

学位論文題名

A NOVEL INHIBITOR OF RHO-ASSOCIATED PROTEIN KINASE, Y-27632, AMELIORATES HEPATIC ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY IN RATS

(新しい ROCK 阻害薬 (Y-27632) はラット肝虚血・再灌流障害を改善する)

学位論文内容の要旨

【目的】

肝臓の虚血・再灌流傷害の病態に、微小循環障害や白血球の集積・浸潤が関与していることが指摘されてきた。これに対し、各種の血管作動性物質の投与や、白血球の集積・浸潤を抑制することにより、この病態を軽減することができる。最近、細胞内シグナル伝達系のひとつである ROCK (Rho-associated coiled coil forming kinase) が、平滑筋収縮の Ca 感受性経路や白血球をはじめとした細胞の浸潤・運動を制御していることが解明された。ROCK 阻害薬 (Y-27632) はこの経路を阻害することにより、血管を拡張し細胞の運動を抑制する働きがある新しい薬剤である。これまで、この薬剤の肝臓や他の臓器における虚血・再灌流傷害に対する効果を検討した研究はなかった、今回我々は、ラットの肝臓における温虚血・再灌流傷害に対する Y-27632 の効果を検討した。

【方法】

雄性 SD ラット (200-300g) の肝左葉・中葉への流入血管を 2 時間 clamp し、再灌流後、非虚血葉を切除する 70% 肝温虚血・再灌流モデルを作成した。動物は蒸留水を投与した無治療群 (C)、Y-27632 10 mg/Kg 投与した治療群 (Y) の 2 群に分け、薬剤は虚血 1 時間前に経口で投与した。平均動脈圧 (MAP)、心拍数、肝組織血流量 (%HTBF) をモニターし、1 週間生存率を各群 12 匹ずつで検討した。また、虚血開始前、2 時間虚血後、再灌流後 30 分、1 時間、6 時間、24 時間後に各群 6 匹ずつを犠牲死させ、血液および肝臓を採取し、肝機能 (血清 ALT、アンモニア)、血中 ET-1、ヒアルロン酸、肝組織中 MPO 活性および MDA 量、免疫組織染色による ICAM-1、Mac-1 の発現、組織病理を検討した。

【成績】

一週間生存率は Y-27632 により有意に改善し、C : 3/12, Y : 9/12 であった。MAP、心拍数は、2 群間で有意差を認めなかった。虚血前値に対する %HTBF は、再灌流後 5 分で C : 27.7 ± 12.8%, Y : 52.8 ± 6.8% であり、治療群で有意に肝組織血流が改善していた。再灌流後 6 時間値で、血清 ALT 値は C : 10791.2 ± 1454.3 IU/L, Y : 5553.2 ± 306.6 IU/L で、血中アン

モニアは C : 250.3 ± 44.2 mg/dl, Y : 238.3 ± 28.8 mg/dl あり, 治療群で有意に肝機能が改善していた。血中 ET-1 は再灌流後 6 時間値で C : 7.47 ± 1.53 pg/dl, Y : 1.54 ± 0.52 pg/dl と, ヒアルロン酸値も C : 148.0 ± 20.5 ng/ml, Y : 75.2 ± 12.3 ng/ml と, Y-27632 投与群 (Y) が無治療群 (C) に比べ有意に低値を示した。免疫染色において, ICAM-1 染色では有意な差を認めなかったが, 再灌流後 6 時間後において肝組織内の Mac-1 染色陽性の好中球数は, 無治療群 (C) は Y-27632 投与群 (Y) に比べ有意に多く, 肝組織中 MPO 活性の結果と一致した。肝組織中の MDA は, control では好中球浸潤に伴い上昇したが, Y-27632 投与群 (Y) では再灌流後早期より有意に抑制されていたが, 24 時間後では有意差を認めなかった。HE 染色による組織病理学的検討では, 再灌流後 6 時間後および 24 時間後において, 再灌流後の肝細胞壊死巣が Y-27632 投与群 (Y) で有意に減少していた。

【考案】

この論文は, 選択的 ROCK 阻害薬 Y-27632 が, ラットの肝臓の虚血・再灌流傷害を軽減することを示した最初の報告である。Y-27632 は, 肝組織血流量を増加させ, 肝機能を改善し, 生存率を改善させたが, この実験の投与量では明らかな副作用は発現しなかった。

虚血・再灌流傷害において, 好中球の集積, および肝組織内への浸潤が臓器傷害の重大な一因と考えられているが, Y-27632 は好中球の浸潤を有意に抑制した。これまでの *in vitro* における研究報告と, 今回の実験の結果を合わせて考えると, Y-27632 が好中球の運動能を抑制することにより, 肝組織内への浸潤好中球数を減少させたことが推測された。

Y-27632 投与により, 肝組織中の MPO 活性や MDA 産生量が抑制されるとともに, 肝機能障害が改善し肝組織の構築が維持された。MDA は過酸化された脂質の最終産物であり, 肝組織中で産生されるの活性酸素種をある程度反映していると考えられる。MDA は再灌流後早期から抑制されており, 内皮細胞での活性酸素種の産生を直接抑制した可能性があると考えられた。再灌流後 6 時間での肝組織中 MDA 量は, MPO 活性や Mac-1 陽性好中球数の変化と一致しており, 好中球の浸潤を抑制した結果と考えられる。

ヒアルロン酸は 90%以上が肝臓の類洞内皮細胞で取り込まれ, 代謝される。このため, 血清ヒアルロン酸値は, 産生亢進がなければ, 類洞内皮細胞機能とよく相関すると考えられている。また, エンドセリンは血管内皮細胞に傷害を与えるような各種の刺激によりその産生が亢進される。Y-27632 によりこれらの値の上昇が抑制されていることは, この薬剤が血管あるいは類洞内皮細胞を保護し, 機能維持に貢献していると考えられる。

Y-27632 は, 当初, 降圧剤として開発された薬剤であり, 30mg/Kg 投与では血圧の低下を認めたが, 10mg/Kg では循環動態に大きな影響は見られなかった。また, その他の重大な副作用も認めなかった。

【結論】

Y-27632 は, 微小循環を改善し, 好中球の肝組織浸潤を抑制することにより, 肝虚血・再灌流傷害を軽減すると考えられた。この薬剤は, 肝臓外科あるいは臓器保存への応用が期待され, 更なる研究が今後の課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 安 田 慶 秀
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

A NOVEL INHIBITOR OF RHO-ASSOCIATED PROTEIN KINASE, Y-27632, AMELIORATES HEPATIC ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY IN RATS

(新しい ROCK 阻害薬 (Y-27632) はラット肝虚血・再灌流障害を改善する)

心筋梗塞や脳梗塞において、虚血状態の時より血流再開後に、むしろ臓器傷害が進行していることが指摘され、虚血・再灌流傷害はその重要性が注目された。肝臓においては、肝移植が行われるようになって、移植された肝臓の機能を維持するために虚血・再灌流傷害の研究が重要性を増した。これまで、肝臓の虚血・再灌流傷害の病態に、他の臓器と同様に微小循環障害や白血球の集積・浸潤が関与していることが指摘されてきた。これに対し、各種の血管作動性物質の投与や、白血球の集積・浸潤を抑制することにより、この病態を軽減できることが報告されてきた。最近、細胞内シグナル伝達系のひとつである低分子量 G 蛋白 ROCK (Rho-associated coiled coil forming kinase)が、平滑筋収縮の Ca 感受性経路や白血球をはじめとした細胞の浸潤・運動を制御していることが解明された。ROCK 阻害薬(Y-27632)はこの経路を阻害することにより、血管を拡張し細胞の運動を抑制する働きがある新しい薬剤である。これまで、この薬剤の虚血・再灌流傷害に対する効果を検討した研究はなかった。今回我々は、ラットの 70%肝温虚血・再灌流モデルを作成し、肝臓における虚血・再灌流傷害に対する Y-27632 の効果を検討した。Y-27632 は、肝組織血流量を増加させ、肝機能を改善し、生存率を改善させた。組織中のミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性は、組織中に浸潤した好中球数を反映する指標として一般に用いられる。この実験では、再灌流後 6 時間の肝組織内における MPO 活性の上昇が、Y-27632 投与により有意に抑制された。これは、肝組織内 Mac-1 陽性好中球数の低下と一致しており、Y-27632 が好中球の浸潤を有意に抑制したことを示している。この実験で、Y-27632 が類洞内皮における ICAM-1 の発現に影響を与えていないことと、これまでの *in vitro* における研究報告を合わせて考えると、Y-27632 が好中球の運動能を抑制することにより、肝組織内への浸潤好中球数を減少させたことが推測された。MDA は過酸化されたリン脂質の最終産物であり、肝組織中で産生される活性酸素種による傷害を反映していると考えられる。Y-27632 による再灌流後 6 時間での肝組織中 MDA 量の抑制は、好中球浸潤の抑制と一致した。ヒアルロン酸は 90% 以上が類洞内皮細胞で取り込まれ、代謝されるため、血清ヒアルロン酸値は、産生亢進がなければ、

類洞内皮細胞機能を表すと考えられる。また、エンドセリンは各種の刺激により血管内皮細胞に傷害が加わるとその産生が亢進される。Y-27632 はこれらの値の上昇を抑制しており、この薬剤が血管あるいは類洞内皮細胞の保護および機能維持に貢献すると考えられた。病理所見でも、Y-27632 投与により再灌流後 6 時間での肝細胞壊死巣が縮小し、肝組織の構築が維持されていた。Y-27632 は、降圧剤として開発された薬剤であるが、今回の実験における使用量 10mg/kg では循環動態に大きな影響は見られず、その他の重大な副作用も認めなかった。以上より、Y-27632 は、微小循環を改善し、好中球の肝組織浸潤を抑制することにより、肝虚血・再灌流傷害を軽減すると考えられた。

公開発表後、副査の安田教授より末梢血の白血球の変動、薬剤の温度依存性に関する問題などの質問があった。虚血・再灌流時に白血球の増加が見られるという報告はあるが、今回の実験では調べていないこと、温度に関する報告は見られず、我々も検討していないと回答した。次に、主査の浅香教授からは、この実験に Y-27632 を選んだ理由、他の oxygen radical scavenger との比較などの質問があった。これまで、血管拡張薬や白血球の集積・浸潤を抑制する薬剤が虚血・再灌流傷害に対し有効であるといわれてきたが、この薬剤は強力な血管拡張薬であるとともに白血球の浸潤を抑制する働きも報告され、これまでの薬剤よりも傷害の軽減がより期待されたためと回答し、さらに他のスカベンジャーに関しては、残念ながらこの実験モデルでは比較検討していないことなどを説明した。最後に副査の藤堂教授より、この実験に関するコメントと薬剤の臨床応用への展望についての質問があった。白血球浸潤抑制のみならず、癌の浸潤・転移に対する応用の可能性も期待されると回答をした。

本研究は、選択的 ROCK 阻害薬 Y-27632 が、ラットの肝臓の虚血・再灌流傷害を軽減することを示した最初の報告であり、その内容は高く評価され、今後は肝臓外科あるいは臓器保存への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。