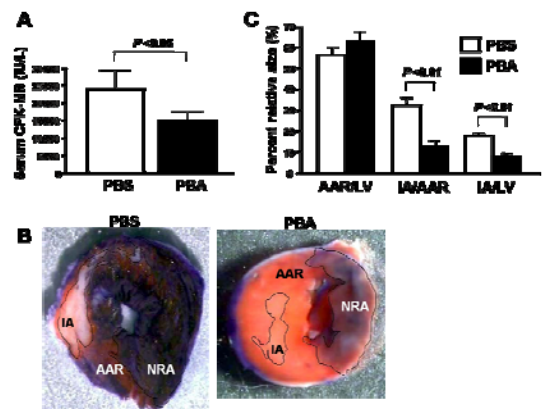


図1. 血清CPK-MB値および梗塞エリア また、TUNEL染色により評価したアポトーシス細胞は、4-PBA投与群において26%の減少を認めた ($p < 0.05$, 図2A, B)。

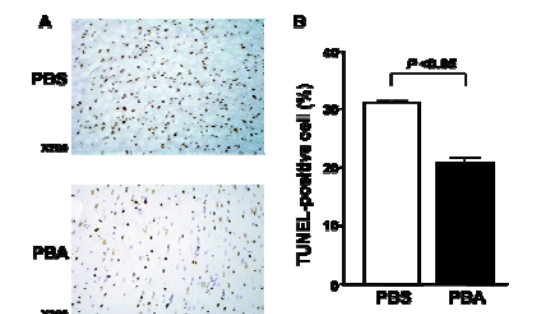


図2. アポトーシス細胞の割合

以上のことは、4-PBA が虚血再灌流により惹起された小胞体ストレス応答を抑制したことにより、続いて生じるアポトーシスを抑制し、梗塞巣を縮小させたと考えられる。

さらに慢性期（術後 21 日目）に施行した心エコーでは、4-PBA 群では、左室拡張末期径（LVEDD）および左室収縮末期径（LVESD）の拡大が改善され、左室短絡率（%FS）の低下が改善した（図 3 A, B, C、 $p < 0.05$ ）。また 21 日生存率は PBS 群では 66%であったのに対し、4-PBA 群では 0%であった（図 3 D）。

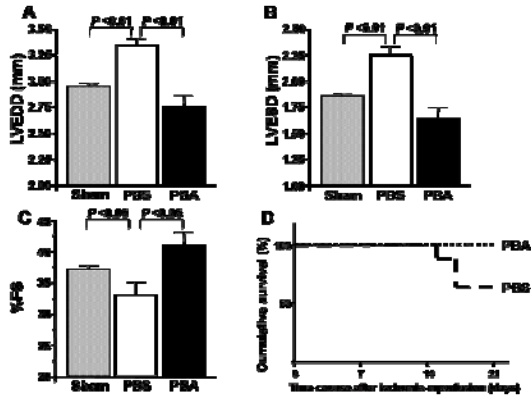


図 3. 慢性期心機能および生存率

このことは、虚血再灌流の急性期に 4-PBA を投与することで、急性効果として梗塞巣を縮小させることが、慢性期の心機能保持に寄与し、ひいては生存率の改善につながった可能性が考えられる。つまり、4-PBA が虚血再灌流療法に加わる新たな治療戦略となりうる可能性が期待される結果である。

実際にこれらの効果のメカニズムが、小胞体ストレス応答を 4-PBA が軽減したことによるものであるかを検討するため、小胞体ストレス応答に関与するタンパク発現を心筋組織でしらべたところ、プロカスパーゼ 12（図 4 右、 $p < 0.05$ ）および Grp 78 タンパク（図 4 左、 $p < 0.05$ ）は、4-PBA により抑制されていた。

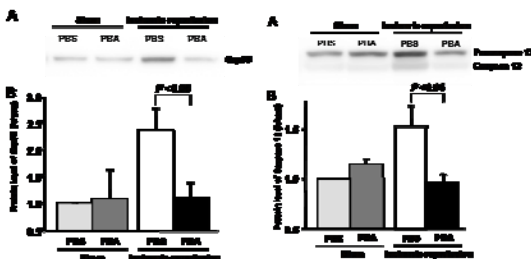


図 4. Grp 78 およびプロカスパーゼ 12 タンパクレベル

以上のことから、4-PBA は虚血再灌流急性期に小胞体ストレスを軽減し、アポトーシスを抑制することで、梗塞範囲を縮小することが示された。

また、急性期に梗塞巣を縮小することが、慢性期の心機能を維持し、生存率の改善に寄与する可能性が示唆された。

一方、実際の臨床の現場では、再灌流が不完全に終わる、あるいはできないケースもしばしば経験する。よって、臨床的実用性も見据えて、再灌流されない心筋梗塞モデルについて以下の検討を行った。

すなわち、同様に心筋梗塞モデルにおいても、4-PBA が梗塞巣を縮小するか否か、および心機能保持に寄与するか否かを検討した。さらにそのメカニズムについて組織および mRNA レベルで検討した。

結果、4-PBA を投与した群では、心筋梗塞後 6 日以内の心破裂率が增大する傾向を認めた。これは再灌流モデルと大きく異なり心筋梗塞モデルでは 4-PBA が病態を悪化させる可能性を有することを示唆する。

そこでそのメカニズムを検討した。急性期の繊維染色の結果では、4-PBA 群において、梗塞巣の線維化が減少する傾向があるものの、7 日以降の亜急性期では心肺重量が増大する傾向を認め、うっ血性心不全像を呈する傾向にあった。

心筋組織における Real time RT-PCR では、急性期の MMP-9・CHOP・TNF- α ・GRP78 が減少する傾向を認めた。TUNEL 染色でもアポトーシス細胞の減少傾向を認め、ケミカルシャペロンである 4-PBA が心筋梗塞後急性期において抗アポトーシス・抗炎症作用に影響を及ぼしている可能性が示唆された。しかし、4-PBA の心筋梗塞後急性期の抗アポトーシス・抗炎症作用が予想に反して心破裂や心不全を惹起してしまい、そのメカニズムについて今後明らかにしたい。

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 1 件）

1. Ootsuji, H., Honda, M., Kaneko, S., Usui S., Okajima, M., Okada, H., Sakai, Y., Takamura, T., Horimoto, K., Takamura, M., *Circ Cardiovasc Genet.* Feb 1;3(1) (2010), 68-77, 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Okajima, M., Takamura, M., Usui, S., Taniguchi, T., Kanako, S. Sodium 4-phenylbutylate protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing unfolded protein response-mediated apoptosis in mice. 30th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, 2010. 3. 9, Square-Brussels Meeting Center (Belgium)
2. 岡島正樹, 近田明男, 八重樫貴紀, 池田達則, 高島伸一郎, 加藤武史, 薄井荘一

郎，古莊浩司，金子周一． Sodium 4-phenylbutylate protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing unfolded protein response-mediated apoptosis in mice. 第74回日本循環器学会総会，2010年3月5日，国立京都国際会館（京都府）

3. Okajima, M., Takamura, M., Kaneko S. Sodium 4-phenylbutylate reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. Hypertension 2008 (ESH/ISH), 2008.6.18, Internationales Congress Centrum Berlin (Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡島 正樹 (OKAJIMA MASAKI)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：00361999