

論 文 内 容 要 旨

題目 Topical Application of Nitrosonifedipine, a Novel Radical Scavenger, Ameliorates Ischemic Skin Flap Necrosis in a Mouse Model

(新規抗酸化薬ニトロソニフェジピン局所投与によるマウス虚血性皮弁に対する壊死改善効果)

著者 Yutaka Fukunaga, Yuki Izawa-Ishizawa, Yuya Horinouchi, Eriko Sairyo, Yasumasa Ikeda, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Yoshiro Abe, Ichiro Hashimoto, Toshiaki Tamaki  
平成 29 年発行 Wound Repair and Regeneration に掲載予定

内容要旨

【背景】乱軸型皮弁では血流の不安定な遠位部で虚血性壊死を起こすことがある。虚血性皮弁壊死は治療期間の延長や移植部位によっては重篤な合併症を引き起こすため、その予防法は長年にわたり研究されてきた。虚血性皮弁壊死には活性酸素種が寄与しているとされており、抗酸化薬によって虚血性皮弁壊死が予防されたという動物実験の報告があるが、臨床的に有効な抗酸化薬は現状では存在しない。

降圧薬であるニフェジピンの代謝産物であるニトロソニフェジピンは、細胞膜でラジカル体を形成しラジカルを消去することで強力な抗酸化作用を示し、動脈硬化症モデルにおける血管リモデリング抑制効果、糖尿病性腎症モデルにおける腎症進行抑制効果が報告されている。我々はニトロソニフェジピンの抗酸化作用が皮弁壊死に対する治療に応用できると考え、虚血性皮弁壊死モデルを用いて壊死抑制効果の検討を行った。

【方法】9-10 週齢の C57BL/6 マウスの背部に 1×3cm の乱軸型皮弁を作成し術直後から 1 日毎にニトロソニフェジピン 30 mg/kg もしくは同量の溶媒 (1%カルボキシメチルセルロース) を皮弁内に局所投与した (以下投薬群, 対照群とする)。生着域の評価は術後 7 日目に行った。術後 1, 3 日目の組織を採取し、酸化ストレス, アポトーシス, 血管内皮障害, 血管新生について評価した。

## 様式 (8)

【結果】①投薬群では対照群に比べて有意に皮弁生着域が拡大した ( $51.8 \pm 6.9\%$  vs.  $78.3 \pm 7.0\%$ ,  $p=0.021$ )。②術後3日目のMalondialdehydeは投薬群では対照群に比べて有意に減少しており、皮弁内における酸化ストレスがニトロソニフェジピン投与によって抑制されていることが示された ( $2.31 \pm 0.28 \mu\text{mol/g protein}$  vs.  $4.21 \pm 0.32 \mu\text{mol/g protein}$ ,  $p=0.001$ )。③TUNEL染色を用いて術後3日目のアポトーシス細胞数をカウントしたところ、アポトーシス細胞数は投薬群では対照群に比べて有意に減少していた ( $15.5 \pm 1.9 \text{ cells/field}$  vs.  $4.0 \pm 1.2 \text{ cells /field}$ ,  $P=0.0009$ )。④酸化ストレスによるアポトーシスに関わるp38 MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) のリン酸化タンパク発現は、投薬群では対照群に比べて有意に減少していた ( $p=0.0015$ )。⑤組織中のeNOSタンパク、VCAM-1タンパクの発現を両群間で比較した結果、投薬群では対照群に比べて有意にeNOSタンパクが増加し ( $p=0.023$ )、VCAM-1タンパクが有意に減少していた ( $p=0.038$ )。⑥術後7日目のレクチン灌流染色を用いて血管数をカウントした結果、両群間で血管数に差は認められなかった。血管新生の重要な因子であるVEGFタンパクの発現にも両群間で差は認められなかった。

【考察】本研究においてニトロソニフェジピンは乱軸型皮弁において虚血性皮弁壊死を抑制する効果が示された。その効果の機序として、ニトロソニフェジピンは酸化ストレス、アポトーシス、血管内皮障害をそれぞれ抑制することが考えられた。ニフェジピンは血管拡張作用を介して皮弁壊死抑制に働くと報告されているが、ニトロソニフェジピンはカルシウムチャンネル拮抗作用を持たず降圧作用を示さないことからニフェジピンとは全く異なる作用機序から皮弁壊死抑制に働いていると考えられた。

【結語】ニトロソニフェジピンは酸化ストレス抑制、アポトーシス抑制、血管内皮障害抑制を介して虚血性皮弁壊死を抑制することが示された。ニトロソニフェジピン局所投与は臨床的にも新しい虚血性皮弁壊死予防法の候補と考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	甲医第 1335号	氏名	福永 豊
審査委員	主査 勢井 宏義 副査 久保 宜明 副査 西良 浩一		

題目 Topical Application of Nitrosonifedipine, a Novel Radical Scavenger, Ameliorates Ischemic Skin Flap Necrosis in a Mouse Model

(新規抗酸化薬ニトロソニフェジピン局所投与によるマウス虚血性皮弁に対する壊死改善効果)

著者 Yutaka Fukunaga, Yuki Izawa-Ishizawa, Yuya Horinouchi, Eriko Sairyo, Yasumasa Ikeda, Keisuke Ishizawa, Koichiro Tsuchiya, Yoshiro Abe, Ichiro Hashimoto, Toshiaki Tamaki

平成 29 年発行 Wound Repair and Regeneration に掲載予定  
(主任教授 橋本 一郎)

要旨 虚血性皮弁壊死には活性酸素種が寄与するとされているが、臨床的に有効な抗酸化薬は現状では存在しない。ニトロソニフェジピンは強力な抗酸化作用を有することが報告されており、本研究では本剤の抗酸化作用が皮弁壊死に対する予防に応用できると考えた。虚血性皮弁壊死モデルを用いてニトロソニフェジピンを皮弁中央に局所投与することで壊死抑制効果の検討を行った。

得られた結果は以下の通りである。

- ① 投薬群では対照群に比べて有意に皮弁生着域が拡大した。
- ② 脂質過酸化のマーカである malondialdehyde と活性酸素種

の発生源となる p22phox タンパクが対照群に比べて投薬群で有意に減少しており、皮弁内における酸化ストレスが投薬群で抑制された。

- ③ TUNEL 染色を用いてアポトーシス細胞数をカウントしたところ、投薬群では対照群に比べて有意に減少した。
- ④ 酸化ストレスによるアポトーシスに関わる p38 MAPK のリン酸化タンパクは、投薬群では対照群に比べて有意に減少した。
- ⑤ 投薬群では対照群に比べて有意な eNOS タンパクの増加と、有意な VCAM-1 タンパクの減少がみられ、薬剤投与による血管内皮障害の改善が示唆された。
- ⑥ レクチン灌流染色を用いて血管数をカウントした結果、両群間で血管数に差は認められず、血管新生因子である VEGF タンパクも両群間で差は認められなかった。これらのことから、本薬剤は血管新生に影響しないことが示唆された。

以上の結果より、ニトロソニフェジピンは酸化ストレス抑制、アポトーシス抑制、血管内皮障害抑制を介して虚血性皮弁壊死を抑制することが示された。

本研究はニトロソニフェジピンの局所投与が新しい虚血性皮弁壊死予防法として役立つ可能性を示唆しており、その臨床的ならびに学術的意義は大きく、学位授与に値すると判定した。