

氏 名 やましたしげゆき
山下 重幸

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 260 号

学位授与年月日 平成 30 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

**Cardioprotective and Functional Effects of Levosimendan
and Milrinone in Mice with Cecal Ligation and
Puncture-Induced Sepsis**

(盲腸結紮穿孔誘発性敗血症マウスにおける, レボシメンダン
とミルリノンの心保護作用および強心作用に関する薬理学的
研究)

論文審査委員

(主査)	教授	絹川 弘一郎
(副査)	教授	田村 了以
(副査)	教授	西田 尚樹
(副査)	教授	山崎 光章
(指導教員)	教授	芳村 直樹

論文内容の要旨

〔目的〕

敗血症は、高齢者人口の増加、多剤耐性菌の出現などにより症例数は増加しており、現在においてもなお高い死亡率を有している。敗血症の定義はこれまで、「感染によって引き起こされた全身性炎症反応症候群」とされてきたが、2016年に「感染に対する制御不能な宿主反応による生命に関わる臓器不全」として15年ぶりに改訂された。新しい定義における「臓器不全」には、急性肺傷害、播種性血管内凝固、脳症、肝・腎障害に加え、心機能障害も含まれる。特に心機能障害は、それにより酸素の需要・供給バランスが損なわれ、多臓器不全の進展につながることから、敗血症の予後に非常に重要である。国際敗血症ガイドラインで、敗血症性ショックにおいて推奨されている強心薬はドブタミンであるが、その臨床成績には限界が指摘されている。

本研究の目的は、敗血症モデルである盲腸結紮穿孔刺(CLP)施行 BALB/C 雄性マウスに対し、Ca²⁺感受性増強薬であるレボシメンダンおよびホスホジエステラーゼ III 阻害薬であるミルリノンに対する反応性を *in vivo* および *ex vivo* で評価し、敗血症における心機能障害に対するこれらの薬剤の治療効果を検討することである。

〔方法並びに成績〕

本研究では、CLP を施行した BALB/C 雄性マウスに対し、レボシメンダンおよびミルリノンを 0.5 µg/kg/min で持続投与し、心臓および血液サンプルを採取した。CLP 敗血症マウス(CLP 群)、レボシメンダン投与 CLP 敗血症マウス(Levo.群)、ミルリノン投与 CLP 敗血症マウス(Milr.群)では、心筋の炎症性サイトカイン、ケモカインである TNF α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 の mRNA 発現量が開腹のみを行った Sham 群と比較して有意に上昇したが、Levo.群は CLP 群と比較して、TNF α 、IL-6、MCP-1 の上昇が有意に抑制された。しかし、Milr.群では CLP 群と比較して、TNF α 、IL-1 β 、MCP-1 が有意に上昇した。心臓組織のミエロペルオキシダーゼ染色については、CLP 群および Milr.群は、Sham 群と比較して陽性細胞数の有意な増加を認め、さらに、Milr.群は CLP 群と比較して有意に増加した。Levo.群では CLP 群と比較して有意に減少した。一方、血漿における心筋障害の指標・血漿トロポニン I (cTnI) および心臓由来脂肪酸結合蛋白 (H-FABP) を ELISA で測定したところ、CLP 群は Sham 群と比較して有意な上昇を認めたが、Levo.群および Milr.群ではそれらの上昇が有意に抑えられた。

Akt は細胞の生存、分化を制御する serine/threonine kinase であるが、Western blot 法を用いて心筋組織における Akt (Ser-473)リン酸化を調べたところ、CLP 群は Sham 群と比較して有意な変化を認めなかったが、Milr.群で Akt のリン酸化レベルの有意な増加を認めた。この効果は Levo.群では認めなかった。

次に小動物用超音波イメージング装置を用い、*in vivo* で心機能を評価した。Sham 群との比較では CLP 群は左室内径短縮率 (FS)、左室駆出率 (EF) に変化はなかった。レボシメンダンの低用量 (0.01 mg/kg) 静脈内投与では Sham 群において FS、EF が上昇したのに対し、CLP 群では有意な上昇を認めなかった。心拍数 (HR) は Sham 群、CLP 群でともに有意な変化はなかつ

た。一方、ミルリノン投与においては両群で HR、FS および EF が上昇した。

Langendorff 装置による ex vivo の実験では、ミルリノン投与により、Sham 群と比較し CLP 群で心機能の有意な改善を認めたが、レボシメンダン投与では Sham 群と比較し CLP 群で心機能の改善効果は有意に低下した。

最後にパッチクランプ法により、L 型 Ca^{2+} チャネルによる I_{Ca} (カルシウム電流) を、Sham および CLP 敗血症マウスから採取した単一心室心筋細胞で記録した。 I_{Ca} は Sham 群と CLP 群間に有意な差を認めなかった。レボシメンダンの投与 (0.3 および $3 \mu\text{M}$) により、いずれの群でも無投与に比べ I_{Ca} の有意な増加を認めた。一方、ミルリノンの投与 ($3 \mu\text{M}$) による I_{Ca} 増加は小さく、CLP 群の $10 \mu\text{M}$ 投与でのみ有意な増加が見られた。

[総括]

レボシメンダンは、CLP 誘発性敗血症マウスの心筋において、有意に炎症を抑え、これにより心筋保護効果を持つと考えられる。しかし、心筋細胞の I_{Ca} を増加させるものの、心機能障害に対して強心効果は認めなかった。一方、ミルリノンは、心機能障害に対して強心作用を認めたが、血漿中の cTnI や H-FABP の正常化、心筋組織の Akt のリン酸化レベル増加から、心筋保護効果は期待できるものの、心筋組織の炎症反応増悪も認めた。ミルリノンが敗血症において、急性肺障害など全身性の炎症を増悪させるかどうかは今後の研究の課題である。

学位論文審査の要旨

【目的】

敗血症は、高齢者人口の増加、多剤耐性菌の出現などにより症例数は増加しており、現在においてもなお高い死亡率を有している。敗血症の定義はこれまで、「感染によって引き起こされた全身性炎症反応症候群」とされてきたが、2016年に「感染に対する制御不能な宿主反応による生命に関わる臓器不全」として15年ぶりに改訂された。新しい定義における「臓器不全」には、急性肺傷害、播種性血管内凝固、脳症、肝・腎障害に加え、心機能障害も含まれる。特に心機能障害は、それにより酸素の需要・供給バランスが損なわれ、多臓器不全の進展につながることから、敗血症の予後に非常に重要である。国際敗血症ガイドラインで、敗血症性ショックにおいて推奨されている強心薬はドブタミンであるが、その臨床成績には限界が指摘されている。

そこで、山下氏は本研究において、敗血症モデルである盲腸結紮穿孔刺(CLP)施行BALB/C雄性マウスに対し、Ca²⁺感受性増強薬であるレボシメンダンおよびホスホジエステラーゼIII阻害薬であるミルリノンに対する反応性をin vivoおよびex vivoで評価し、敗血症における心機能障害に対する新たな治療選択枝となりうるか、これらの薬剤の治療効果を検討した。

【方法並びに成績】

CLPを施行したBALB/C雄性マウスに対し、レボシメンダンおよびミルリノンを0.5 μg/kg/minで持続投与し、心臓および血液サンプルを採取した。CLP敗血症マウス(CLP群)、レボシメンダン投与CLP敗血症マウス(Levo.群)、ミルリノン投与CLP敗血症マウス(Milr.群)では、心筋の炎症性サイトカイン、ケモカインであるTNF α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1のmRNA発現量が開腹のみを行ったSham群と比較して有意に上昇したが、Levo.群はCLP群と比較して、TNF α 、IL-6、MCP-1の上昇が有意に抑制された。しかし、Milr.群ではCLP群と比較して、TNF α 、IL-1 β 、MCP-1が有意に上昇した。心臓組織のミエロペルオキシダーゼ染色については、CLP群およびMilr.群は、Sham群と比較して陽性細胞数の有意な増加を認め、さらに、Milr.群はCLP群と比較して有意に増加した。Levo.群ではCLP群と比較して有意に減少した。一方、血漿における心筋障害の指標・血漿トロポニンI(cTnI)および心臓由来脂肪酸結合蛋白(H-FABP)をELISAで測定したところ、CLP群はSham群と比較して有意な上昇を認めたが、Levo.群およびMilr.群ではそれらの上昇が有意に抑えられた。Aktは細胞の生存、分化を制御するserine/threonine kinaseであるが、Western blot法を用いて心筋組織におけるAkt(Ser-473)リン酸化を調べたところ、CLP群はSham群と比較して有意な変化を認めなかったが、Milr.群でAktのリン酸化レベルの有意な増加を認めた。この効果はLevo.群では認めなかった。

次に小動物用超音波イメージング装置を用い、in vivoで心機能を評価した。Sham群との比較ではCLP群は左室内径短縮率(FS)、左室駆出率(EF)に変化はなかった。レボシメンダンの低用量(0.01 mg/kg)静脈内投与ではSham群においてFS、EFが上昇したのに対し、

CLP 群では有意な上昇を認めなかった。心拍数 (HR) は Sham 群、CLP 群でともに有意な変化はなかった。一方、ミルリノン投与においては両群で HR、FS および EF が上昇した。Langendorff 装置による ex vivo の実験では、ミルリノン投与により、Sham 群と比較し CLP 群で心機能の有意な改善を認めたが、レボシメンダン投与では Sham 群と比較し CLP 群で心機能の改善効果は有意に低下した。

最後にパッチクランプ法により、L 型 Ca^{2+} チャンネルによる I_{Ca} (カルシウム電流) を、Sham および CLP 敗血症マウスから採取した単一心室心筋細胞で記録した。 I_{Ca} は Sham 群と CLP 群間に有意な差を認めなかった。レボシメンダンの投与 (0.3 および 3 μM) により、いずれの群でも無投与に比べ I_{Ca} の有意な増加を認めた。一方、ミルリノンの投与 (3 μM) による I_{Ca} 増加は小さく、CLP 群の 10 μM 投与でのみ有意な増加が見られた。

【総括】

本研究において山下氏は Ca^{2+} 感受性増強薬レボシメンダンが CLP 誘発性敗血症マウスの心筋において、強心効果は認めないものの、有意に炎症を抑え、心筋保護効果を持つ可能性を示した。レボシメンダンによる抗炎症効果は他臓器について過去に報告があるものの心筋において初めて明らかにした点は新規性がある。一方、ホスホジエステラーゼ III 阻害薬ミルリノンは、有意な強心作用を呈したが、心筋組織の炎症反応増悪を認めた。しかしながら、このミルリノンによる炎症増強作用は Akt などの細胞生存に働く経路の活性化により代償されると考えられ、心筋傷害のマーカーは低下した。このようにそれぞれの薬剤が心保護作用を呈するメカニズムを検討したことは医学における学術的重要性が高い。さらに、心筋組織に強い炎症を伴い心機能低下を惹起する敗血症性ショックは難治性であることが多いが、レボシメンダンは炎症の抑制、ミルリノンは強心作用を呈することで、特に両薬剤の併用が治療に有用である可能性を示唆したことで、臨床的発展性が期待できると考えられる。

以上より本審査委員会は本論文を博士 (医学) の学位に十分に値するものと判定した。