



# Endogenous superoxide dismutase Activation by Oral Administration of Riboflavin Reduces Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Rats

Yu, Zhenhai

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6458号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006458>

※ 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

Endogenous superoxide dismutase Activation by Oral Administration of  
Riboflavin Reduces Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Rats

リボフラビンの経口投与によって内因性スーパーオキシドジスムターゼの  
活性化はラットの腹部大動脈瘤の形成を削減する

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)

魚 振海

(背景)

腹部大動脈瘤は、大動脈壁の慢性変性疾患で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、手術や血管内治療以外有効な治療法はまだない。

腹部大動脈瘤は多く因子があり、完全には解明されてない。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。炎症と酸化ストレスの関して多く報告されている。活性酸素種（ROS）は炎症細胞により産生され、過剰なROSにより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大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して有効な薬治療方法は確立されていないが、動物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。リボフラビン（ビタミンB<sub>2</sub>）はSOD（スーパーオキシドジスムターゼ）に作用され、糖尿病性心筋症と、心臓同種移植片血管障害に対して有益な効果を有することが報告されている。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、リボフラビンが腹部大動脈瘤の形成および拡大を削減するか検討した。

(方法)

以前我々が報告したラットの腹部大動脈瘤モデル（N=36）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トマ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。

濃度 0.5%のCMC水溶液にリボフラビンを溶解させ、25mg/kg（Group R）をとし、CMCを経口投与するコントロール群（Control）の2群に無作為に分類し、動脈瘤作成3日前から1日1回経口投与を開始した。動脈瘤作成3日、7日、28日後に動脈瘤形成抑制効果を検討した。28日の動脈瘤は形成後経口投与2つで行った。

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）。動脈瘤の操作前後、ラットの血圧（BP-98A; Softron Co. Ltd, Tokyo, Japan）によって測定し、3日目ラットの大動脈瘤壁から1mgを氷の上でホモジネートし、KSD-005Wキット証明によってSODを測定した。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単性繊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。次に凍結切片を用い炎症細胞の平価にCD68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。ジヒドロエチジウム染色にて大動脈瘤壁におけるROSの発現を検討し壁における値に対する相対値を用いて半定量平価した。ウェスタンブロットは動脈瘤の血管を氷の上でホモジネートして濃度測って、40μg濃度でP-ERKとT-ERK測定し、β-actin用いて定量平価した。また、PCR法にて炎症性サイトカインTNF-αおよび動脈瘤の病態に深く関与しているMMP-2、MMP-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(3日前から経口投与群)後、リボフラビンは投与依存性に腹部大動脈瘤の形成を有意に抑制した。(194.9±10.9% in Control, 158.6±2.5% in Group R)。およびエラスチン含有率(16±0.9% in Normal, 7.9±0.5% in Control, 11.3±0.7% in Group R)も投与依存性に減少が抑制された。28日(動脈瘤作ってから投与)後、拡大率(181.5±13.1% in Control, 154.2±4.1% in Group R)も投与依存性に抑制された。

7日後、動脈瘤壁におけるROSの発現は投与依存性に有意に抑制され(1.0±0.1 in Normal, 4.5±0.4 in Control, 3.1±0.5 in Group R)、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(30±2 cells in Normal, 148±20 cells in Control, 109±15 cells in Group R)酸化ストレスと密接な関係にある炎症細胞を検討した。炎症細胞、特にCD68免疫陽性細胞の大動脈瘤壁への浸潤も減少した。

(0.7±1.0 cells in Normal, 73.2±8.6 cells in Group C and 57.9±2.9 cells in Group R)。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MMP-2とMMP-9のmRNA発現も抑制されていた。炎症性サイトカインであるERK経路投与依存性に有意に抑制された。3日後、ROSと密接な関係があるSODも投与依存性に有意に増加した(370±204 U/mL in Normal, 334±86 U/mL in Control, 546±143 U/mL in Group R)。血圧を測った結果SBP(125.5±4.4 mmHg in Normal, 125.9±6.6 mmHg in Control, 127.9±8.0 mmHg in Group R) and DBP(94.5±4.6 mmHg in Normal, 96.1±5.9 mmHg in Control, 95.5±7.7 mmHg in Group R)リボフラビン血圧に影響はなかった。

#### (考察)

フリーラジカル損傷に対する重要な抗酸化防御システムの一つであるSODは炎症細胞及び他の加齢に関連する苦痛を阻害する。ROSによる組織障害やサイト

カイン、MMPとERKを減少させ、腹部大動脈瘤形成を抑制した。また、形成された動脈瘤の更なる拡大も抑制した。我々の研究では、リボフラビン処置後のSOD活性はERKの減少を介して、炎症反応およびマトリックスの変性を防止すROSレベルを抑制した。リボフラビンは、ERK経路がAAAの形成中の炎症反応およびMMPの重要な調節因子であることを示唆し、t-ERKおよびp-ERKの両方を阻害した。

この研究は、確認応答に値するいくつかの制限があります。最初の制限は、実験は、ラットAAAモデルを用いて行ったということである。このAAAモデルはシンプルで生成することが容易で、高い信頼性と再現性があるが、それはアテローム性動脈硬化症や管腔内血栓症のようなヒトの病変のいくつかの顕著な特徴がないため、それは完全に模倣しない人間のAAAを行います。第二の制限は、シグナル伝達にリボフラビンの効果の分析の欠如である。リボフラビンの他の用量をテストするためにさらなる研究がシグナル伝達に及ぼす影響を解明し、AAA形成の予防におけるその有効性と安全性のバランスを評価するために必要とされる。

結論として、本研究では、リボフラビンが内因性SODを作成する抗酸化作用を介して、AAAのラットモデルにおいて動脈瘤形成を減衰し、臨床診療においてAAAの治療のための有効な経口薬剤かもしれないことを実証した。

#### (結論)

本研究において、リボフラビンは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なく更なる拡大を抑制することが示された。リボフラビンは、また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が示される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2522 号	氏 名	魚 振海
論文題目 Title of Dissertation	Endogenous superoxide dismutase Activation by Oral Administration of Riboflavin Reduces Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Rats  リボフラビンの経口投与によって内因性スーパーオキシドジスムターゼの活性化はラットの腹部大動脈瘤の形成を削減する		
審査委員 Examiner	主 査 平田 健一 Chief Examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner 副 査 杉本 幸司 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【背景】

腹部大動脈瘤は、大動脈壁の慢性変性疾患で大動脈径の拡大を特徴とし、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。活性酸素種(ROS)は大動脈壁の破壊と再生のバランスを崩し、腹部大動脈瘤を促進する。腹部大動脈瘤に対して有効な薬治療方法は確立されていないが、動物実験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。申請者らは、リボフラビン(ビタミンB2)が腹部大動脈瘤の形成および拡大を削減するか検討した。

【方法】

ラットの腹部大動脈瘤モデルを使用した。大動脈モデルは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。

リボフラビン 25mg/kg (Group R) とコントロール群 (Control) に無作為に分類し、動脈瘤作成3日前から1日1回経口投与し、動脈瘤作成3日、7日、28日後に動脈瘤形成抑制効果を検討した。病理組織学的検査では、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。また、ウェスタンブロット法で ERK のリン酸化を評価した。さらに、PCR 法にて炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および MMP-2, MMP-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。リボフラビン投与は血圧に影響を与えなかったが、28日後、リボフラビンは投与依存性に腹部大動脈瘤の形成を有意に抑制し、エラスチン含有率も有意に減少した。また、形成された動脈瘤の更なる拡大も抑制した。7日後、動脈瘤壁における ROS は投与依存性に有意に抑制され、8-OHdG 陽性細胞数も同様に減少した。さらに、炎症細胞、特に CD68 免疫陽性細胞の大動脈瘤壁への浸潤も減少した。TNF- $\alpha$  および MMP-2, MMP-9 の mRNA 発現も抑制されていた。さらに、炎症性サイトカインである ERK 経路投与依存性に有意に抑制された。

【結論】

本研究において、リボフラビンは 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なく、拡大を抑制することを示し、リボフラビンが腹部大動脈瘤の治療薬となる可能性を示す価値ある研究であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)を得る資格があると認める。