

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 11日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22300162

研究課題名（和文） 心筋内ラジカル分子計測による糖尿病性心内膜側冠微小循環障害発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of Manifestation for Disturbance of Endocardial Coronary Microcirculation in Diabetes Mellitus by Measurements of Myocardial Radical Molecules

研究代表者

矢田 豊隆 (YADA TOYOTAKA)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00210279

研究成果の概要（和文）：心筋虚血後、糖尿病(DM)群はcontrol 群に比べ、ブラジキニンに対する内皮由来拡張反応が小細動脈ともに減弱した。DM+ARB（アンジオテンシン受容体拮抗薬 olmesartan）+L-NMMA (DAL) 群は、主に内皮由来過分極因子（EDHF）に作用する細動脈で拡張反応が改善した。その反応は、Apamin+Charybdotoxin (DALAC, 共に過分極拮抗薬)混合投与で、細動脈の拡張反応が減弱した。DAL群において、酸化ストレス(血中8-OHdG)、心筋障害(Troponin-I)とアポトーシス(caspase-3)は、DM およびDALAC 群と比較して有意な改善を認めた。

研究成果の概要（英文）： DM significantly decreased the coronary vasodilatation compared with Control in both coronary small arteries and arterioles, whereas DM+ARB (angiotensin receptor inhibitor, olmesartan) +L-NMMA (DAL) DAL significantly improved the vasodilatation compared with DM in coronary small arteries and was significantly decreased by DAL+Apamin+Charybdotoxin (DALAC, both  $K_{Ca}$  channel blocker) in coronary arterioles. DAL ameliorated myocardial injury and oxidative stress compared with DM, as assessed by 8-OHdG, myocardial troponin-I and apoptosis, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：(1) 糖尿病、(2) 冠微小循環、(3) 過酸化水素、(4) 内皮由来過分極因子、(5) 冠血管予備能

## 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国における三大死因の中に、心・脳血管疾患が含まれるが、その原因として糖尿病が重要である。糖尿病発症後、特に心臓では、高血糖による酸化ストレス増大に伴う一酸化窒素(NO)の低下、冠血管予備能低下、血管内皮障害を伴う冠微小循環障害、動脈硬

化へと進展し、最終的に心筋梗塞と成り得る。一方、NO、血管内皮由来過分極因子(EDHF)、プロスタサイクリンの3因子からなる内皮由来弛緩因子(EDRF)の主な作用の場として、冠微小循環が重要である。EDHFとしての内因性過酸化水素( $H_2O_2$ )の世界的第一人者である東北大学循環器内科下川宏明教授との共同研究

により、心筋虚血時のEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の重要性や、Cu/Zn, SOD がEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生に重要な役割を示す事を明らかにしてきた。しかし、eNOSから産生されるスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、Cu/Zn, SOD 由来H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生の一連の定量化は、未だ不明である。また、糖尿病(DM)+急性心筋梗塞モデルに対して、ARB 予防投与により、冠微小側副血行路に対してEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が血管拡張に関与するか否か、また、心筋梗塞後のアポトーシスに対するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を介したARBによる改善効果については、これまで明らかでない。本研究では、心筋内ラジカル分子であるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub><sup>-</sup>を定量化し、eNOS→O<sub>2</sub><sup>-</sup>、Cu/Zn, SOD 由来のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生経路を明らかにする。また、DM+急性心筋梗塞病態におけるARB 投与時の虚血心内膜側冠微小循環および側副血行路の直接観察を行い、EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるこの病態との関連及びARB 治療後の血管内皮機能・形態両面の改善効果を明らかにする。

## 2. 研究の目的

DMは、血管内皮障害、ひいては動脈硬化へと進展し、最終的に、急性心筋梗塞を惹起する。心筋梗塞時側副血行路の存在は、心筋虚血と梗塞範囲の改善を促す。一方、内皮由来血管拡張因子(EDRF)の主な作用の場である冠微小循環における血流動態を評価することは、心筋虚血微小循環レベルでの発生メカニズムを理解する上で重要である。また、降圧薬であるアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)は、心血管のみならず、腎保護作用を持つことから、DM治療薬としても知られている。DMに合併する急性心筋梗塞時、冠微小循環梗塞領域と側副血行路に対するARBによる血管内皮を介した治療効果および梗塞に伴うアポトーシスの改善効果を評価することは、極めて重要である。今回、これまで明らかでなかった血流調節因子(心筋内ラジカル分子)の産生経路およびDMに合併する急性心筋梗塞モデルにおける、特に易虚血性心内膜側冠微小循環梗塞領域と側副血行路の血流病態および梗塞発症前のARB 予防投与による治療評価を行う。

## 3. 研究の方法

(1) CCD 生体顕微鏡によるイヌDM(Alloxan 40mg/kg 静脈注射)モデルの1週後に、血管内皮機能評価のため、ペーシングによる冠微小血管予備能(血管拡張効果)の比較を正常モデルと比較評価を行う。

(2) マルチモード蛍光計測器を用いたELISA法によるEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生経路の評価のため、心筋内NO濃度とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度、酸化ストレスの指標として冠静脈洞内8-OHdGの評価を両群で行った。

(3) DMモデル(1週)における急性心筋梗塞時の冠微小血管予備能評価：急性心筋虚血モデル(左前下行枝閉塞)における回旋枝からのブラジキニン投与による薬剤性冠血管予備能計測時のNO, EDHFに対する血管拡張反応の評価を行い、同時に冠静脈洞血流調節因子EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と酸化ストレスO<sub>2</sub><sup>-</sup>の心筋内ラジカル分子定量評価を行う。さらに、DM+ARB(アンジオテンシン受容体拮抗薬 Olmesartan)+L-NMMA(NO合成阻害物質)投与(DAL)群、DM+ARB+L-NMMA+apamin+charybdotoxin(apamin, charybdotoxin とともに内皮由来過極因子(EDHF)拮抗薬、Ca<sup>++</sup>-activated K<sup>+</sup> channels blocker)(DALAC)群との比較を行った。

(4) イヌ正常及びDMモデルで対比する。同時に冠静脈洞血流調節因子EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と酸化ストレスの心筋内ラジカル分子定量評価を行う。

(5) ARB 投与による急性心筋梗塞後のアポトーシスの改善効果：ELISA法を用いて、ARB 投与前後の心筋梗塞に対するアポトーシスの改善効果を明らかにする。

(6) マイクロスフェアによる局所心筋血流量の評価：マイクロスフェア(Ce, Ba, I, In, Zr)を用いて、正常(左冠動脈回旋枝領域)、虚血部(左冠動脈前下行枝領域)及び側副血行路(心尖部)領域に分け、さらに、心内膜側及び心外膜側の単位心筋血流量(ml/min/g)を評価する。

## 4. 研究の成果

(1) CCD生体顕微鏡を用いて、正常及びDM(1週)モデルで心外膜側微小血管のペーシングによる冠微小血管予備能(血管拡張効果)の比較を行った所、正常群に比べ、DM群では、特に一酸化窒素(NO)の作用する100µm以上の小動脈では、明らかに血管拡張反応は明らかに減弱した。それに比べ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に作用する100µm未満の細動脈では、血管拡張反応は、減少したが、半減するまでには至らず、代償的に保たれた。正常群において、安静時ベースラインのデータに比べ、ペーシング後のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>およびNO濃度の増加を認めた。その反応は、DM(1週)群で、明らかに減弱した。

(2) 冠静脈洞内8-OHdGは、正常群に比べ、DM群では、明らかな酸化ストレスの増加を認めた。心筋虚血後の心筋内NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度は、正常群に比べ、DM群で低下を認めた。

(3) 急性心筋梗塞後(左冠動脈前下行枝90分閉塞)、内皮由来血管拡張物質ブラジキニンを左冠動脈回旋枝投与による心外膜側冠微小側副血管予備能の比較を行った。正常群に比べ、DM群では、特にNOの作用する100 µm以上の小動脈では、明らかに血管反応は収縮した

。それに比べ、EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に作用する100 μm未満の細動脈では、血管拡張反応は、残存したが、ARB（アンジオテンシン受容体拮抗薬 Olmesartan）+L-NMMA（NO合成阻害物質）投与により、ARBの作用をEDHF優位にするとその反応は、改善した。

DM+ARB+L-NMMA+apamin+charybdotoxin（apamin、charybdotoxinともにEDHF拮抗薬、Ca<sup>++</sup>-activated K<sup>+</sup> channels blocker）群では、冠側副血行路の残存拡張がDM+ARB+L-NMMA群に比べ減弱した。

（4）DM時には、正常群に比べ、酸化ストレスの増加を認め、冠静脈洞内NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度の低下も認められた。また、心筋虚血後の心筋内NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度は、正常群に比べ、DM群で、血管内皮障害に伴い低下を認めた。

（5）正常群に比べ、DM群において、アポトーシスが増加した。

（6）心筋梗塞後、マイクロスフェアによる心筋内血流は、DMにARB+L-NMMAを投与した群（EDHF優位群）では、DM群に比べ、改善傾向が認められた。EDHFとしてのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が、糖尿病性急性心筋梗塞時の冠微小側副血行路において、重要な血管拡張因子であり、ARBの内皮機能改善に一部関与することが窺われた。

## 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5件）

① Yada T (1番目), Shimokawa H (2番目), Ogasawara Y (5番目), Kajiya F (6番目, 他2名) et al. Role of Endogenous Hydrogen Peroxide during Angiotensin Type 1 Receptor Blockers Administration in Pacing-induced Metabolic Coronary Vasodilatation in Dogs in Vivo. 35th Annual International IEEE EMBS Conference. 査読有. 2013. 印刷中

② 矢田豊隆. 冠微小循環と内皮由来過分極因子としての過酸化水素. 心臓. 査読無. 45巻. 2013. 348-353

③ 大槻剛巳, 小笠原康夫 (2番目), 矢田豊隆 (6番目, 他13名). 川崎医科大学における大学連携, 産学官連携等, 対外活動について: その2. 川崎医学会誌. 査読有. 37巻. 2011. 47-59

④ Yada T (1番目), Shimokawa H (2番目), Ogasawara Y (8番目), Kajiya F (9番目, 他5名) et al. Erythropoietin Enhances Hydrogen Peroxide-mediated Dilatation of Canine Coronary Collateral Arterioles during Myocardial Ischemia in Dogs in Vivo. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory

Physiology. 査読有. 299巻. 2010. H1928-1935, DOI: 10.1152/ajpheart.00331.2010

⑤ Mochizuki S, Yada T, (4番目), Ogasawara Y, (8番目, 他7名) et al. Clear Correlation of Tetrahydrobiopterin with Nitric Oxide Bioavailability in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. Blood Purification. 査読有. 30巻. 2010. 96-97, DOI: 10.1159/000318587

〔学会発表〕（計27件）

① 矢田豊隆, 下川宏明, 冠微小循環と内皮由来過分極因子としての過酸化水素, 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月22日, 福岡国際会議場 (福岡)

② Yada T et al, Beneficial Effects of Angiotensin Type 1 Receptor Blocker on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Coronary Vasodilatation of Native Coronary Collateral Microcirculation in Dogs in Vivo, The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2013年3月16日, パシフィコ横浜 (横浜)

③ Yada T et al, Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Coronary Collateral Vasodilatation and Improves Microvascular Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus and Endothelial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production during Acute Coronary Occlusion in Canine Coronary Native Collateral Microcirculation in Vivo, 第38回日本微小循環学会総会, 2013年2月9日, 東京慈恵会医科大学1号館3階講堂 (東京)

④ Yada T et al, Angiotensin Type 1 Receptor Blocker Enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Coronary Collateral Vasodilatation and Improves Diabetes-induced Microvascular Endothelial Dysfunction and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production during Acute Coronary Occlusion in Canine Coronary Native Collateral Microcirculation in Vivo, American Heart Association Scientific Sessions 2012, 2012年11月7日, Los Angeles Convention Center (Los Angeles, U. S. A.)

⑤ 矢田豊隆他, 糖尿病性急性心筋梗塞時冠微小側副血管における内因性過酸化水素とアンジオテンシン受容体拮抗薬の役割, 第12回日本NO学会学術集会, 2012年6月29日, 神戸国際会議場 (神戸)

⑥ 矢田豊隆他, 糖尿病性急性冠動脈閉塞時冠微小側副血管における内因性過酸化水素とアンジオテンシン受容体拮抗薬の役割, 第51回日本生体医工学学会, 2012年5月12日, 福

岡国際会議場（福岡）

⑦ Yada T et al, Cardioprotective Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during Coronary Occlusion in Canine Native Collateral

Microcirculation in Vivo -Influence of ARB and Diabetes Mellitus-, 第76回日本循環器学会総会, 2012年3月18日, 福岡国際会議場（福岡）

⑧ Yada T et al, Cardioprotective Role of Hydrogen Peroxide and Angiotensin Type 1 Receptor Blockers during Acute Coronary Occlusion in Canine Native Coronary Collateral Microcirculation in Vivo, 第37回日本微小循環学会総会, 2012年3月17日, 盛岡グランドホテル（盛岡）

⑨ 城所研吾、矢田豊隆他, 糖尿病性腎症の発症・進展における内皮 GTP-cyclohydrolase-I の関与の検討, 第 41 回日本心脈管作動物質学会, 2012年2月11日, 秋田キャッスルホテル（秋田）

⑩ 城所研吾、矢田豊隆他, 内皮 GTP-cyclohydrolase-I (GTPCHI) の糖尿病性腎症の進展における関与の検討, 第9回腎と高血圧 Update, 2011年12月3日, 品川プリンスホテル（東京）

⑪ 矢田豊隆他, 心筋虚血時冠微小側幅血行路における内皮由来過分極因子、過酸化水素の役割, 第9回おかやま生体信号研究会, 2011年11月24日, 川崎医療福祉大学(倉敷)

⑫ Yada T et al, Important Role of Endogenous Hydrogen Peroxide during Angiotensin Type 1 Receptor Blockers Administration in Pacing-Induced Metabolic Coronary Vasodilatation in Dogs in Vivo, American Heart Association, Scientific Sessions 2011, 2011年11月14日, Orange County Convention Center (Orland, U.S.A.)

⑬ Kidokoro K, Yada T et al, Role of GTP Cyclohydrolase-1 as a Novel Therapeutic Target of Diabetic Nephropathy, ISN Forefronts Symposium 2011, 2011年9月22日, Arthus University (Aarhus, Denmark)

⑭ 城所研吾、矢田豊隆他, 糖尿病性腎症の発症・進展における内皮 GTP-cyclohydrolase-I の関与の検討, 第9回メタボリックシンドロームカンファレンス, 2011年7月16日, ホテルグランヴィア京都（京都）

⑮ 城所研吾、矢田豊隆他, 糖尿病性腎症の発症・進展における内皮 GTP-cyclohydrolase-I の関与の検討, 第54回日本腎臓学会, 2011年6月17日, パシフィコ横浜（横浜）

⑯ 矢田豊隆他, 冠微小循環の可視化 -急性心筋梗塞時の冠微小循環変化-, 第34回日本バイオレオロジー学会年会, 2011年6月4日, 関西大学（大阪）

⑰ 矢田豊隆他, 生体内イヌ冠微小側副血行路におけるアンギオテンシン受容体拮抗薬の内因性過酸化水素を介した血管拡張作用および糖尿病モデルの改善効果, 第11回日本NO学会学術集会, 2011年5月13日, 昭和薬科大学（東京）

⑱ 矢田豊隆他, アンギオテンシン受容体拮抗薬の内因性過酸化水素による冠微小側副血行路の糖尿病性血管内皮障害改善効果, 第50回日本生体医工学会, 2011年5月1日, 東京電気大学東京神田キャンパス（東京）

⑲ Yada T et al, Angiotensin Type 1 Receptor Blockers Enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Vasodilatation and Improves Diabetes Mellitus-induced Endothelial

Dysfunction in Canine Coronary Native Collateral Microcirculation in Vivo, 第36回日本微小循環学会総会, 2011年2月12日, 名古屋市立大学病院大ホール（名古屋）

⑳ 仲本博、矢田豊隆他, 生体でのアデノシンによる糸球体輸出入細動脈の調節, 第40回日本心脈管作動物質学会, 2011年2月4日, 香川国際会議場サンポートホール高松（高松）

㉑ 矢田豊隆他, 急性心筋虚血時微小循環側副血行路におけるエリスロポエチンと内因性過酸化水素の効果, 第40回日本心脈管作動物質学会, 2011年2月4日, 香川国際会議場サンポートホール高松（高松）

㉒ Yada T et al, Cardioprotective Role of Hydrogen Peroxide and Erythropoietin during Acute Coronary Occlusion in Canine Native Coronary Collateral Microcirculation in Vivo, American Heart Association, Scientific Sessions 2010, 2010年11月16日, McCormick Place Convention Center (Chicago, U.S.A.)

㉓ Yada T et al, Angiotensin Type 1 Receptor Blockers Enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Coronary Collateral Vasodilatation and Improves Diabetes Mellitus-induced Microvascular Endothelial Dysfunction in Canine Native Coronary Collateral Microcirculation in Vivo, American Heart Association, Scientific Sessions 2010, 2010年11月16日, McCormick Place Convention Center (Chicago, U.S.A.)

㉔ Yada T et al, Cardioprotective Effects of Hydrogen Peroxide after Erythropoietin Administration during Acute Coronary Occlusion in Canine Native Coronary Collateral Microcirculation in Vivo, 19th International Conference of the Cardiovascular System Dynamics Society, 2010年9月26日, 九州大学医学部（福岡）

㉕ Yada T et al, Effects of Hydrogen

Peroxide and Erythropoietin during Acute Coronary Occlusion on Canine Coronary Native Collateral Microcirculation, 第49回日本生体医工学学会大会, 2010年6月26日, 大阪国際交流センター (大阪)

⑳ Ohashi J, Yada T et al, Mechanism for the Device roles of Endothelial Nitric Oxide Syntheses System between Conduit and Resistance Arteries in Mice, The 6th International Confernce on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010年6月16日, 京都国際会館 (京都)

㉑ Yada T et al, Effects of Endogenous Hydrogen Peroxide and Erythropoietin during Acute Coronary Occlusion in Canine Coronary Native Collateral Microcirculation in Vivo, The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010年6月16日, 京都国際会館 (京都)

〔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

矢田豊隆 (YADA TOYOTAKA)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00210279

(2) 研究分担者

仲本博 (NAKAMOTO HIROSHI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：10299183

守田吉孝 (MORITA YOSHITAKA)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：50346441

小笠原康夫 (OGASAWARA YASUO)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10152365

(3) 研究連携者

下川宏明 (SHIMOKAWA HIROAKI)

東北大学・医学部・教授

研究者番号：00235681

梶谷文彦 (KAJIYA FUMIHIKO)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：70029114