

氏名（本籍）	山田 好 久（岐阜県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲第 924 号
学位授与日付	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Post-infarct active cardiac-targeted delivery of erythropoietin by liposomes with Sialyl Lewis X repairs infarcted myocardium in rabbits
審査委員	（主査）教授 國 貞 隆 弘 （副査）教授 森 田 啓 之 教授 原 明

### 論文内容の要旨

近年、エリスロポエチン（EPO）は造血作用のみならず、心筋梗塞に対して心臓保護的効果があると報告されている。しかしその全身投与では高容量の EPO を用いなければ効果はなく、しばしば血栓による合併症が問題になる。そこで我々は心筋梗塞領域へ選択的に EPO を運搬する非侵襲的な心臓標的性 drug delivery system を考案した。心臓標的 Sialyl Lewis X（SLX）結合 EPO 内包リポソームの梗塞後投与が、心筋梗塞サイズを縮小させ、左室リモデリングと左室機能を改善させるかどうか、またその分子メカニズムについて検討した。

#### 【対象と方法】

日本白色種ウサギ（2.5Kg）で 30 分間冠動脈閉塞後に再灌流させる心筋梗塞モデルを作成した。対照群（Saline 群、生理食塩水静注、n=10）、SLX 結合リポソーム群（L 群、SLX 結合リポソーム、n=10）、SLX 非結合 EPO 内包リポソーム群（L-EPO without SLX 群、SLX 非結合 EPO 内包リポソーム、EPO 5000IU/ml、1ml、n=10）、SLX 結合 EPO 内包リポソーム群（L-EPO 群、SLX 結合 EPO 内包リポソーム、EPO 5000IU/ml、1ml、n=10）を作成し、再灌流後すぐにそれぞれ静脈投与した。まず 24、48 時間、7、14 日間再灌流モデルを用いて、蛍光物質（Cy5.5）と金コロイドを内包したリポソームを梗塞後投与し、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて梗塞心筋への SLX 結合リポソームの集積を検証した。14 日間再灌流モデルでは、心臓カテーテル検査（血圧、心拍数、dP/dt）や心臓超音波検査による血行動態評価を行った後に屠殺し、TTC 染色、Masson Trichrome 染色を用いて心筋梗塞サイズを、CD31 免疫染色を用いて毛細血管数を評価した。また 48 時間再灌流モデルと 14 日間再灌流モデルにおいて虚血心筋と非虚血心筋において EPO 濃度を測定し、Western blotting 法により E-selectin、P-selectin、EPO receptor、リン酸化 Akt、リン酸化 ERK、リン酸化 Stat3、VEGF、Bcl2、pro-MMP-1 等のタンパクの解析を行った。

#### 【結果】

再灌流後、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を用いて心筋梗塞境界領域へ蛍光物質と金コロイドが集積することを確認した。末梢血液検査では 4 群間において有意差は認められず、L-EPO 群、L-EPO without SLX 群でも赤血球数、ヘマトクリット値は上昇しなかった。心筋 EPO 濃度は、48 時間再灌流モデルで対照群と比較して L-EPO 群の梗塞境界領域で上昇を認めた。心臓カテーテル検査や心臓超音波検査による血行動態評価では、L-EPO 群で他群と比較して有意に左心機能の改善を認めた。L-EPO 群で

心筋梗塞サイズと心筋線維化領域が他群と比較して極めて有意に縮小しており、左室リモデリングも改善されていた。Western blot 解析では L-EPO 群において梗塞境界領域のリン酸化 Akt, リン酸化 ERK, リン酸化 Stat3 の有意な亢進と EPO receptor, VEGF, Bcl2, pro-MMP-1 発現亢進を認めた。

#### 【考察】

心筋虚血領域において E-selectin, P-selectin の発現と, SLX 結合リポソームによる梗塞心筋部位への選択的な EPO の供給が確認された。非 SLX 結合 EPO 内包リポソーム群では SLX 結合 EPO 内包リポソーム群と比較して心筋梗塞サイズの減少や左心機能の改善は見られないことから, SLX (糖鎖) と selectin による選択的な結合によりリポソームが梗塞局所に運搬され, EPO の供給の促進に寄与するものと考えられた。また Western blot 解析では L-EPO 群の虚血領域で Akt, ERK のリン酸化促進や VEGF, Bcl2, pro-MMP-1 の発現亢進が認められ, 他群と比較して有意に心保護効果が期待されることが示唆された。

以上より, SLX 結合エリスロポエチン内包リポソームは心筋梗塞領域に発現された selectin に選択的に結合し, 虚血領域への EPO の供給により Akt, ERK, Stat3 のリン酸化や, 抗線維化, 血管新生効果を介して心筋梗塞サイズ縮小左室機能改善, リモデリング改善をもたらすものと考えられた。

#### 【結論】

SLX 結合エリスロポエチン内包リポソームは心筋梗塞領域に選択的に集積し, シグナル伝達抗線維化, 血管新生効果を介して心筋梗塞サイズ縮小, 左室機能改善と左室リモデリング改善をもたらした。SLX 結合エリスロポエチン内包リポソームは今後の急性心筋梗塞に対して新たな標的治療として役立つものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 山田好久は, 急性心筋梗塞時に静脈投与された SLX 結合エリスロポエチン内包リポソームが梗塞領域に集積し, 心筋梗塞サイズ縮小, 左室機能改善, 左室リモデリング改善させることを見出し, そのメカニズムに Akt, ERK, Stat3 のリン酸化, 抗線維化, 血管新生効果が寄与することを明らかにした。本研究成果は, 循環器病学の発展に貢献するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Yoshihisa Yamada, Hiroyuki Kobayashi, Masamitsu Iwasa, Shohei Sumi, Hiroaki Ushikoshi, Takuma Aoyama, Kazuhiko Nishigaki, Genzou Takemura, Takako Fujiwara, Hisayoshi Fujiwara, Makoto Kiso, Shinya Minatoguchi : Post-infarct active cardiac-targeted delivery of erythropoietin by liposomes with Sialyl Lewis X repairs infarcted myocardium in rabbits  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 304, 1124-33 (2013)