

東海大学大学院令和 4 年度博士論文

皮弁虚血再灌流傷害における

過酸化脂質の役割と

Ebselen による傷害抑制効果の検討

指導 赤松正 教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

黒木 堯比古

この学位論文は、acta histochemical et cytochemica に掲載された主要公刊論文を基に作成された。acta histochemical et cytochemica に掲載された主要公刊論文の一部を学位論文に用いることに加えて、学位論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

【総括】

皮弁移植術は再建外科手術において最も重要な手技の一つである。一方、移植された皮弁の 0.9-5.6% で皮弁全体もしくは部分的に壊死が起こることが報告されている。そのため皮弁の壊死を防ぎ、皮弁の生着率を改善することは、再建外科領域における大きな課題である。皮弁壊死の原因の一つに、虚血再灌流 (I/R) 傷害が挙げられる。I/R 傷害とは、一定時間虚血に曝された組織の血流が再開し血液が再灌流した際に新たに流入した酸素分子により、虚血そのものによる傷害に酸化ストレスが負荷され、より重篤な組織傷害が引き起こされることである。虚血再灌流により傷害された組織では脂質過酸化反応が亢進していることが判っており、また、この脂質過酸化反応が組織傷害を誘導する重要な因子となっている。

Protein kinase C (PKC) は、脂溶性の情報伝達物質である Diacylglycerol(DAG)によって活性化され、細胞増殖や発生、分化、アポトーシスをはじめとする様々な生体反応に関与している。DAG はそのグリセロール骨格中の 2 位の位置に酸化されやすい多価不飽和脂肪酸を有しており、酸化ストレスに曝された際には酸化され酸化型 DAG となることが推測される。我々は酸化型 DAG が未酸化の DAG に比較して約 3 倍の PKC 活性化作用を有する強力な PKC 活性化分子

となることを明らかにしている。また、過剰に活性化された PKC 分子が、酸化ストレスに関連する様々な疾患を増悪させることが報告されており、酸化型 DAG が酸化ストレスに起因する様々な病態の key 分子となりうると考えられる。皮弁の虚血再灌流傷害に酸化型 DAG の関与が示唆されるが、この点について検討はなされていない。

一方、生体内には酸化ストレス傷害を防御する抗酸化酵素システムが存在しており、過酸化脂質を還元消去する酵素としてグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPx4) が知られている。また、GPx4 は酸化型 DAG を還元消去する酵素作用を有していることが判っている。

Ebselen は分子内にセレン (Se) を含有する有機セレン化合物であり、GPx4 と同様の過酸化脂質還元消去能を有する抗酸化薬剤である。本研究ではラット皮弁虚血再灌流モデルを用いて、皮弁傷害における酸化型 DAG の役割とその分子メカニズムの解明を目指した。また、グルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有する ebselen の酸化型 DAG の還元消去作用および皮弁保護効果を検討した。

実験には SD 雄性ラットを使用し、左下腹壁に浅単径動静脈を栄養血管とする島状皮弁を作成した。皮弁を 6 時間虚血にした後、再灌流させて虚血再灌流皮弁モデルを作成した。Ebselen (100mg/kg) は、皮弁挙上手術の直前、再灌流 1 時間前、再灌流 6 時間後、さらにその後 12 時間おきに蒸留水 500 μ l に懸濁してゾンデを使用して経口投与した (I/R + ebselen 群)。また、対照群として同量の蒸留水を経口投与した。実験終了後、皮弁生存面積率の測定、酸化型 DAG の定量、免疫組織化学、組織学的解析を施行した。

I/R7 日後の皮弁生存面積率は、正常皮膚に比較して有意に低下した。また、I/R 後 vehicle を投与した群に比較して、ebselen を投与し

た群では皮弁生存面積率の有意な改善を認めた。酸化型 DAG の量は、I/R 後 1,6 時間において著明に増加し、ebselen 投与により有意に抑制された。虚血再灌流傷害を受けた皮弁では、リン酸化 PKC α 及び δ の免疫染色強度が正常皮膚に比べて有意に上昇した。リン酸化 PKC α の染色性は I/R 後 1, 6, 12 時間において増加し、ebselen 投与により有意に染色性は減弱した。リン酸化 PKC δ の染色性は I/R 後 6 時間において増加し、ebselen 投与により有意に染色性は減弱した。非リン酸化 PKC α 及び δ の染色性は、(I/R + vehicle) 群と (I/R + ebselen) 群の間に差は認められなかった。また、I/R 後 7 日において、好中球のマーカーである myeloperoxidase (MPO) の免疫染色性が増加するとともに、HE 染色で組織傷害が観察された。この MPO 染色性の増加と組織傷害は、ebselen の投与により抑制された。

以上の結果から、虚血再灌流により引き起こされた酸化ストレスを介して酸化型 DAG が産生され、この産生された酸化型 DAG により PKC α 及び δ 分子の過剰活性化が誘導されたものと考えられた。四塩化炭素を投与し酸化ストレス傷害を誘導した肝組織では、酸化型 DAG による PKC α の活性化とともに好中球浸潤が誘導され、その結果、肝組織傷害が亢進することが判明している。皮弁の虚血再灌流傷害においても同様に、酸化型 DAG による PKC 活性化が好中球浸潤を介した皮弁組織傷害を進行させたものと考えられた。Ebselen は酸化型 DAG を還元消去することにより、PKC 過剰活性化及び好中球浸潤を抑制し、皮弁を虚血再灌流傷害から防御しているものと推察された。本研究の結果から、ebselen が虚血再灌流傷害による皮弁壊死の予防・治療薬として有用である可能性が示された。

【研究の背景】

外傷や癌の手術等による組織の欠損に対して行われる再建術は、患者個人の社会への復帰を大きく左右し、Quality of life に関わる重要な術式であり、皮弁移植術による再建術は形成外科手術の中でも最も重要な手技の一つである。皮弁とは、血流のある皮膚と皮下組織や軟部組織であり、皮弁移植術は弾力やボリュームが求められる部位や、関節・腱・骨・人工物の露出部などの植皮ができない部位に用いられる。皮弁は、有茎皮弁と遊離皮弁に分類できる。有茎皮弁は、栄養血管を残したまま移植部位に移動する方法である。一方、遊離皮弁は、一度栄養血管を切り離して移植部位で顕微鏡下に血管吻合を要する方法である。そのため遊離皮弁は必ず一度虚血状態になり、血管吻合をすることで血流が再開されることとなる。遊離皮弁においては、10-15%で血管系の塞栓が起こり、0.9-5.6%で皮弁全体もしくは部分的に壊死が起こることが報告されており、皮弁の壊死を防ぎ、皮弁の生着率を改善することは、再建外科領域における大きな課題となっている。皮弁壊死の原因は主には2つあり、一つは動脈血の流入不足や静脈うっ滞などの血行に起因するもので、もう一つは、虚血再灌流(I/R)によるものである。

様々な臓器において一定時間虚血に曝された組織は、虚血そのものによる傷害に加えて、再灌流時に流入する新たな酸素分子を引き金として酸化ストレスが加わることにより、さらに重篤な組織傷害が引き起こされることが報告されている。この現象はI/R傷害と呼ばれており、虚血性心疾患、脳血管障害、消化器疾患、臓器移植後の病態として報告されている。これまでI/Rによる酸化ストレスと皮弁の壊死との関連について多くの報告がなされているが、傷害の起因分子や細胞

死に至るプロセスや分子機構の詳細は不明な点も多い。

虚血再灌流によって生成した活性酸素種は、生体内分子の酸化反応を介して細胞傷害を引き起こしているものと考えられている。生体分子の中でも二重結合を複数含む脂質である多価不飽和脂肪酸は特に酸化されやすい分子であり、この脂質分子の過酸化反応（脂質過酸化反応）が酸化ストレス傷害の中心的な役割を担っている。Protein kinase C (PKC) は、脂溶性の情報伝達物質である Diacylglycerol(DAG)により活性化され、細胞増殖や発生、分化、アポトーシスをはじめとする様々な生命現象の過程で重要な役割を果たしている。

竹腰らは *in vitro* において、酸化された DAG が native の DAG に比較してより強い PKC 活性化作用を有することを見出した。また、鳥海らは四塩化炭素を投与することにより酸化ストレスを誘導したラット肝臓において、酸化型 DAG が著明に増加するとともに PKC α が過剰活性化され、その結果、NF- κ B 活性化、TNF- α 発現が亢進し、炎症病態が増悪することを明らかにした。原口らは糖尿病性腎症において、酸化ストレスが NF- κ B シグナル伝達経路を介して糸球体や近位尿細管の細胞障害を引き起こすことを示している。さらに、竹腰らは四塩化炭素の長期投与により肝線維化を引き起こしたマウス肝臓において、酸化型 DAG の増加による PKC 分子の活性化とともに ERK、JNK のリン酸化と TIMP-1、TNF- α の発現増加が引き起こされ、肝線維化及び炎症反応が亢進していることを報告している。一方、PKC の活性化は慢性肝疾患や血液悪性腫瘍、脳血管障害といった酸化ストレスに関連する疾患を増悪させることも報告されてきている。これらのことから、酸化型 DAG は酸化ストレスに起因する病態のキー分子であることが示唆される。皮弁においても、I/R 傷害に酸

化型 DAG の増加が関与している可能性が考えられるが、この点について検討はなされていない。

生体内には酸化ストレス傷害を防御する抗酸化酵素システムが存在している。その抗酸化酵素の一つとしてグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) がよく知られている。多くの GPx は、その活性中心にセレン (Se) を含有しており、グルタチオン (GSH) の存在下において、過酸化脂質や過酸化水素を還元無毒化する作用を有する。GPx には以下に示すように細胞組織の局在性、基質特異性の異なる 8 つのアイソフォームの存在が知られている。GPx1 は様々な臓器・組織に広く分布し、細胞質やミトコンドリア内に局在する細胞内酵素で主に過酸化水素や脂肪酸ヒドロペルオキシドを還元する。GPx2 は胃腸の上皮細胞に特異的に発現しており、摂取した食餌に含まれる過酸化物に対する防御の役割を担うと考えられている。GPx3 は腎近位尿細管で合成され、血漿などの細胞外に存在する。GPx4 は過酸化リン脂質を還元する活性を持ち、細胞質、ミトコンドリア、核小体に局在している。GPx4 は過酸化リン脂質を還元して無毒化する作用を有する一方で、過酸化水素の還元性は低い。神林らは、過酸化リン脂質を還元する GPx4 が、酸化型 DAG を還元することを示した。GPx5 は、GPx4 とともに男性の生殖機能に関与しており、GPx7 は活性中心にセレンシステインの代わりにシステインを含有する特殊な GPx 分子であり、小胞体に局在し過酸化水素を基質としている。GPx8 は GPx7 と同様に小胞体に局在し過酸化水素還元活性を有している。GPx6 の機能はまだ不明である。様々な臓器において、活性酸素生成系と消去系のバランスが崩れることで酸化ストレス傷害が起こることが報告されている。特に動脈硬化や男性不妊は GPx の低下によるものであるこ

とが報告されている。

急性期脳梗塞の治療薬として開発された ebselen は、分子内にセレン (Se) を含有する有機セレン化合物であり、GPx4 と同様の酵素活性を有している。脳、精巣、腸管の虚血再灌流傷害、肺移植の動物モデルにおいて、いずれの臓器においても本薬剤の抗炎症効果が報告されている。

本研究ではラット皮弁 I/R モデルを用いて、皮弁組織傷害における酸化型 DAG の役割と分子メカニズムを解明することを目的とした。また、ebselen の酸化型 DAG 還元消去作用と、皮弁保護効果について検討を行った。

【考察と展望】

本研究により、虚血再灌流により生じた酸化型 DAG により PKC α 及び δ の過剰活性化が誘発され、その結果、皮弁組織に炎症反応（好中球浸潤）が惹起され組織傷害が生じたことが示された。さらに、ebselen を再灌流前から投与することによって、再灌流後早期に発生する酸化型 DAG と、それによって活性化されたリン酸化 PKC α 及び δ の発現量を有意に抑制し、結果として虚血再灌流 7 日後の皮弁壊死を抑えられることが判明した。これらの知見から、ebselen が虚血再灌流傷害を原因とする皮弁壊死の予防薬として使用できる可能性が初めて示された。神林らは、ヒトの好中球を用いた実験において、酸化型 DAG が PKC 活性化を介して好中球の活性化を誘導していることを報告している。また、鳥海らは、酸化ストレスを誘導したラット肝臓を用いた実験において、酸化型 DAG が増加することにより PKC α の過剰活性化が起こり、NF- κ B の活性化、TNF- α の産生増加を介して炎症反応が増

悪することを示している。これらのことから本研究において、酸化型 DAG の増加による PKC の活性化が好中球の浸潤を誘導し、皮弁の組織傷害を引き起こしたものと考えられた。

これまでに、動物実験モデルを用いた皮弁虚血再灌流傷害の検討が数多く報告されている。Angel らは、虚血再灌流を起こした皮弁組織において、活性酸素の産生とともに脂質過酸化物の分解産物の一つである malondialdehyde が上昇することを示し、皮弁における虚血再灌流傷害と脂質過酸化反応との関連性について報告している。また、Han らは虚血再灌流を起こした皮弁では、NF- κ B の活性化を介して、TNF- α が産生されることを明らかにしている。さらにラットを用いた動物実験では、ビタミン C などの抗酸化剤の投与、鉄キレート剤である deferoxamine の投与、superoxide dismutase、アロプリノール投与により皮弁の生着率を上昇させることが判ってきている。また、Personelle らは形成外科手術を施行した後、抗酸化物質であるビタミン C および E を 15 日間局注することにより、壊死しかけた部位が改善することを報告している。このように、皮弁の虚血再灌流において、酸化ストレスの関与は以前から指摘されているものの、詳細な分子メカニズムは明らかにされていなかった。また、これまでに皮弁の虚血再灌流傷害を抑える薬剤による実験が多数報告されてきたが、一般的な実臨床応用には至っていない。本研究では、皮弁の虚血再灌流傷害が引き起こされた部位では、過酸化脂質の一種である酸化型 DAG が虚血再灌流の初期に増加し、ebselen により酸化型 DAG を還元消去することによって組織傷害が抑制されることを示した。これらのことより、酸化型 DAG が皮弁の組織傷害の key mediator となることが強く示唆された。

本研究で用いた ebselen は、過酸化脂質還元消去作用を持つ低分子量抗酸化物質である。本研究により、ebselen が酸化型 DAG を還元消去することにより、皮弁の虚血再灌流傷害を抑制し、皮弁生存面積率が改善されたものと考えられ、本薬剤の皮弁治療薬としての可能性が示唆された。本邦において、ebselen はヒトにおける第Ⅲ相試験の結果、急性期脳梗塞患者に対しての治療有効性、安全性が示されている⁴⁷。また、ebselen はアメリカ国立衛生研究所（NIH）で人体に対する安全性が認められており、最近では双極性障害に対する治療薬として研究が進められ、ラットを使用した動物モデルにおいて有用性が示されている。これは、双極性障害患者は躁状態において、血小板中の PKC の活性が増加していることが指摘されており、ebselen により PKC の活性化を抑制することで効果があると考えられる。

本研究では HPLC による酸化型 DAG の定量と、免疫組織化学による PKC のリン酸化（活性化）の量的な評価を実施し、虚血再灌流によって酸化型 DAG の増加に伴って PKC が活性化されることを明らかにした。一方、PKC の活性化に関して、皮弁組織全体を用いたウェスタンブロッティングによる生化学的な検証を試みたが、活性化の指標となるリン酸化 PKC 分子の検出は出来なかった。その原因としては、PKC のリン酸化が誘導された部位が表皮と真皮の一部に限局されており、組織全体の中ではリン酸化 PKC の量が極少量あったことが一因ではないかと推測された。そこで本研究の免疫組織化学に用いた PKC α 、PKC δ 、リン酸化 PKC α 、リン酸化 PKC δ に対する抗体の特異性を検証するために、PKC α 及び δ の活性化（リン酸化）が亢進していることが判っている四塩化炭素投与により傷害を受けたマウス肝組織を用いてウェスタンブロッティングを施行した。その結果、本

研究で用いた抗体によりリン酸化された PKC α 及び δ が検出されることが認め、また、四塩化炭素を投与し酸化ストレスを誘導したマウス肝組織では、より強いバンドが検出された。一方、リン酸化されていない PKC α 及び δ のバンドも明瞭に観察されたが、四塩化炭素による発現変化は認められなかった。これらの結果から、本研究で用いた抗リン酸化 PKC 抗体及び非リン酸化 PKC 抗体の特異性が確認され、本研究で用いられた手法（リン酸化 PKC の免疫組織化学による検出）の妥当性が確認できたものと考えられた。

本研究では、ラット皮弁虚血再灌流傷害の機序として酸化型 DAG の役割を示し、ebselen 投与により酸化型 DAG を還元消去することで傷害を抑制しうることを示した。現在のところヒトの皮弁組織における酸化型 DAG および PKC の活性化に関する情報は得られておらず、本薬剤の虚血再灌流抑制効果は不明である。今後、ヒト組織を用いて酸化型 DAG 及び PKC 活性化の動態について詳細な検討を加えることにより、ebselen の臨床応用を目指したい。

【結論】

虚血再灌流により皮弁中の酸化型 DAG 量は増大し、PKC α 及び δ の活性化が誘導され、それが引き金となり、皮膚壊死を起こすことが示された。さらに、ebselen を再灌流前から投与することによって、再灌流後早期に発生する酸化型 DAG 及びリン酸化 PKC α 、リン酸化 PKC δ の発現量を有意に抑制し、虚血再灌流 7 日後の皮弁壊死を抑えられることが判明した。これらの知見より、ebselen が虚血再灌流傷害による皮弁壊死の治療あるいは予防薬として臨床応用できる可能性があると考えられた。