

京都大学	博士（薬学）	氏名	五百蔵 忠明
論文題目	セロフェンド酸の脳および心筋虚血障害に対する保護作用に関する研究		
（論文内容の要旨） セロフェンド酸はウシ胎仔血清より単離されたアチサン型環状ジテルペンを基本骨格とする低分子化合物である。これまでに培養神経細胞において、セロフェンド酸がグルタミン酸神経毒性に対して抗アポトーシス作用を示すこと、および過酸化水素毒性に対して抗ラジカル作用を示すことが報告されてきた。さらに、培養心筋細胞において、セロフェンド酸が過酸化水素毒性に対して保護作用を示すことも報告されている。これらのin vitroにおける結果により、生命維持に重要な臓器である脳および心臓における虚血性障害をセロフェンド酸が制御することが示唆されるが、これらの臓器におけるin vivoでの虚血性障害に対する作用は不明である。そこで本研究において著者は、ラット中大脳動脈一過性閉塞モデルおよびラット左冠動脈前下降枝一過性閉塞モデルを用いて、セロフェンド酸の虚血-再灌流障害に対する保護作用に関する研究を行い、以下の新知見を得た。 第一章 ラット中大脳動脈一過性閉塞モデルにおけるセロフェンド酸の保護作用 全身投与したセロフェンド酸の脳虚血により誘発される障害に対する作用を明らかにする目的で、ラット中大脳動脈一過性閉塞モデルを用い、セロフェンド酸静脈内投与の保護作用を検討した。セロフェンド酸は血中からの消失半減期が短いことを考慮し、虚血開始30分前、虚血開始直後、再灌流直前のそれぞれの時点で合計3回静脈内投与した。セロフェンド酸（10 mg/kg）は再灌流48時間後の梗塞巣体積を著明に減少した。さらに神経症状の評価を行った結果、セロフェンド酸は再灌流48時間後の神経症状を改善した。脳虚血において、虚血中心領域ではニューロンのネクローシスが惹起され、一方で虚血周辺領域ではアポトーシスが多く誘発されることが知られている。そこで、虚血中心領域を多く含む線条体部分と虚血周辺領域を多く含む大脳皮質部分に分けて梗塞巣体積を定量した結果、主に大脳皮質部分の梗塞巣体積が減少することが明らかとなった。これらの結果から、セロフェンド酸の神経保護作用には抗アポトーシス作用が重要な役割を果たすことが示唆された。セロフェンド酸の保護作用の発現には3回に分けて投与することが重要であるか否かを明らかにする目的で、セロフェンド酸（30 mg/kg）を虚血開始30分前、虚血開始直後、再灌流直前のいずれかの時点で1回投与した。その結果、梗塞巣体積および神経症状の評価において、セロフェンド酸の神経保護作用は観察されなかった。以上の結果から、セロフェンド酸はin vivoにおいて虚血性脳障害に対して保護作用を発現することが明らかとなり、その保護作用の発現には虚血-再灌流時のセロフェ			

ンド酸の血中濃度の維持が重要であることが示唆された。

第二章 ラット一過性心筋虚血モデルにおけるセロフェンド酸の保護作用

セロフェンド酸の虚血性心筋障害に対する作用を明らかにする目的で、ラット左冠動脈前下行枝一過性閉塞モデルを用い、セロフェンド酸静脈内投与の梗塞巣体積に対する作用を定量した。セロフェンド酸を虚血前と再灌流前の2回静脈内投与したところ、再灌流後の心筋の梗塞巣体積を著明に減少した。培養心筋細胞を用いた検討において、セロフェンド酸の保護作用はミトコンドリアATP感受性カリウムチャネル（mitoK_{ATP}チャネル）の開口を介して発現することが示唆されている。そこで、セロフェンド酸とmitoK_{ATP}チャネル開口薬のdiazoxideの心筋虚血-再灌流障害に対する保護作用を比較したところ、両薬物は梗塞巣体積を同程度に減少した。セロフェンド酸およびdiazoxideの心筋保護作用は、mitoK_{ATP}チャネル遮断薬の5-hydroxy-decanoateの投与により完全に消失した。これらの結果から、セロフェンド酸はin vivoにおいて心筋保護作用を発現し、その作用には心筋のmitoK_{ATP}チャネルの開口が重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、セロフェンド酸の保護作用機序を細胞レベルで解析するために、2光子レーザー顕微鏡を用いて検討を行った。ランゲンドルフ灌流心を用い、tetramethylrhodamine (TMRE) の蛍光強度をミトコンドリア膜電位変化の指標として、虚血-再灌流時のミトコンドリア膜電位の変化を観察した。虚血-再灌流負荷によりTMREの蛍光強度は減少した。セロフェンド酸の適用により、虚血-再灌流負荷によるTMREの蛍光強度の減少は抑制した。以上の結果から、セロフェンド酸はmitoK_{ATP}チャネルの開口を介して虚血-再灌流負荷により惹起されるミトコンドリア膜電位の低下を抑制することが示唆された。したがって、セロフェンド酸は、虚血-再灌流時のミトコンドリア膜電位の消失を抑制することにより、心筋保護作用を発現すると結論された。

以上、著者はラット中大脳動脈一過性閉塞モデルを用いて、セロフェンド酸の静脈内投与が脳虚血-再灌流障害に対して保護作用を発現することを明らかにした。さらに、ラット左冠動脈前下降枝一過性閉塞モデルを用いて、セロフェンド酸が心筋虚血-再灌流障害に対して保護作用を発現することを明らかにし、その機序としてミトコンドリア内膜に存在するmitoK_{ATP}チャネルの開口によるミトコンドリアの膜電位の維持が重要であることを示した。本研究の成果は、脳および心臓における虚血-再灌流障害に対してセロフェンド酸の全身投与が保護作用を示すことを明らかにしたものであり、虚血性脳障害および虚血性心筋障害に対する治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

セロフェンド酸はウシ胎仔血清より単離されたアチサン型環状ジテルペンを基本骨格とする低分子化合物である。これまでに培養神経細胞において、セロフェンド酸がグルタミン酸神経毒性に対して抗アポトーシス作用を示すこと、および過酸化水素毒性に対して抗ラジカル作用を示すことが報告されてきた。さらに、培養心筋細胞において、セロフェンド酸が過酸化水素毒性に対して保護作用を示すことも報告されている。これらのin vitroにおける結果により、生命維持に重要な臓器である脳および心臓における虚血性障害をセロフェンド酸が制御することが示唆されるが、これらの臓器におけるin vivoでの虚血性障害に対する作用は不明である。そこで本研究において、ラット中脳動脈一過性閉塞モデルおよびラット左冠動脈前下降枝一過性閉塞モデルを用いて、セロフェンド酸の虚血-再灌流障害に対する保護作用に関する研究を行った。

全身投与したセロフェンド酸の脳虚血により誘発される障害に対する作用を明らかにする目的で、ラット中脳動脈一過性閉塞モデルを用い、セロフェンド酸静脈内投与の保護作用を検討した。セロフェンド酸は血中からの消失半減期が短いことを考慮し、虚血開始30分前、虚血開始直後、再灌流直前のそれぞれの時点で合計3回静脈内投与した。セロフェンド酸 (10 mg/kg) は再灌流48時間後の梗塞巣体積を著明に減少した。さらに神経症状の評価を行った結果、セロフェンド酸は再灌流48時間後の神経症状を改善した。脳虚血において、虚血中心領域ではニューロンのネクロシスが惹起され、一方で虚血周辺領域ではアポトーシスが多く誘発されることが知られている。そこで、虚血中心領域を多く含む線条体部分と虚血周辺領域を多く含む大脳皮質部分に分けて梗塞巣体積を定量した結果、主に大脳皮質部分の梗塞巣体積が減少することが明らかとなった。これらの結果から、セロフェンド酸の神経保護作用には抗アポトーシス作用が重要な役割を果たすことが示唆された。セロフェンド酸の保護作用の発現には3回に分けて投与することが重要であるか否かを明らかにする目的で、セロフェンド酸 (30 mg/kg) を虚血開始30分前、虚血開始直後、再灌流直前のいずれかの時点で1回投与した。その結果、梗塞巣体積および神経症状の評価において、セロフェンド酸の神経保護作用は観察されなかった。以上の結果から、セロフェンド酸はin vivoにおいて虚血性脳障害に対して保護作用を発現することが明らかとなり、その保護作用の発現には虚血-再灌流時のセロフェンド酸の血中濃度の維持が重要であることが示唆された。

セロフェンド酸の虚血性心筋障害に対する作用を明らかにする目的で、ラット左冠動脈前下行枝一過性閉塞モデルを用い、セロフェンド酸静脈内投与の梗塞巣体積に対する作用を定量した。セロフェンド酸を虚血前と再灌流前の2回静脈内投与したところ、再灌流後の心筋の梗塞巣体積を著明に減少した。培養心筋細胞を用いた検討において、セロフェンド酸の保護作用はミトコンドリアATP感受性カリウムチャネル (mitoK_{ATP}チャネル) の開口を介して発現することが示唆されている。そこで、セロフェンド酸とmitoK_{ATP}チャネル開口薬のdiazoxideの心筋虚血-再灌流障害に

対する保護作用を比較したところ、両薬物は梗塞巣体積を同程度に減少した。セロフェンド酸およびdiazoxideの心筋保護作用は、mitoK_{ATP}チャネル遮断薬の5-hydroxy-decanoateの投与により完全に消失した。これらの結果から、セロフェンド酸はin vivoにおいて心筋保護作用を発現し、その作用には心筋のmitoK_{ATP}チャネルの開口が重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、セロフェンド酸の保護作用機序を細胞レベルで解析するために、2光子レーザー顕微鏡を用いて検討を行った。ランゲンドルフ灌流心を用い、tetramethylrhodamine (TMRE) の蛍光強度をミトコンドリア膜電位変化の指標として、虚血-再灌流時のミトコンドリア膜電位の変化を観察した。虚血-再灌流負荷によりTMREの蛍光強度は減少した。セロフェンド酸の適用により、虚血-再灌流負荷によるTMREの蛍光強度の減少は抑制した。以上の結果から、セロフェンド酸はmitoK_{ATP}チャネルの開口を介して虚血-再灌流負荷により惹起されるミトコンドリア膜電位の低下を抑制することが示唆された。したがって、セロフェンド酸は、虚血-再灌流時のミトコンドリア膜電位の消失を抑制することにより、心筋保護作用を発現すると結論された。

以上、ラット中脳動脈一過性閉塞モデルを用いて、セロフェンド酸の静脈内投与が脳虚血-再灌流障害に対して保護作用を発現することを明らかにした。さらに、ラット左冠動脈前下降枝一過性閉塞モデルを用いて、セロフェンド酸が心筋虚血-再灌流障害に対して保護作用を発現することを明らかにし、その機序としてミトコンドリア内膜に存在するmitoK_{ATP}チャネルの開口によるミトコンドリアの膜電位の維持が重要であることを示した。本研究の成果は、脳および心臓における虚血-再灌流障害に対してセロフェンド酸の全身投与が保護作用を示すことを明らかにしたものであり、虚血性脳障害および虚血性心筋障害に対する治療薬を開発する上で重要な基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降