Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Free-radical scavenger edaravone inhibits both formation and development of abdominal aortic aneurysm in rats

Morimoto, Keisuke

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2014-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6063号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006063

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Free-radical scavenger edaravone inhibits both formation and development of abdominal aortic aneurysm in rats

フリーラジカルスカベンジャーエダラボンは ラット腹部大動脈瘤の形成および進展を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
心臓血管外科学

（指導教員：大北　裕教授）

森本　圭介

（背景）

腹部大動脈瘤は、大動脈壁の変性による大動脈径の拡大を特徴とし最終的に破裂し死に至る可能性がある。現在、外科的手術や血管内治療を除いた有効な治療法はまだない。

腹部大動脈瘤は多くの因子が関与しており、その病態は完全には解明されていない。組織学的には炎症細胞の浸潤とエラスチンの破壊、血管平滑筋細胞の減少を特徴とする。近年、炎症と酸化ストレスの関与が報告されている。活性酸素種（ROS）は炎症細胞により産生され、過剰なROSによる酸化ストレスは大動脈壁の破壊と再生のバランスを崩し炎症反応を増幅させると考えられている。

臨床における腹部大動脈瘤に対する有効な薬物療法は確立されていないが、実験研究における遺伝子および薬物によるROSの産生阻害による腹部大動脈瘤形成効果は報告されている。エダラボンは強力なフリーラジカルスカベンジャー作用を有し、脳梗塞治療薬として承認されている。動物実験において、動脈を含む多くの組織で酸化ストレスに対する保護効果を有することも報告されている。今回我々は、エダラボンが腹部大動脈瘤の形成および拡大を抑制するか検討した。

（方法）

以前我々が報告したラット腹部大動脈瘤モデル(N=42)を使用した。正中切開により腹部大動脈を露出した後、大腿動脈から挿入したカテーテルよりエラスターゼを作用させると同時に塩化カルシウムを含ませたガーゼを外膜側より作用させ動脈瘤を作成した。

1N 水酸化ナトリウムス水溶液にエダラボンを溶解させ、1N 塩酸を加え pH7 となるように調整した。本邦において臨床使用されている 1mg/kg を低用量とし、また 5mg/kg を高用量とした。低用量群（Group LD）と高用量群（Group HD）、生理食塩水を投与するコントロール群（Group C）の 3 群に無作為に分類し、動脈瘤作成 30 分前から 1 日 2 回腹腔内への投与を開始した。動脈瘤作成 7 日後および 28 日後に動脈瘤形成抑制効果を比較検討し、動脈瘤作成 7 日後から 5mg/kg の高用量エダラボンの投与を開始し 28 日後に動脈瘤拡大抑制効果を検討した（Group DA）。

最大短径で規定される大動脈瘤径と中枢側の正常動脈径を顕微鏡下

に測定し、以下の式で求められる拡大率を算出した：(拡大率＝{大動脈瘤径／正常動脈径+1}×100)。病理組織学的検査では、ヘマトキシリンエオジン染色に加えエラスチカファンギーソン染色およびタネル染色を用い比較検討した。内膜から最外層の中膜弾性線維までの距離を大動脈壁厚とし、また大動脈壁に対するエラスチン染色部の割合をエラスチン含有率として算出した。浸潤細胞の評価に CD3 およびサンカストレスマーカーである 8-OHdG 免疫染色も施行した。次に凍結切片を用いジヒドロエチジウム染色にて大動脈瘤壁における ROS の発現を検討した。染色された面積とその蛍光強度の積を求め、未処置のラット大動脈壁における値に対する相対値を用いて半定量評価した。また、PCR 法にて炎症性サイトカイン TNF-αおよび IL-1βと動脈瘤の病態に深く関与している MMP-2 および 9 の発現を調べた。

（結果）

手術関連死亡はなく、全てのラットはエンドポイントまで生存した。28 日後、エダラボンは用量依存性に腹部大動脈瘤の形成を有意に抑制した（156.5±6.6% in Group LD, 136.7±2.0% in Group HD, 204.7±16.0% in Group C)。大動脈壁厚（131.3±16.7μm in Group LD, 141.8±16.6μm in Group HD, 115.4±11.1μm in Group C）およびエラスチン含有率（10.1±0.7% in Group LD, 12.4±0.7% in Group HD, 7.8±0.6% in Group C）も用量依存性に減少が抑制された。

7 日後、動脈瘤壁における ROS の発現は用量依存性に有意に抑制され（3.0±0.5 in Group LD, 1.7±0.3 in Group HD, 4.8±0.7 in Group C)、DNA の酸化生成物である 8-OHdG 陽性細胞数も同様に減少した（106.2±7.8 cells in Group LD, 64.5±7.7 cells in Group HD, 136.6±7.4 cells in Group C)。酸化ストレスと密接な関係にあるアポトーシスと炎症細胞を検討した。TUNEL 染色を用いたアポトーシスの検討では陽性細胞数は有意に抑制された（74.2±11.7 cells in Group LD, 49.2±5.1 cells in Group HD, 180.7±11.1 cells in Group C)。炎症細胞、特に CD3 免疫陽性細胞の大動脈瘤壁への浸潤も減少した（17.7±3.1 cells in Group LD, 4.0±1.3 cells in Group HD, 78.5±9.9 cells in Group C)。慢性炎症と過剰な MMP の産生が、動脈瘤壁のリモデリングに関与していることから PCR 法を用いた TNF-αと IL-1β、MMP-2 と MMP-9 の mRNA 発現も抑制されていた。

臨床において腹部大動脈瘤は既に形成された状態で診断されるため、動脈瘤形成後にエダラボンの投与を開始し、その拡大抑制効果を検討した。28 日後、拡大率はコントロール群に対し有意に低く（153.1±11.6 % in Group DA, 204.7±16.0 % in Group C)、更には投与開始前と比べ更なる拡大が抑制されていた（155.2±2.9 % at day 7, 153.1±11.6 % at day 28)。大動脈壁厚はコントロール群に対し統計学的有意差は認めなかったが厚く（129.8±16.2μm in Group DA, 115.4±11.1μm in Group C)、エラスチン含有率は有意に増加した（10.3±0.7% in Group LD, 7.8±0.6% in Group C)。

（考察）

フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンは、炎症細胞浸潤を抑制し ROS による組織障害やサイトカイン、MMP を減少させ、腹部大動脈瘤形成を抑制した。また、既に形成された動脈瘤の更なる拡大も抑制した。

ROS はシグナル伝達に重要な役割を果たす一方、動脈瘤壁における過剰な発現が報告されている。過剰な ROS は、MMP の活性化や炎症反応を惹起し、中膜のエラスチンの減少や大動脈壁の菲薄化を招き動脈瘤の形成に大きく関わる。本研究において、動脈瘤の形成と ROS 発現および DNA 酸化生成物 8-OHdG の増加の関与が示された。大動脈瘤壁におけるアポトーシスと T リンパ球浸潤、TNF-αと IL-1β、MMP-2 と MMP-9 の発現は増加しており、我々が用いたラット腹部大動脈瘤モデルにおいて ROS が決定的な役割を担っていることが示された。

大動脈瘤形成は、理論的に抗酸化作用により阻害される。近年、アポサイニンやビタミン E などの抗酸化物質が腹部大動脈瘤の形成を竿害することが報告された。エダラボンは、フリーラジカルスカベンジャーとして脳梗塞治療に臨床使用されており、経口投与によりフリーラジカルの産生を阻害することが示されている。心臓血管領域では、脊髄虚血モデルにおいてエダラボンが術後の組織障害を減少させることが認められている。本研究でも腹部大動脈瘤形成過程における強力な ROS スカベンジャー作用が認められた。エダラボン投与による ROS 除去により DNA 酸化生成物、中膜エラスチンの減少、アポトーシス、TNF-α、

IL-1β、MMP-2、MMP-9のmRNA発現を抑制した。腹部大動脈瘤形成におけるMMP-2、MMP-9の重要性、ROSが血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。これらの研究結果は、エダラボンが抗酸化作用を介し動脈の拡大を抑制したことを強く示唆する。

エダラボンが既に形成された腹部大動脈瘤の更なる拡大を抑制したことは、本研究の興味深い結果である。臨床において腹部大動脈瘤は既に形成された状態で発見されるため、薬物療法により動脈瘤を縮小させるかどうか検討することは非常に重要である。効果的な薬物療法は小さな動脈瘤や全身状態が悪く手術適応のない症例に有益である。

（結論）

本研究において、エダラボンはROSを阻害することにより腹部大動脈瘤の形成を抑制するだけではなく更なる拡大を抑制することが示された。エダラボンは、まだ確立されていない腹部大動脈瘤に対する治療薬としての可能性が示唆される。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2425 号	氏 名	森本 圭介
論文題目 Title of Dissertation	Free-radical scavenger edaravone inhibits both formation and development of abdominal aortic aneurysm in rats フリーラジカルスカベンジャーエダラボンは ラット腹部大動脈瘤の形成および進展を抑制する		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 井田健一 副 査 Vice-examiner 匂坂敏朗 副 査 Vice-examiner 横崎宏		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

（背景）

腹部大動脈瘤は多くの因子が関与しており、その病態は完全には解明されていない。臨床における腹部大動脈瘤に対する有効な薬物療法は確立されていないが、実験研究における遺伝子および薬物による ROS の産生阻害による腹部大動脈瘤形成効果は報告されている。エダラボンは強力なフリーラジカルスカベンジャー作用を有し、脳梗塞治療薬として承認されている。動物実験において、動脈を含む多くの組織で酸化ストレスに対する保護効果を有することも報告されている。申請者らは、エダラボンが腹部大動脈瘤の形成および拡大を抑制するか検討した。

（方法）

正中切開により腹部大動脈を露出した後、大腿動脈から挿入したカテーテルよりエラスターゼを作用させると同時に塩化カルシウムを含ませたガーゼを外膜側より作用させ動脈瘤を作成した。

1N 水酸化ナトリウムス水溶液にエダラボンを溶解させ、1N 塩酸を加え pH7 となるように調整した。本邦において臨床使用されている 1mg/kg を低用量とし、また 5mg/kg を高用量とした。低用量群（Group LD）と高用量群（Group HD）、生理食塩水を投与するコントロール群（Group C）の 3 群に無作為に分類し、動脈瘤作成 30 分前から 1 日 2 回腹腔内への投与を開始した。動脈瘤作成 7 日後および 28 日後に動脈瘤形成抑制効果を比較検討し、動脈瘤作成 7 日後から 5mg/kg の高用量エダラボンの投与を開始し 28 日後に動脈瘤拡大抑制効果を検討した（Group DA）。

最大短径で規定される大動脈瘤径と中枢側の正常動脈径を顕微鏡下に測定し、以下の式で求められる拡大率を算出した：(拡大率＝{大動脈瘤径／正常動脈径+1}×100)。病理組織学的検査では、ヘマトキシリンエオジン染色に加えエラスチカファンギーソン染色およびタネル染色を用い比較検討した。内膜から最外層の中膜弾性線維までの距離を大動脈壁厚とし、また大動脈壁に対するエラスチン染色部の割合をエラスチン含有率として算出した。浸潤細胞の評価に CD3 および酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 免疫染色も施行した。次に凍結切片を用いジヒドロエチジウム染色にて大動脈瘤壁における ROS の発現を検討した。染色された面積とその蛍光強度の積を求め、未処置のラット大動脈壁における値に対する相対値を用いて半定量評価した。また、PCR 法にて炎症性サイトカイン TNF-α および IL-1β と動脈瘤の病態に深く関与している MMP-2 および 9 の発現を調べた。

（結果）

エダラボンは用量依存性に腹部大動脈瘤の形成を有意に抑制した。大動脈壁厚およびエラスチン含有率も用量依存性に減少が抑制された。

7日後、動脈瘤壁におけるROSの発現は用量依存性に有意に抑制され、DNAの酸化生成物である8-OHdG陽性細胞数も同様に減少した。酸化ストレスと密接な関係にあるアポトーシスと炎症細胞を検討した。TUNEL染色を用いたアポトーシスの検討では陽性細胞数は有意に抑制された。炎症細胞、特にCD3免疫陽性細胞の大動脈瘤壁への浸潤も減少した。慢性炎症と過剰なMMPの産生が、動脈瘤壁のリモデリングに関与していることからPCR法を用いたTNF-αとIL-1β、MMP-2とMMP-9のmRNA発現も抑制されていた。

臨床において腹部大動脈瘤は既に形成された状態で診断されるため、動脈瘤形成後にエダラボンの投与を開始し、その拡大抑制効果を検討した。28日後、拡大率はコントロール群に対し有意に低く更には投与開始前と比べ更なる拡大が抑制されていた。大動脈壁厚はコントロール群に対し統計学的有意差は認めなかったが厚く、エラスチン含有率は有意に増加した。

（考察）

大動脈瘤形成は、理論的に抗酸化作用により阻害される。本研究でも腹部大動脈瘤形成過程における強力なROSスカベンジャー作用が認められた。エダラボンが既に形成された腹部大動脈瘤の更なる拡大を抑制したことは、本研究の興味深い結果である。臨床において腹部大動脈瘤は既に形成された状態で発見されるため、薬物療法により動脈瘤を縮小させるかどうか検討することは非常に重要である。効果的な薬物療法は小さな動脈瘤や全身状態が悪く手術適応のない症例に有益である。

（結論）

本研究は、エダラボンはROSを阻害することにより腹部大動脈瘤の形成を抑制するだけではなく更なる拡大を抑制することが明らかにし、エダラボンが腹部大動脈瘤に対する治療薬としての可能性が示した価値ある研究であると認める。よって本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。