

論文の内容の要旨

論文題目 心筋虚血再灌流傷害に対する低濃度一酸化炭素
の保護効果 – MAPK, Akt-eNOS-cGMP 経路 –

指導教官：永井良三教授

平成 13 年入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 藤本 肇

【背景】

急性心筋梗塞が発症した際、早期に再灌流療法を行うことが重要である。しかし虚血心筋を急速に酸素化すると心筋内で活性酸素が発生し、虚血再灌流傷害を引き起こし、心筋細胞死・左室機能低下・致死的不整脈を惹起する可能性がある。虚血再灌流傷害を来した心筋においては活性酸素が集積していること、そしてこの活性酸素の集積を抑制すると心筋傷害・左室機能低下・不整脈などが低減することから活性酸素によって引き起こされる酸化ストレスが虚血再灌流傷害発症に深く関わっていると考えられている。

生体内における抗ストレス酵素である heme oxygenase-1(HO-1)は heme を代謝して遊離鉄、ビリベルジン(biliverdin)、一酸化炭素(CO)を産生すると考えられている。CO は従来細胞の呼吸を阻害する有毒物質として認識されていたが、近年種々の組織障害に対して低濃度の CO が防御的效果を示すことが報告されるようになった。しかし CO の組織保護効果の機序については諸説が錯綜しており、依然不明な点が多い。

HO-1が抗酸化作用により心筋虚血再灌流傷害を低減させる機能を有する点に鑑みると、HO-1によるヘムの代謝産物であるCOも同様の効果を有する可能性がある。HO-1に比してCOをガスの状態で多量に準備することは比較的容易であるから、もし低濃度のCOに心筋虚血再灌流傷害を低減させる効果があれば副作用を生じさせない濃度で急性心筋梗塞患者に投与することにより治療手段として利用できる可能性がある。また心臓のように酸素需要が多い臓器においてCOが虚血再灌流傷害を低減させるか効果を有するか否かは非常に興味深いと思われる。さらにCOの組織保護の機序を明らかにすることはHO-1の生理的な機能を解明する上でも重要であると考えられる。本研究で我々は様々な濃度のCOを投与したラットに心筋虚血再灌流手術を施行し、COが心筋を虚血再灌流傷害から防御する効果を有するか否かを検討し、さらにその機序についても検討した。

【方法】

体重180g–250gの雌Sprague-Dawleyラットを密閉された容器内に入れ、0ppm, 250ppm, 500ppm, 1000ppm各濃度のCOと空気の混合ガスを容器内に還流させる、または容器内の気圧を0.5気圧に減圧してラットを低酸素状態に曝し24時間飼育。その後ラットを容器から取り出して麻酔下にて迅速に開胸し、冠動脈左前下行枝近位部を結紮し、30分後に再灌流、再灌流後2時間後に心筋を取り出し、心筋梗塞領域の計測・心筋内における各種タンパク発現・病理所見（病理標本は再灌流2時間後に閉胸し、24時間後に心臓を摘出）などを検討した。なお、CO吸入群ラットについては虚血再灌流中の血中HbCO濃度をほぼ一定に保つために再灌流後2時間250ppmのCO混合空気を人工呼吸器により吸入させた。

【結果】

250ppm, 500ppm, 1000ppmの一酸化炭素を24時間吸入させた時のラットの血中HbCO濃度は各々 $20 \pm 1\%$, $25 \pm 1\%$, $30 \pm 1\%$ であった。COの吸入はラットの術前の血圧や体温に影響を及ぼさなかった。

1000ppm COを24時間吸入させた後虚血再灌流手術を施行した群では前下行枝灌流域に対する梗塞領域の割合(I/R比)は $6 \pm 2\%$ であり、COを吸入させなかったコントロール群のI/R比 $35 \pm 4\%$ に比して有意に低値であった($P < 0.01$)。亜鉛プロトポルフィリン(ZnPP; HO-1阻害剤)の事前投与下でも1000ppm COはZnPP非投与下と同程度に虚血再灌流傷害を低減させた。

また1000ppm COを24時間吸入させた群では前下行枝灌流域における単核球

の浸潤や TNF- α の発現は有意に低減していた。250ppm, 500ppm の CO を 24 時間吸入させた群や 0.5 気圧の低酸素状態に 24 時間曝した群では I/R ratio の低減や前下行枝領域における単核球浸潤や TNF- α の減少は認めなかった。

1000ppm CO をラットに吸入させると心筋内 p38MAPK, Akt, eNOS, cGMP の活性化が認められた。一方 250ppm CO, 500ppm CO の吸入や 0.5 気圧の低酸素状態への暴露はこれらのタンパクを活性化させなかった。SB203580 (p38MAPK 阻害剤) をラットに事前投与すると 1000ppm CO による p38MAPK のリン酸化が阻害され、wortmannin (PI3kinase 阻害剤) を事前投与すると 1000ppm CO による Akt, eNOS のリン酸化が阻害された。SB203580 と wortmannin 両方を事前投与すると 1000ppm CO による p38MAPK, Akt, eNOS のリン酸化は全て阻害された。Wortmannin または L-NAME(NO 阻害剤) の事前投与は各々 1000ppm CO の吸入による心筋内 cGMP の活性化も抑制した。

SB203580, wortmannin, L-NAME 各々を事前投与した上で 1000ppm CO を 24 時間吸入させたラットに虚血再灌流手術を施行すると、I/R 比は vehicle (DMSO) と 1000ppm CO を投与したラットに比して有意に高く、CO を投与しなかったラットに比して有意に低かった (I/R 比; $20 \pm 3\%$ [SB203580 + 1000ppm CO], $23 \pm 2\%$ [wortmannin + 1000ppm CO], $39 \pm 4\%$ [SB203580 + wortmannin + 1000ppm CO], and $22 \pm 5\%$ [L-NAME + 1000ppm CO] vs $9 \pm 3\%$ [vehicle + 1000ppm CO], 各 $P < 0.01$)。即ち SB203580, wortmannin, L-NAME には各々 1000ppm CO の心筋保護効果を部分的に阻害する効果が認められ、SB203580 と wortmannin の両方を事前投与すると 1000ppm CO による心筋保護効果は完全に阻害された。また methylene blue (可溶性グアニレート・シクラーゼ阻害剤) を事前投与すると 1000 ppm CO の心筋保護効果は阻害された (I/R 比; $31 \pm 7\%$ [methylene blue + 1000ppm CO])。

【考察】

本研究の結果から 1000ppm CO には心筋虚血再灌流傷害を低減させる効果があると考えられた。500ppm CO, 1000ppm CO 各々に 24 時間曝したラットで血中 HbCO 濃度はほぼ同程度であったにもかかわらず 500ppm CO には I/R ratio 低減効果や p38MAPK, Akt, eNOS 活性化効果は認められず、また 0.5 気圧低酸素状態にもかかる効果は認められなかったことから、1000ppm CO の心筋保護効果は低酸素 preconditioning によるものではないと考えられた。心臓のように特に酸素需要の多い臓器において CO 投与により虚血再灌流傷害が低減することは注目すべき事実と考えられた。

CO の組織保護効果の機序について、我々は従前から考えられている

p38MAPK 経路と併せて Akt-eNOS 経路の役割についても検討した。MAPK は活性酸素に反応して活性化され、細胞死を制御すると考えられており、Akt は心筋細胞を虚血再灌流傷害によるアポトーシスから防御する役割をされると考えられている。さらに Akt の活性化は endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の活性化を引き起こし、NO は細胞のアポトーシスを低減させるとともに sGC-cGMP を活性化させると考えられている。1000ppm CO の吸入は心筋中の p38MAPK, Akt, eNOS, cGMP を活性化させた。SB203580, wortmannin, L-NAME, methylene blue を用いた検討から、CO の心筋保護効果は p38MAPK 経路と Akt-eNOS-sGC-cGMP 経路を介しており、これら二つの経路は互いに独立した経路であると考えられた。これまで Akt-eNOS 経路と CO の組織保護効果との関係についての報告は見られず、我々の結果は CO のシグナル経路についての新しい知見であった。内皮細胞は心臓に豊富に存在しており、心筋においては CO の保護効果に Akt-eNOS 経路が重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。

我々のデータから、心筋虚血再灌流傷害を低減させるのに必要な CO 濃度は 1000ppm であった。血中 HbCO 濃度が約 30% に至ると CO による様々な毒性が発現する可能性がある。それゆえ人体における CO の至適濃度を検討するにはさらに多くの種類の動物を用いて様々な条件下での実験が必要であると考えられる。しかしそのことを勘案しても我々のデータは将来心筋虚血再灌流傷害に対して CO が治療的に利用される可能性を示唆するものであると考える。

【結論】 CO は心筋虚血再灌流傷害に対する防御的効果を有する。この効果には p38MAPK 経路と sGC, cGMP の活性化を含む Akt-eNOS 経路が重要な役割を果たしていると考えられた。本研究の結果は将来、急性心筋梗塞患者の虚血再灌流傷害を低減させるために低濃度 CO を臨床応用できる可能性を示唆するものと考えられた。