

脳梗塞急性期の患者血清を用いた脳血管平滑筋細胞増殖に対する  
ラジカル・スカベンジャー、エダラボンの効果とアムロジピンの  
Pleiotropic 作用による影響

山口友明,<sup>\*,a</sup> 井田 隆,<sup>b</sup> 小林高義,<sup>b</sup> 平賀正純,<sup>b</sup>  
大石一彦,<sup>c</sup> 内田幸宏,<sup>c</sup> 越前宏俊<sup>d</sup>

**Alterations of Antiproliferative Effects of Serum Obtained from Patients with Acute Cerebral Infarction Treated with a Radical Scavenger, Edaravone, with or without Amlodipine Using an *in vitro* Cultured Basilar Artery Smooth Muscle Cells**

Tomoaki YAMAGUCHI,<sup>\*,a</sup> Takashi IDA,<sup>b</sup> Takayoshi KOBAYASHI,<sup>b</sup> Masazumi HIRAGA,<sup>b</sup>  
Kazuhiko OISHI,<sup>c</sup> Masaatsu K. UCHIDA,<sup>c</sup> and Hirotochi ECHIZEN<sup>d</sup>  
*Departments of Hospital Pharmacy<sup>a</sup> and Internal Medicine,<sup>b</sup> Nakano General Hospital,  
4-59-16 Chuou, Nakano-ku, Tokyo 164-8607, Japan, and Departments of  
Pharmacology<sup>c</sup> and Pharmacotherapy,<sup>d</sup> Meiji Pharmaceutical University,  
2-522-1 Noshio, Kiyose City, Tokyo 204-8588, Japan*

(Received September 1, 2003; Accepted October 28, 2003; Published online November 4, 2003)

The guinea-pig basilar artery smooth muscle cell (GBa-SM3) culture system in the Dulbecco's modified Eagle's medium for 3 days serves as a useful *in vitro* model for assessing antiproliferative effects of various therapeutic agents on vessels. With use of this system we studied whether human serum obtained from patients with acute cerebral infarction ( $n=16$ ) would have a proliferative effect on vessels and whether an administration of a free radical scavenger, edaravone, with or without amlodipine would elicit antiproliferative effects. The control serum was obtained from 3 healthy human subjects. Time courses of the cell growth and survival were measured colorimetrically by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test. The stimulatory effect on the proliferation of GBa-SM3 cells of patients' serum obtained immediately after infarction was significantly ( $p<0.05$ ) greater than those obtained from the same patients after the treatment of edaravone for 2 weeks. In addition, the serum obtained from the patients treated by edaravone and amlodipine ( $n=7$ ) showed a significantly ( $p<0.05$ ) greater antiproliferative effect than that obtained from those treated by edaravone ( $n=9$ ). In conclusion, edaravone may have a clinically beneficial antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells. Co-administration of amlodipine, possessing an antioxidative calcium channel blocker, with edaravone may be a promising combination to patients with acute cerebral infarction. Further controlled clinical trials with a large number of patients should be warranted.

**Key words**—amlodipine; edaravone; cerebral infarction; proliferation; vascular smooth muscle cells

緒 言

近年の脳梗塞病態解明の研究により、血流の完全な遮断により壊死に陥った神経組織周囲に存在する不完全な虚血部位（ペナンプラ, penumbra）の脳神経細胞の保護や、梗塞血管の自発的又は薬物による線溶系活性の亢進により閉塞血管が再開通した後

視されるようになった。<sup>1,2</sup> これらの病態には、ペナンプラ領域及び再還流領域の神経及びグリア細胞から発生する活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）の過剰生成に伴う酸化ストレスが深く関与しているため、ROSの薬理的消去は、上記の脳虚血病態への新しい治療薬となる可能性がある。<sup>3,4</sup>

エダラボン（edaravone）は、比較的小分子（分子量 174 ダルトン）の化合物で、動態的に良好な脳組織移行性があり、虚血脳組織にて ROS に電子を供与しラジカルを消去する。<sup>5,6</sup> 急性脳虚血動物モデルでは、脳虚血及び再灌流障害病態における血管内

<sup>a</sup>中野総合病院薬剤科, <sup>b</sup>同内科, <sup>c</sup>明治薬科大学薬理学教室, <sup>d</sup>同薬物治療学教室  
e-mail: nghph@nakano.sogo.or.jp

皮細胞障害を抑制し、神経細胞及びグリア細胞膜脂質の過酸化反応を抑制し得ることが報告されている。<sup>5,6)</sup>

一方、エダラボンは、ROSの酸化ストレスが引き起こす脳動脈硬化病変の促進にも治療効果を有する可能性がある。これは、ROSが強い血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖刺激作用を有するためである。<sup>7)</sup> VSMCの増殖は動脈硬化病変の根幹をなす病態であり、動脈硬化プラークの増生と血管の狭小化・閉塞の原因となるため、脳梗塞の2次予防の観点から極めて重要である。

我々は、既にウシ胎児血清 (FBS) 存在下で増殖するモルモット脳底動脈平滑筋細胞由来の培養細胞 (GBa-SM3) が、カルシウム拮抗薬やスタチン系高脂血症治療薬、いわゆる pleiotropic 効果を有する薬物の VSMC 増殖抑制作用を評価するよい実験系となることを発見し、エダラボンが他の薬物の VSMC 増殖抑制作用を増強すると言う、新規な薬理作用を明らかとした。<sup>8)</sup>

さらに GBa-SM3 培養系による VSMC 増殖反応に対する FBS の増殖刺激作用に血清中の lysophosphatidic acid (LPA) が関与することから、<sup>9)</sup> この実験系をエダラボンと他の pleiotropic 効果を有する薬物で治療中の患者血清を用いた *ex vivo* 系としても利用できる可能性があると思つた。そこで、本研究では、ヒト血清を用いた *ex vivo* の新規 VSMC 増殖評価モデルを用いて、梗塞発症後にエダラボンを投与されている患者の血清による VSMC 増殖への影響が pleiotropic 効果を有するアムロジピンの併用によりいかに影響されるかを検討した。

## 方 法

脳梗塞と診断され治療目的でエダラボンの投与を受けた入院患者のうち、試験参加への文書同意が得られた16名(男性8名、女性8名)を対象とした。これらの患者からは、入院日とエダラボン治療開始後2週間の時点で血液を採取し、血清を分離後実験に使用した。対照血清は、健常人(男性3名、46—53歳)から採取した。

試験に参加した患者の臨床背景は、平均年齢は73±9歳(標準偏差:SD)であり、脳梗塞の臨床病型は、ラクナ梗塞7例、アテローム血栓性脳梗塞

4例、心原性脳血栓性梗塞3例、その他2例であった。すべての患者は、診断確定後エダラボンを1回30mg、1日2回(60mg/日)、14日間投与された。

患者の主な合併症は、高血圧10例、糖尿病5例、高脂血症4例、心房細動3例であり、併用薬剤は、オザグレルナトリウム6例、ベシル酸アムロジピン(以下アムロジピン)7例、及び両者の併用2例であった。オザグレルナトリウムは、脳梗塞発症後から160mg/日を14日間、アムロジピンは、1日1回5mgを、脳梗塞発症1日後から4例、2日後から1例、7日後から2例が投与されていた。患者のエダラボン治療前後の臨床検査値はTable 1に示した。なお、本試験のプロトコールは、開始前に施設内IRBで許可されており、血液の採取に当たっては患者に試験の目的を説明ののち文書同意を取得した。

モルモット脳底動脈由来のGBa-SM3細胞の培養は、大石らの論文<sup>10)</sup>に従った。簡略に述べると、GBa-SM3細胞は、100単位/mlのベンジルペニシリンカリウム、0.1mg/mlの硫酸ストレプトマイシン、10%のウシ胎児血清(FBS)、及び1.67mg/mlのNaHCO<sub>3</sub>を加えたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)で、O<sub>2</sub>95%・CO<sub>2</sub>5%、37°Cの条件で培養した。培養実験には、市販の96-穴培養プレートを用い、DMEM液からFBSを除いた培地[FBS(-)]中にGBa-SM3細胞を4×10<sup>5</sup> cells/ml含有する細胞懸濁液を50μlずつ均一に注入し、患者又は健常人血清10μl及びFBS(-)のDMEM液40μlを加え全量100μlとした。血清最終濃度は、1%、3%、5%でO<sub>2</sub>は95%・CO<sub>2</sub>は5%、温度37°Cで3日間培養したのち、生細胞数をMTT法(MTT-cell growth assay kit, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA)により測定した。すなわち、MTT試薬を各細胞培養ウエルに10μl加えたのち、4時間培養を継続し、その後溶解溶液を100μlずつ加え、室温で1日放置後に吸光度(540nm)をマイクロプレートリーダーで測定し、細胞数に換算した。実験は、各血清濃度について同時に3サンプル行い、平均値を求めた。

患者及び健常人の各血清添加量におけるGBa-SM3細胞増殖刺激作用の効果の比較は、治療前と後に対して分散分析(ANOVA)により検定した。同一血清間での添加量による増殖刺激作用の差異は

Table 1. Blood Pressure and Laboratory Data of Subjects with Acute Cerebral Infarction Pre and Post Treatment

	(normal range )	Pre treatment	Post treatment
systolic blood pressure	(mmHg)	159.5±28.5	131.0±17.4*
diastolic blood pressure	(mmHg)	85.0±23.9	75.4±12.3
White blood cells	(34-88 ×10 <sup>2</sup> /μl)	105.4±58.1	79.8±48.5
Red blood cells	(381-552 ×10 <sup>4</sup> /μl)	427.7±97.2	410.1±56.0
Hemoglobin	(11.2-17.2 g/dl)	12.8±3.0	12.4±1.8
Platelets	(11.8-36.4 ×10 <sup>4</sup> /μl)	23.4±7.8	25.7±6.2
Aspartate aminotransferase (AST)	(8-40 IU/l)	54.9±76.6	28.1±11.6
Alanine aminotransferase (ALT)	(5-35 IU/l)	36.9±48.0	26.6±11.0
γ-glutamyl transpeptidase (γ-GTP)	(7-50 IU/l)	51.9±50.9	40.5±28.5
Total Cholesterol	(130-220 mg/dl)	201.7±43.9	196.6±21.0
Total Protein	(6.8-8.2 g/dl)	6.6±0.9	6.1±0.7
BUN	(5-22 mg/dl)	26.2±28.2	16.9±19.5
Serum Creatinine	(0.6-1.3 mg/dl)	1.0±0.7	0.9±0.6
High-sensitivity C-reactive protein	(0-0.5 ng/ml)	33.6±48.2	15.9±25.2

Values are means±SD. \*p<0.05 for the comparison with controls.

対応のある t-検定及びウイルコクソン検定を用いて行った。また、アムロジピン併用の有無による平滑筋細胞増殖の差異については対応のある t-検定を用いた。なお、検定結果は、すべて  $p < 0.05$  をもって統計的に有意とした。

## 結 果

患者の臨床検査値の変動を Table 1 に示した。治療前後の検査値では、収縮期血圧のみが有意な ( $p < 0.05$ ) 変化を示し、入院後 2 週間の経過で平均収縮期血圧は 28 mmHg 低下した。これは、多くの患者 (16 名中 7 名) が脳梗塞を発症し治療のため入院したのちにアムロジピンによる降圧治療を開始したためであると考えられる。近年、動脈硬化病変の指標として注目されている血清高感度 CRP 値は、梗塞治療により低下傾向を示したが有意差には至らなかった。

また、エダラボン治療前後で肝機能及び腎機能の生化学的指標に有意な変化は認められなかった。エダラボン治療前後の血清を用いた GBa-SM3 細胞の増殖刺激試験では、3% 及び 5% の患者血清存在下で有意差 ( $p < 0.05$ ) が見られたが、1% では同様の傾向はあるものの有意差には至らなかった (Fig. 1)。

患者血清による GBa-SM3 細胞増殖刺激に対して、

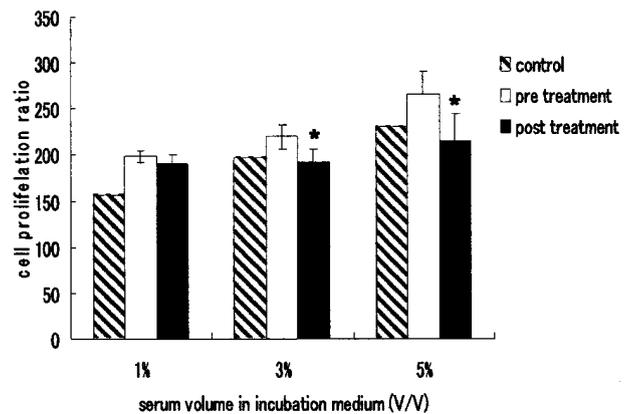


Fig. 1. The proliferation of guinea-pig basilar artery smooth muscle cells (GBa-SM3) with different concentrations of patients serum with cerebral infarction

Target cells were seeded at the density of  $4 \times 10^5$ /plate and incubated for 3 days with medium supplemented with 1 to 5% human serum pre or post edaravone treatment or healthy human serum (control). Cell growth was quantified by the MTT assay. The effects of pre (□) or post (■) treatment of edaravone were expressed as relative value to the respective control (▨). Data are shown as means±SEM (n=16). \*P<0.05 as compared to the pre treatment.

pleiotropic 作用を有するアムロジピンの併用投与が影響を有するかなかを検討するため、血清濃度 3% にて、7 名のアムロジピン併用患者と 9 名の非併用患者間で比較を行うと、アムロジピン併用群では、治療前後で有意な ( $p < 0.05$ ) 増殖抑制効果が認められた (Fig. 2)。

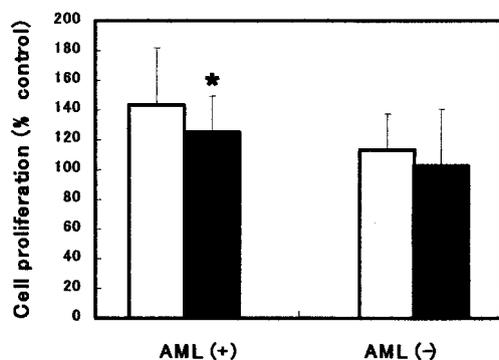


Fig. 2. The influence of amlodipine contribution on the proliferation of guinea-pig basilar artery smooth muscle cells (GBa-SM3) in the Dullbecco's modified Eagle's medium supplemented with 3% patients serum with cerebral infarction. Target cells were seeded at the density of  $4 \times 10^5$ /plate and incubated for 3 days with medium supplemented with 3% human serum pre (□) or post (■) edaravone treatment

Cell growth was quantified by the MTT assay. The effects of edaravone with or without amlodipine treatment were expressed as % relative value to the respective controls. Each point represents the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  as compared to the pre treatment.

## 考 察

我々は、*in vitro* の VSMC 培養実験系を用いて、急性脳梗塞のために 2 週間のエダラボン治療を受けた患者から得られた血清の VSMC 増殖刺激作用で、治療前と比較して有意に低下することを発見した (Fig. 1)。また、エダラボン治療を受けた患者の中で、高血圧症合併のためアムロジピンの投与を受けた患者において、血清の VSMC 増殖刺激作用が、投与前後で有意に減少するのに対して、アムロジピン非投与患者は、オザグレルナトリウム併用が 6 例含まれていたが、有意差には至らなかった (Fig. 2)。

この結果は、脳動脈硬化症の合併症として脳梗塞を発症した患者の急性期血清には VSMC 増殖刺激に関係する物質が増加しているが、その濃度はエダラボンの投与を含む薬物治療及び入院中の非薬物治療に伴い 2 週間後には有意に低下するが、特にアムロジピンを降圧治療に併用した患者では、著明な減少が見られたことを示唆しているものと考えられた。脳梗塞は、血栓又は塞栓により生じた虚血病変により惹起された虚血病変が数日に渡り周囲に波及する疾患である。<sup>11,12)</sup>

梗塞病変周囲の相対的な血流低下部位にはペナ

ブラ (penumbra) と称される壊死には至らないが重大な細胞機能障害に陥った領域が存在するので、現在の脳梗塞の薬物治療は、血流再開によりペナブラを可及的に機能回復する血栓溶解療法や、虚血又は再灌流時に発生が増大し組織障害を助長するフリーラジカルを消去するスカベンジャー薬の投与が主体となっている。後者の薬物で臨床応用に至った初めての薬物であるエダラボンは、脳梗塞患者における神経後遺症を軽減することが比較対照試験で証明されたゆいいつの薬物である。エダラボンの作用機序の一部が、フリーラジカル消去に基づくとする、この薬物の投与を受けた脳梗塞患者では、過剰のフリーラジカル発生に伴い、血清中にフリーラジカル自体若しくは 2 次的に発生した反応性に富む ROS などの酸化関連物質の濃度が増加している可能性がある。

我々は、フリーラジカルが関係すると想定される動脈硬化病変と関連が深い VSMC 増殖作用<sup>13,14)</sup>を、*in vitro* のモルモット脳底動脈由来の血管平滑筋細胞 (GBa-SM3) 培養系を用いて評価する実験モデルを確立し、ウシ胎児血清 (FBS) 刺激下で、フルバスタチンナトリウムとアムロジピンの VSMC 増殖抑制作用を、これらの薬物の高脂血症改善作用や降圧作用の影響がない状態で、いわゆる pleiotropic 作用として検出できることを見出した。<sup>8,15)</sup>

その際、エダラボンは、それ自体で増殖抑制作用を示さないものの、アムロジピンの増殖抑制作用を増強することが観察された。本研究では、エダラボンとアムロジピンとの臨床上好ましい相互作用が患者血清を VSMC 増殖の刺激源として用いた、*ex vivo* の実験系でも確認することができることを示した初めての報告である。

今回検討した脳梗塞を発症し入院した患者の入院直後の血清による GBa-SM3 細胞の増殖は、健常人血清により得られた対照値よりも 1.2—1.4 倍程度高く、梗塞により多くの平滑筋細胞増殖因子が増大していると推測された。2 週間のエダラボン治療により、その増殖刺激作用は有意に低下したため、エダラボンを含む薬物治療及び入院中の非薬物治療は、この変化に何らかの関係があるものと推測された。

しかし、エダラボンは、同効薬が存在しないため、脳梗塞患者に対してエダラボンを投与しない無

治療群を設定することはエダラボンの投与禁忌病態の存在する場合を除き倫理的な観点から困難である。このため、無治療群患者の血清が得られず、脳梗塞の自然経過により上記の血清因子が低下した可能性は否定できなかった。

本研究では、副次的な評価項目として、動脈硬化病変、特に冠動脈疾患などの動脈硬化プラークの破綻に関連するとされている高感度CRP<sup>16-18)</sup>の変化も観察したが、この指標には、エダラボン投与前後で有意な変化を認めなかった。本研究の問題点は、対象患者が少なく(16名)、観察期間が短い(2週間)ため、エダラボンのVSMC増殖抑制作用が十分観察できない可能性があることと、他に同効薬が存在しない状況で、無治療又は標準薬の使用による対照群を設定できなかったことである。

したがって、我々の結果は、原理的に臨床評価における種々のバイアスを完全に排除できない。本試験の結果は、今後のより長期の及び対照群を設定した比較対照試験により確認されねばならないことは明らかである。しかし、本研究は、動脈硬化病態を有する患者の血清を用いて、VSMC増殖刺激作用の変化を健常人と比較して検討し得る新規な実験モデルとしての意義は大きいと考えられる。

## REFERENCES

- 1) Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M. A., *Trends Neurosci.*, **22**, 391-397 (1999).
- 2) Irani K., *Circ. Res.*, **87**, 179-183 (2000).
- 3) Barinaga M., *Science*, **272**, 664-666 (1996).
- 4) Heiss W. D., Kracht L. W., Thiel A., Grond M., Pawlik G., *Brain*, **124**, 20-29 (2001).
- 5) Watanabe T., Morita I., Nishi H., Murota S., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **33**, 81-87 (1988).
- 6) Watanabe T., Yuki S., Egawa M., Nishi H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 1597-1604 (1994).
- 7) Chan P.H., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2**, 12-14 (2001).
- 8) Yamaguchi T., Oishi K., Uchida M. K., Echizen H., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1706-1710 (2003).
- 9) Tokumura A., Iimori M., Nishioka Y., Kitahara M., Sakashita M., Tanaka S., *Am. J. Physiol.*, **267**, C204-C210 (1994).
- 10) Oishi K., Itoh Y., Isshiki Y., Kai C., Takeda Y., Yamaura K., Ohmuro T. H., Uchida M. K., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**, C1432-C1442 (2000).
- 11) Beaulieu C., de Crespigny A., Tong D. C., Moseley M. E., Albers G. W., Marks M. P., *Ann. Neurol.*, **46**, 568-578 (1999).
- 12) Matsui T., Mori T., Tateishi N., Kagamiishi Y., Satoh S., Katsube N., Morikawa E., Morimoto T., Ikuta F., Asano T., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **22**, 711-722 (2001).
- 13) Ip J. H., Fuster V., Badimon L., Badimon J., Taubman M. B., Chesebro J. H., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **15**, 1667-1687 (1990).
- 14) Newby A. C., George S. J., *Curr. Opin. Cardiol.*, **11**, 574-582 (1996).
- 15) Yamaguchi T., Ida T., Hiraga M., Oishi K., Uchida M. K., Echizen H. (submitted).
- 16) Libby P., *Circulation*, **91**, 2844-2859 (1995).
- 17) Di Napoli M., Papa F., *Stroke*, **33**, 1763-1771 (2002).
- 18) Winbeck K., Poppert H., Etgen T., Conrad B., *Stroke*, **34**, 375-376 (2003).