

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659501

研究課題名(和文) 新化合物ジクロロアセチルカルニチンの虚血後再灌流臓器障害抑制効果の検討

研究課題名(英文) Post-ischemic reperfusion injury inhibiting effect of the new compound dichloroacetylcarnitine

研究代表者

糸井 利幸 (ITOI, TOSHIYUKI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10264780

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)：ジクロロ酢酸とアセチルカルニチン双方の薬理作用を発揮し臓器保護薬として期待される新たな低分子化合物を合成し効果を検討した。

H24年度は基本骨格の合成し、H25年度～H26年度にその生物学的等価置換基を導入して薬理的に強化された新化合物の作成に成功した。ラット孤立灌流心を用いた再灌流障害の抑制効果検証実験で、対象は $14 \pm 6\%$ の回復率であったのに対し化合物により $73 \pm 38\%$ ($n=6$)の極めて有意な回復率を達成した。化合物 50mg/kgの腹腔内投与後5日間は全く問題なく急性毒性は認めなかった。なお特許申請中のため、新化合物の構造については秘匿する。

研究成果の概要(英文)：Our aim of this study was to synthesize new low-molecular compound which has pharmacological effects of both dichloroacetate and acetyl-carnitine and to analyze its effect of organ protection.

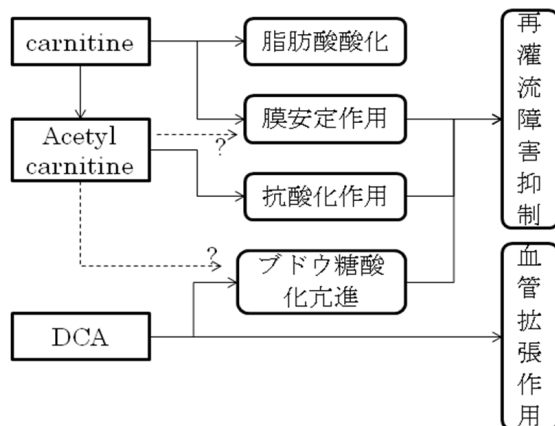
We synthesized basic molecular platform in 2012 and succeeded to produce new compound A which was induced biological equivalent substituent during 2013-2014. The functional recovery rate of reperfused rat heart under isolated heart perfusion system was significantly high of $73 \pm 38\%$ in compound A group in comparison with the control group of $14 \pm 6\%$. The structure of the new compound was concealed because this was under pending patent application.

研究分野：小児循環器

キーワード：再灌流障害 ジクロロ酢酸 カルニチン 新化合物 心筋

1. 研究開始当初の背景

- (1) 臓器移植や人工心肺を用いる開心術において臓器の虚血後再灌流障害の克服が重要課題である。特に乳幼児に対する開心術は血流遮断時間が長く、術後の心機能障害や高度肺高血圧に対する治療に難渋することが多い。このため、虚血前後の臓器保護を目的とした治療戦略が求められる。
- (2) ピルビン酸脱水素酵素の不活化によるブドウ糖酸化亢進剤であるジクロロ酢酸 (DCA) は実験用工業薬品として市販されているが、ピルビン酸脱水素酵素欠損症など極めてまれな先天性代謝異常症の治療として流用されている。DCA はその強力なブドウ糖酸化亢進による心筋の虚血後再灌流障害の改善について多くの報告があり、最近ではカリウムチャンネルを介する末梢肺動脈拡張作用を有することが報告されている。しかし、DCA は臓器保護に求められる抗酸化作用についての有効性は明らかではない。
- (3) ミトコンドリアでの脂肪酸酸化に必須の基質であるカルニチンは虚血後再灌流心のエネルギー代謝を改善し、心機能を改善することは実験的に実証されているが、組織への移行性が不良なためか大量投与が必要であった。アセチルカルニチンは組織移行性が良く抗酸化作用も強いが、ブドウ糖酸化亢進作用に関する報告はない。現在の薬品市場ではカルニチン、アセチルカルニチンともに健康薬品、サプリメントとして市販されているが、心筋をはじめとする臓器保護薬としての開発は頓挫している。さらにわれわれは、細胞内でカルニチンから誘導されたアセチルカルニチンが膜脂質不飽和脂肪酸による過酸化脂質の増加を抑制することも明らかにした⁽¹⁾。アセチルカルニチンの膜安定化作用、ブドウ糖酸化亢進作用は十分解明されていないが、細胞内エネルギー代謝システムの中では、カルニチンよりも活性の高い物質と考えられる。



- (4) DCA とアセチルカルニチン双方の薬理効果を同時に有する化合物合成を目指して予備実験を行ったところ、カルニチンから誘導される新化合物 compound2007 を得たが、潮解性が強い化合物であった。以後の記述における化合物はすべて特許出願の対象となっているため具体的構造は提示しない。

2. 研究の目的

- (1) 本研究の目的は不安定な compound2007 を基本骨格にして、安定な化合物を新たに合成することと、得られた化合物の薬理作用、特に臓器保護効果を灌流心を用いて虚血再灌流障害に対する効果を検討することである。
- (2) 加水分解されやすい化合物の安定化には、生物活性分子の一部の原子や原子団を他の原子や原子団に置き換え、生物活性が同等もしくは増強された新しい分子である生物学的等価体の作成が最も考えられるが、類似の化合物は存在しないため、いくつかの候補から等置換基を選択する。

3. 研究の方法

- (1) Compound2007 の合成
カルニチンと DCA を基質として、アセトン、エーテル等を用いた数段階の抽出を経て、ガラス状の個体を得る
- (2) 生物学的等価体の作成
Compound2007 の高度潮解性は内部に存在するエステル結合が弱いためと考えられたことから、エステル結合をより強固な結合に変換するため、アミド 1 及びアミド 2 によるアミド結合への置換と、カルボン酸を P 酸塩、S 酸塩への置換、塩素、ホウ素への置換を行った。
- (3) 得られた化合物の安定性は溶液中の減量および化合物濃度を ¹H-NMR ならびに質量分析計で検討し、安定性の目標は溶液内で 90% 以上の化合物濃度が 1 ヶ月以上保持されることを条件とした。
- (4) 摘出孤立灌流心システム：新化合物投与による虚血再灌流障害軽減の検証実験
 - ・ 使用動物：Sprague-Dawley rat (4 週齢、離乳直後)
 - ・ 全身麻酔後に摘出した心臓の大動脈と左心房にカニューラを挿入後、灌流液を流す。心臓は自動的に拍動し、灌流液を拍出する。その圧力 (= 血圧)、心拍数、流量を測定して心機能の指標とした。灌流液を遮断、再開することにより虚血、再灌流の影響を検討した。
 - ・ 灌流液：Krebs-Henseleit 緩衝液 (NaCl; 118mM, KCl; 4.7mM, KH₂PO₄; 1.2mM, MgSO₄ · 7H₂O; 1.2mM, CaCl₂ · 2H₂O; 1.25mM) に 5.5mM ブドウ糖、1.2mM パルミチン酸、3% アルブミンを追加したものを用いた。
 - ・ パルミチン酸を混合するのは、脂肪酸存

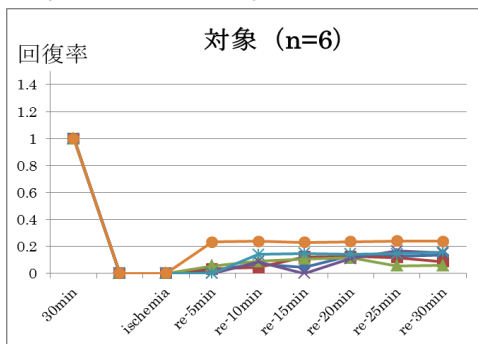
在下では再灌流時の機能障害が増強すること、心筋梗塞や体外循環時の血中脂肪酸増加する臨床条件を再現するためである。

- ・ 灌流液は95% CO₂+ 5%O₂ガスにより酸化素化した。
- ・ 孤立灌流心を用いて、20分の前灌流後、40分の完全灌流遮断および30分の再灌流を行った。通常、ラット孤立灌流心を用いた灌流遮断は20分から30分、40分は通常よりも極めて長い遮断時間である。

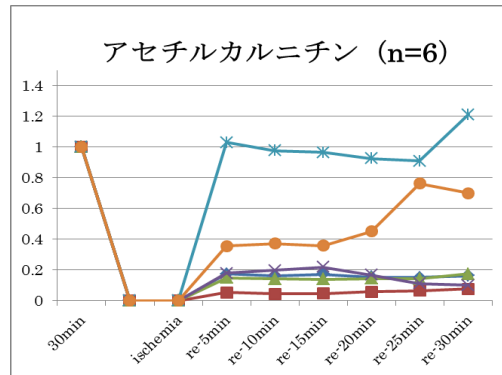
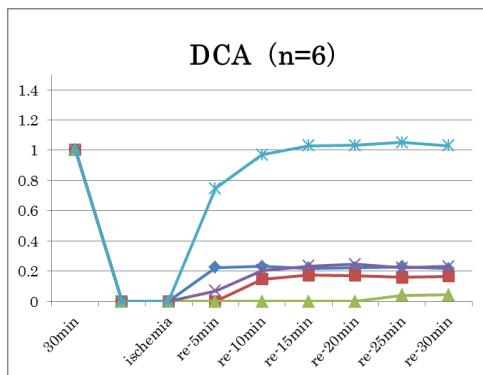
- (5) 再灌流開始時に灌流液 100ml 中に検討化合物 (各 1mM) もしくは検討化合物無し (対象、灌流液のみ) を投与し、アセチルカルニチン (1mM) および DCA (1mM) 投与に対する心機能回復率と比較した。
- (6) 検討化合物はすべて Krebs-Henseleit 緩衝液に溶解して調整し、1mM の濃度のものを再灌流開始時に灌流液に投与した。
- (7) 動物実験は「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(総理府基準) を遵守して行った。

4. 研究成果

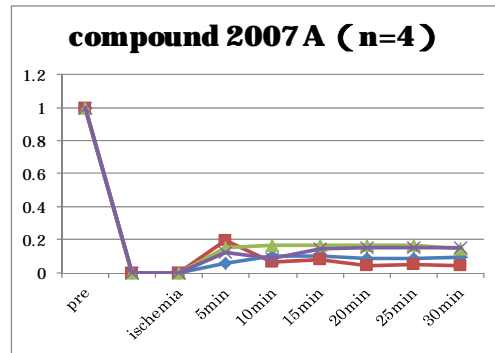
- (1) 得られた新化合物は 9 種類で、このうち有効性が期待された生物学的等価体は 4 種類、合成が困難なものが 2 種類であった。
- (2) 対象では 40 分灌流遮断の回復率は $14 \pm 6\%$ (平均 \pm 標準偏差) と極めて低値であった。



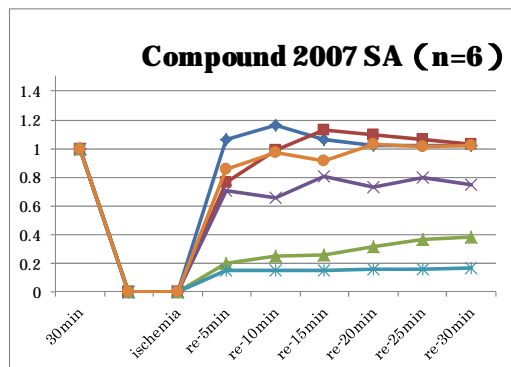
- (3) DCA 1mM とカルニチン 1mM 投与の回復率はそれぞれ $31 \pm 36\%$ 、 $40 \pm 46\%$ であった。



- (4) 酸性塩の 2 種類は compound2007 と同様な強い吸湿性のため実験に使用することはできなかった。
- (5) 塩素、ホウ素の 2 種類の置換体は合成不可であった。
- (6) 生物学的等価体で安定した化合物として、compound2007A、compound2007SA-1、compound2007SA-2、compound2007SA-3 の 4 種類が合成された。
 - ・ compound2007A 投与では再灌流時機能回復は認められなかった。



- ・ compound2007SA-1 投与による回復率は $73 \pm 38\%$ (n=6) の極めて有意な回復率を達成した (p=0.029)



- ・ compound2007 SA の薬理効果を増強する目的でさらに等価置換基を導入した compound2007SA-2、compound2007SA-3 は安定した化合物であったが、再灌流時の心機能はほとんど

回復しなかった。
(7) 再灌流実験で有効性が顕著な有効性が認められたのは compound2007SA-1 で DCA、アセチルカルニチンに対して有意に回復率が良好であった。

(8) compound2007 SA に対する毒性実験
(i) compound2007 SA を Krebs-Henseleit 緩衝液で溶解し、50mg/kg を 6 週ラット (n=4) の腹腔内に投与した。

(ii) 投与後 5 日間経過観察を行い、全例生存していた。

Krebs-Henseleit 緩衝液灌流液中には compound2007 SA を 1.0mM (34.5mg) を添加している。

中毒実験では、ラット体重は 162g、156g、152g、162g で、ラットの血液循環量も大体体重の 8% と考えると循環血液量は約 12ml/150g で、compound2007 SA 投与量は、50mg/kg=7.5mg/12ml と算出される。灌流は 100ml で行っていたので、循環血液量を同じ 100ml とすると、62.5mg/100ml となり、腹腔内投与量は虚血再灌流心の 1.0mM の投与量の約 2 倍であった。

(9) まとめ：

- ・ ジクロール酢酸とアセチルカルニチン双方の特徴を有すると考えられる新たな化合物 compound2007 の合成を行い、その安定化を目指して改良を試みた。
- ・ 数種類の化学的等価体の合成に成功しこのうち特に compound2007SA が虚血再灌流心の機能障害を強力に改善することを確認した。
- ・ compound2007 SA のラットへの投与による急性毒性は認めなかった

(10) 参考文献

(1) Oka T, Itoi T. Circ J. 2008)

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 4 件)

(1) 糸井利幸. 心臓手術後乳幼児に対する経胃管単回投与によるシルデナフィル血中濃度変化. 日本小児臨床薬理学会雑誌 2012; 25: 124-127

(2) Oka T, Kato R, Fumino S, Toiyama K, Yamagishi M, Itoi T, Hamaoka K. Noninvasive estimation of central venous pressure after Fontan procedure using biochemical markers and abdominal echography. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 146(1): 153-157 (corresponding author)

(3) Itoi T, Oka T, Terada N. Modulation of C(16:0) -ceramide in hypertrophied immature hearts by losartan. Pediatr Int. 2013; 55 (3): 272-276.

(4) Umenai T, Shime N, Asahara T, Nomoto K and Itoi T. A pilot study of Bifidobacterium breve in neonates undergoing surgery for congenital heart disease. J Intens Care. 2014, 2:36-

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 1 件)

名称：虚血性疾患治療薬

発明者：糸井利幸、浅田 大、川村 怜、小松拓磨、古谷野浩治、池田貴弘、

権利者：京都府大学法人

種類：特許

番号：特願 2015- 46825

出願年月日：2015 年 3 月 10 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸井利幸 (ITOI, Toshiyuki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10264780

(2) 研究分担者

問山健太郎 (TOIYAMA, Kentaro)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00433285

岡 達二郎 (OKA, Tatsujiro)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：80433283