

氏名	高 軍毅 <small>コウ グンキ</small>
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	2011年9月14日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Long-Term Treatment with Eicosapentaenoic Acid Ameliorates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs in Vivo —Involvement of Rho-kinase Pathway Inhibition— (エイコサペンタエン酸長期投与による心筋虚血再灌流障害の抑制： Rho-kinase 経路抑制の関与)
論文審査委員	主査 教授 下川 宏明 教授 齋木 佳克 教授 堀内 久徳

## 論文内容要旨

【背景】急性心筋梗塞患者に対する経皮的冠動脈インターベンションによる再灌流療法は、梗塞サイズを抑制し、左室機能を温存し、臨床予後を改善させる。その一方で、再灌流療法に伴う心筋傷害のために、その有用性が減弱することがある (再灌流傷害)。これまでの疫学および介入研究により、魚油の主要 n-3 系脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) は心臓突然死、非致死的心筋梗塞に対して抑制的に作用することが報告されている。しかしながら、その分子機序に関しては十分な解明がなされていない。Rho-kinase は、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho の標的タンパク質として同定された細胞内セリンスレオニンリン酸化酵素であり、各種細胞の形態制御、遊走、遺伝子発現など種々の生理機能に重要な役割を果たし、虚血再灌流障害を含むさまざまな心血管病の病態に重要な関係している (Shimokawa H., Takeshita A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1767-1775)。EPA はスフィンゴシルホスホリルコリン経路を介して Rho-kinase 活性化を抑制することも報告されている (Nakao F., et al. *Circ Res.* 2002;91:953-960)。

【目的】1) EPA の長期投与が心筋虚血再灌流傷害を軽減する、2) その場合 Rho-kinase 経路抑制が関係するという仮説をブタ in vivo モデルを用いて検証する。

【方法】ブタ (雄, 体重 25-30kg) を EPA 投与群と対照群の 2 群にわけた (各 n=8)。前者では EPA (600mg/kg/日) を 21 日間投与した。22 日目バルーンカテーテルを用いて左回旋枝近位部を 90 分間閉塞させることで心筋虚血を惹起し、その後 60 分間の再灌流を行った。電気生理学的評価、左室造

影による左室機能評価の後、標本を作製し組織学的検討（心筋障害、炎症細胞浸潤）を行った。また Western blotting 法により Rho-kinase と eNOS の活性を定量的に評価した。

【結果】赤血球の細胞膜における EPA 濃度は治療域 ( $4.30 \pm 0.63 \text{ mol\%}$ ) であった。EPA 投与により、局所壁運動障害の改善 (EPA 群  $5.3 \pm 3.6$  vs. 対照群  $35.1 \pm 3.8$  unit,  $P < 0.0001$ ), 左室駆出率の改善 (EPA 群  $43 \pm 9\%$  vs. 対照群  $32 \pm 7\%$ ,  $P < 0.05$ ), 再灌流時の心室性不整脈発生頻度の減少 (EPA 群  $181 \pm 73$  vs. 対照群  $389 \pm 51$  回,  $P < 0.0001$ ), 組織学的に炎症細胞浸潤の抑制 (EPA 群  $69 \pm 34$  vs. 対照群  $170 \pm 107$  cells/mm<sup>2</sup>,  $P < 0.001$ ) が認められた。さらに EPA の投与により、虚血心筋の Rho-kinase 活性は有意に抑制され (EPA 群  $0.47 \pm 0.11$  vs. 対照群  $0.77 \pm 0.14$ ,  $P < 0.05$ ), eNOS の活性が有意に亢進した (EPA 群  $0.56 \pm 0.13$  vs. 対照群  $0.23 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ )。Rho-kinase 活性と eNOS の活性には有意な負の相関関係 ( $R = -0.584$ ,  $P = 0.01$ ) が認められた。

【結論】EPA 長期投与は虚血再灌流障害を抑制した。EPA の心筋保護的効果には Rho-kinase 経路抑制が関与することが示唆された。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 Long-Term Treatment with Eicosapentaenoic Acid Ameliorates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs in Vivo- Involvement of Rho-kinase Pathway Inhibition - (エイコサペンタエン酸長期投与による心筋虚血再灌流障害の抑制：Rho-kinase 経路抑制の関与)

所属専攻・分野名 医科学 専攻・循環器内科学 分野

学籍番号 ..... 氏名 高 軍毅 .....

急性心筋梗塞患者に対する経皮的冠動脈インターベンションによる再灌流療法は、梗塞サイズを抑制し、左室機能を温存し、臨床予後を改善させる。その一方で、再灌流療法に伴う心筋傷害のために、その有用性が減弱することがある（再灌流傷害）。これまでの疫学および介入研究により、魚油中の主要 n-3 系脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）が、心臓突然死、非致死的心筋梗塞に対して抑制的に作用することが報告されている。しかし、その分子機序に関しては十分な解明がなされていない。Rho-kinase は、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho の標的タンパク質として同定された細胞内セリンスレオニンリン酸化酵素であり、各種細胞の形態制御、遊走、遺伝子発現など種々の生理機能に重要な役割を果たし、虚血再灌流障害を含むさまざまな心血管病の病態に重要な関係している（Shimokawa H., Takeshita A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1767-1775）。一方、EPA はスフィンゴシルホスホリルコリン経路を介して Rho-kinase 活性化を抑制することも報告されている（Nakao F., et al. *Circ Res.* 2002;91:953-960）。

そこで本研究では、(1) EPA の長期投与が心筋虚血再灌流傷害を軽減するか否か、(2) その場合 Rho-kinase 経路抑制が関係するか否かをブタ in vivo モデルを用いて検証した。ブタ（雄、体重 25～30kg）を EPA 投与群と対照群の 2 群にわけた（各 n=8）。前者では EPA（600 mg/kg/日）を 21 日間投与した。22 日目にバルーンカテーテルを用いて左冠動脈回旋枝近位部を 90 分間閉塞させることで心筋虚血を惹起し、その後 60 分間の再灌流を行った。電気生理学的評価、左室造影による左室機能評価の後、標本を作製し組織学的検討（心筋障害、炎症細胞浸潤）を行った。また Western blotting 法により Rho-kinase と eNOS の活性を定量的に評価した。

本研究におけるブタ赤血球の細胞膜の EPA 濃度は、ヒトで長期に臨床用量の EPA を摂取した時の濃度と同等であった。EPA 投与群において、局所壁運動障害の改善、左室駆出率の改善、再灌流時の心室性不整脈発生頻度の減少、組織学的に炎症細胞浸潤の抑制が認められた。さらに、EPA 投与群では、虚血心筋の Rho-kinase 活性は有意に抑制され、eNOS の活性が有意に亢進していた。また、心筋の Rho-kinase 活性と eNOS 活性の間には有意な負の相関関係が認められた。

これらの結果より、EPA の長期投与は虚血再灌流障害を抑制することが明らかにされた。また、この EPA の心筋保護的効果には Rho-kinase 経路抑制が関与することが初めて示された。本研究は、虚血再灌流障害に対する EPA の心筋保護的効果や長期投与による Rho-kinase 阻害薬としての可能性を示した研究であり、博士（医学）の学位論文として相応と認める。