

### (13) 医学的貢献度

我が国における心不全による死亡は全死因の第二位を占めており、その抑止は社会的急務となっている。特に心筋梗塞後の心機能低下に起因する慢性心不全については、5年生存率が50%以下と低いことから、その改善が急がれている。心筋梗塞後の心機能低下は再梗塞によりその危険性が増大する。心筋梗塞再発予防における大規模薬剤介入を念頭に置いた本研究は、医学的貢献度も非常に高いと考える。

### (14) 医学研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

患者さん用説明文書を用いて、研究遂行者の担当者が説明し、別紙の同意文書により同意を得る。

### (15) 動物を用いた実験について

動物実験は施設の倫理規定に基づき審査に通過した実験のみを行い、マウス等動物の生命を最大限尊重し、効率的に実験を進める。

## C. 研究結果

現在わが国において、心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因としては心筋梗塞後の心機能低下が重要である。くり返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題である。また臨床的見地から、梗塞後心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後の心不全発症を抑制することは極めて重要な案件である。

くり返す心筋梗塞後の心機能低下に対して、二次予防および心筋リモデリング抑制というアプローチがあげられる。加齢そのものが発症のリスクファクターであるため、今後わが国が迎える超高齢化社会の到来にあたり、心筋梗塞二次予防の重要性が増している。一方で心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、その発症・予後に最も影響を与えるとされる糖尿病およびその予備軍は、生活習慣の変化、高齢化をうけて非常に勢いで増加している。したがって今後わが国の心筋梗塞二次予防において、耐糖能異常への新たな対処の必要性が高まっている。

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692, 1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対し

て、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

### 当該研究期間3年の研究計画

1年目 研究体制の整備、症例エントリーの開始、動物実験による検討

平成16年度は、参加予定施設とキックオフミーティングを行いプロトコルの確定をすると共にインターネット登録用のホームページを立ち上げた。中央施設である国立循環器病センターの倫理審査委員会を通過し予定通りエントリーが開始された。また、イヌ心不全モデルにおいて糖代謝に関連する遺伝子に変化しており、ヒト心不全症例での検討でも同様のことが見付かった。

2年目 症例のエントリー、エントリーされた症例の観察、動物実験による検討

H17年度は、参加施設にて倫理委員会の通過を得て、目標症例数を目指しエントリーを開始した。これまでに予備登録症例を含め約1100症例の登録が終了している。また、マウスTACモデルおよび慢性非虚血性心不全症例においてボグリボースが心不全を改善することが示唆された。このことから一過性高血糖は心不全の増悪因子であり、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤には心筋保護効果があると考えられた。

3年目 エントリーされた症例の観察、データ解析

## D. 考察

心機能と生体の糖利用は密接な関係にあることが基礎医学の成果として明らかになりつつある。本研究は大規模臨床研究にて、抗高血糖薬の投与により心筋梗塞二次予防が可能であることを臨床的に検討するものであり、以下の結果が期待される。

1. 心筋梗塞の二次予防により慢性心不全患者の増加を抑制できれば、厚生行政面においては大幅な医療費抑制効果が期待され、また医療面においては患者のQOLの著明な改善、健康寿命の延長が期待できる。
2. 包括医療制度の導入により急性心筋梗塞を含

めた心血管イベントの発症数の減少は、そのまま医療費の抑制につながる。

H18年度は、これまでに登録された症例を観察(2年間)すると同時に、目標症例数(3000例)まで登録を進め、観察期間終了後に $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬の投与により血管イベントの再発予防が達成されるか解析を行う。

#### E. 結論

糖利用の正常化は、新しい心血管疾患の治療法になりうると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記なし

#### G. 研究発表

##### 5. 論文発表

特記なし

##### 6. 学会発表

特記なし

#### H. 知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

##### 7. 特許取得

特記なし

##### 8. 実用新案登録

特記なし

##### 9. その他

特記なし

分担研究報告書

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

分担研究者 金 智隆 国立循環器病センター 医師

研究要旨

現在わが国における心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因として心筋梗塞後心ポンプ機能低下が重要である。慢性心不全による繰り返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題となっている。また臨床的見地からも、梗塞後慢性心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後心不全の発症を抑制することは極めて重要な案件である。

今後わが国が迎える超高齢化社会の到来を考慮すると、心筋梗塞の二次予防というアプローチが特に重要となる。心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、発症およびその予後に最も影響を与える糖尿病は、食後高血糖のみを有する糖尿病予備軍とともに非常な勢いで増加している。血糖値の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後の高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることが報告されている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後患者の食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え、我々は本研究を立案した。本研究は急性心筋梗塞で入院した症例に対して $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬を投与し、その心血管イベントの抑制効果の有無を全国100施設と共同した多施設大規模臨床試験にて検討する。

かかる大規模多施設臨床研究の成否にはサンプルサイズおよび質の高いデータの確保が重要な要素となる。我々は厚生科研 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 虚血・再灌流における心筋保護に関する大規模無作為薬剤効果比較試験(課題番号H14—心筋—006、JWIND試験)にて、心筋梗塞における急性期の薬剤介入という困難な性格であるにもかかわらず、全国68施設との共同で700例を超えんとする症例の登録を得て解析しつつある実績を有する。心筋梗塞の多施設臨床研究チームとしてネットワークがすでに確立されている

我々の研究グループは、そのインフラストラクチャーを活用することにより、本研究の遂行能力を十分有するものと考えられる。

A.研究目的

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

B. 研究方法

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

[対象]

急性心筋梗塞と診断され、再灌流療法をうけた20才以上の症例

[除外基準]

$\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬がすでに投与されている症例

低血糖発作の既往のある症例

その他、重篤な肝障害、腎障害や同意の得られない症例、不適当と考えられる症例

[方法]

エントリー時に $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬が投与されていない症例を無作為割付により2群にわけて、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬投与(ボグリボース、1回0.2mg 1日3回毎食直前)群と偽薬投与群に割り付ける。以後3年間フォローアップし心血管イベント、

心不全への進展、心筋リモデリングおよび糖尿病の発症につき2群間で比較検討する。またエントリ一時の顕性糖尿病の有無で層別解析をする。フォローアップ期間は6ヶ月ごとにデータ登録を行い、心血管イベントおよび糖尿病の状況(空腹時血糖、HbA1C)、内服状況を調査していく。

[目標症例数]

4000症例(コントロール群2000症例、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬群2000症例)

[参加予定施設]

全国100施設

国立循環器病センター、駿河台日本大学病院、りんくう総合医療センター市立泉佐野病院、宇和島市立宇和島病院、新別府病院など厚生科研 課題番号H14—心筋—006(JWIND試験)参加68施設に加え、計100施設での共同研究を計画している。

[中央予定施設]

国立循環器病センター

[評価項目]

プライマリーエンドポイント

心血管イベント(死亡、心疾患による入院、再梗塞、心不全、再インターベンション、CABG)

セカンダリーエンドポイント

死亡率

インターベンション後再狭窄

心筋リモデリング(心エコー、核医学検査、BNP)

慢性心不全への移行の抑制(心不全による入院、NYHA)

脳血管障害の発症

糖尿病の発症

[割り付け方法]

インターネットを利用した中央割付法

[サブスタディ]

データマイニング

フォローアップの際に、他の内服薬もすべて検討し、治療法最適化をデータマイニング法にて検討する。

SNPを用いた薬剤効果の検討

現在医療費の高騰から、テーラーメイド医療の重要性が強く訴えられている。

$\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬の効果がみられた群とな

い群において各種動脈硬化関連遺伝子、心筋梗塞関連遺伝子、糖尿病関連遺伝子のSNPを用いて検討を行う。

[動物実験による検討]

糖尿病マウスを利用した、長期間高血糖状態がマウス心筋代謝に与える影響の検討

耐糖能異常の梗塞後心筋に与える影響を検討するため、KKAYなどの糖尿病マウスに心筋梗塞を作成し、高血糖状態に長期間さらされることによりいかなる遺伝子発現変化をきたすかをaffimetrix社製のmicro chipを利用して解析する。また $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬等の薬剤による遺伝子発現変化を検討し、また高血糖及びその是正による心筋代謝への影響を検討する。

マウス心筋梗塞モデル、およびイヌ心筋梗塞モデルにおける食後高血糖抑制による心不全予防効果の検討

糖尿病のない野生型マウス、およびイヌに心筋梗塞を作成し、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬(boglibose)を経口で投与し、心エコーなどを用いて心機能を検討する。

(倫理面への配慮)

以下の点を明記し、倫理委員会の承認手続きを経て研究を開始した。拡散が施設でも同様の手続きを開始している。

(16) 学研究及び医療行為の対象となる個人の  
人権の擁護

本研究は遺伝子情報を扱わず臨床情報のみの解析であるが、臨床データの収集は「連結匿名化」を行った上で中央解析施設(国立循環器病センター)に集積し、解析時には個人特定に繋がるデータとは切り離した状態での解析を行う。

(17) 医学研究及び医療行為の対象となる個人  
への利益と不利益

本研究で使用される薬剤は臨床の現場で日常使われている薬剤であり、開発途中のいわゆる治験薬とは根本的に異なる。本研究ではコントロール目標を立て厳密にコントロールするので、より細やかな治療を受けられる可能性がある。また検査項目に関して一般の診療に必要な物に限っており新たな採血等の必要がなく対象となる個人への負担は少ない。個人情報保護に努めれば個人への不利益は少ないものと考えられる。

#### (18) 医学的貢献度

我が国における心不全による死亡は全死因の第2位を占めており、その抑止は社会的急務となっている。特に心筋梗塞後の心機能低下に起因する慢性心不全については、5年生存率が50%以下と低いことから、その改善が急がれている。心筋梗塞後の心機能低下は再梗塞によりその危険性が増大する。心筋梗塞再発予防における大規模薬剤介入を念頭に置いた本研究は、医学的貢献度も非常に高いと考える。

#### (19) 医学研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

患者さん用説明文書を用いて、研究遂行者の担当者が説明し、別紙の同意文書により同意を得る。

#### (20) 動物を用いた実験について

動物実験は施設の倫理規定に基づき審査に通過した実験のみを行い、マウス等動物の生命を最大限尊重し、効率的に実験を進める。

### C.研究結果

現在わが国において、心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因としては心筋梗塞後の心機能低下が重要である。くり返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題である。また臨床的見地から、梗塞後心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後の心不全発症を抑制することは極めて重要な案件である。

くり返す心筋梗塞後の心機能低下に対して、二次予防および心筋リモデリング抑制というアプローチがあげられる。加齢そのものが発症のリスクファクターであるため、今後わが国が迎える超高齢化社会の到来にあたり、心筋梗塞二次予防の重要性が増している。一方で心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、その発症・予後に最も影響を与えるとされる糖尿病およびその予備軍は、生活習慣の変化、高齢化をうけて非常に勢いで増加している。したがって今後わが国の心筋梗塞二次予防において、耐糖能異常への新たな対処の必要性が高まっている。

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対し

て、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

#### 当該研究期間3年の研究計画

1年目 研究体制の整備、症例エントリーの開始、動物実験による検討

平成16年度は、参加予定施設とキックオフミーティングを行いプロトコルの確定をすると共にインターネット登録用のホームページを立ち上げた。中央施設である国立循環器病センターの倫理審査委員会を通過し予定通りエントリーが開始された。また、イヌ心不全モデルにおいて糖代謝に関連する遺伝子に変化しており、ヒト心不全症例での検討でも同様のことが見付かった。

2年目 症例のエントリー、エントリーされた症例の観察、動物実験による検討

H17年度は、参加施設にて倫理委員会の通過を得て、目標症例数を目指しエントリーを開始した。これまでに予備登録症例を含め約1100症例の登録が終了している。また、マウスTACモデルおよび慢性非虚血性心不全症例においてボグリボースが心不全を改善することが示唆された。このことから一過性高血糖は心不全の増悪因子であり、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤には心筋保護効果があると考えられた。

3年目 エントリーされた症例の観察、データ解析

### D.考察

心機能と生体の糖利用は密接な関係にあることが基礎医学の成果として明らかになりつつある。本研究は大規模臨床研究にて、抗高血糖薬の投与により心筋梗塞二次予防が可能であることを臨床的に検討するものであり、以下の結果が期待される。

1. 心筋梗塞の二次予防により慢性心不全患者の増加を抑制できれば、厚生行政面においては大幅な医療費抑制効果が期待され、また医療面においては患者のQOLの著明な改善、健康寿命の延長が期待できる。
2. 包括医療制度の導入により急性心筋梗塞を含

めた心血管イベントの発症数の減少は、そのまま医療費の抑制につながる。

H18年度は、これまでに登録された症例を観察(2年間)すると同時に、目標症例数(3000例)まで登録を進め、観察期間終了後に $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬の投与により血管イベントの再発予防が達成されるか解析を行う。

#### E.結論

糖利用の正常化は、新しい心血管疾患の治療法になりうると考えられた。

#### F.健康危険情報

特記なし

#### G.研究発表

##### 7. 論文発表

特記なし

##### 8. 学会発表

特記なし

#### H.知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

##### 10. 特許取得

特記なし

##### 11. 実用新案登録

特記なし

##### 12. その他

特記なし

分担研究報告書

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

分担研究者 吉政 康直 国立循環器病センター 部長

研究要旨

現在わが国における心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因として心筋梗塞後心ポンプ機能低下が重要である。慢性心不全による繰り返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題となっている。また臨床的見地からも、梗塞後慢性心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後心不全の発症を抑制することは極めて重要な案件である。

今後わが国が迎える超高齢化社会の到来を考慮すると、心筋梗塞の二次予防というアプローチが特に重要となる。心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、発症およびその予後に最も影響を与える糖尿病は、食後高血糖のみを有する糖尿病予備軍とともに非常な勢いで増加している。血糖値の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後の高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることが報告されている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後患者の食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え、我々は本研究を立案した。本研究は急性心筋梗塞で入院した症例に対して $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬を投与し、その心血管イベントの抑制効果の有無を全国100施設と共同した多施設大規模臨床試験にて検討する。

かかる大規模多施設臨床研究の成否にはサンプルサイズおよび質の高いデータの確保が重要な要素となる。我々は厚生科研 効果的医療技術の確立推進臨床研究事業 虚血・再灌流における心筋保護に関する大規模無作為薬剤効果比較試験(課題番号H14—心筋—006、JWIND試験)にて、心筋梗塞における急性期の薬剤介入という困難な性格であるにもかかわらず、全国68施設との共同で700例を超えんとする症例の登録を得て解析しつつある実績を有する。心筋梗塞の多施設臨床研究チームとしてネットワークがすでに確立されている

我々の研究グループは、そのインフラストラクチャーを活用することにより、本研究の遂行能力を十分有するものと考えられる。

A.研究目的

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692,1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対して、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

B. 研究方法

食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

[対象]

急性心筋梗塞と診断され、再灌流療法をうけた20才以上の症例

[除外基準]

$\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬がすでに投与されている症例  
低血糖発作の既往のある症例  
その他、重篤な肝障害、腎障害や同意の得られない症例、不適当と考えられる症例

[方法]

エントリー時に $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬が投与されていない症例を無作為割付により2群にわけて、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬投与(ボグリボース、1回0.2mg 1日3回毎食直前)群と偽薬投与群に割り付ける。以後3年間フォローアップし心血管イベント、

心不全への進展、心筋リモデリングおよび糖尿病の発症につき2群間で比較検討する。またエントリ一時の顕性糖尿病の有無で層別解析をする。フォローアップ期間は6ヶ月ごとにデータ登録を行い、心血管イベントおよび糖尿病の状況(空腹時血糖、HbA1C)、内服状況を調査していく。

[目標症例数]

4000症例(コントロール群2000症例、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬群2000症例)

[参加予定施設]

全国100施設

国立循環器病センター、駿河台日本大学病院、りんくう総合医療センター市立泉佐野病院、宇和島市立宇和島病院、新別府病院など厚生科研 課題番号H14—心筋—006(JWIND試験)参加68施設に加え、計100施設での共同研究を計画している。

[中央予定施設]

国立循環器病センター

[評価項目]

プライマリーエンドポイント

心血管イベント(死亡、心疾患による入院、再梗塞、心不全、再インターベンション、CABG)

セカンダリーエンドポイント

死亡率

インターベンション後再狭窄

心筋リモデリング(心エコー、核医学検査、BNP)

慢性心不全への移行の抑制(心不全による入院、NYHA)

脳血管障害の発症

糖尿病の発症

[割り付け方法]

インターネットを利用した中央割付法

[サブスタディ]

データマイニング

フォローアップの際に、他の内服薬もすべて検討し、治療法最適化をデータマイニング法にて検討する。

SNPを用いた薬剤効果の検討

現在医療費の高騰から、テラーメイド医療の重要性が強く訴えられている。

$\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬の効果がみられた群とな

い群において各種動脈硬化関連遺伝子、心筋梗塞関連遺伝子、糖尿病関連遺伝子のSNPを用いて検討を行う。

[動物実験による検討]

糖尿病マウスを利用した、長期間高血糖状態がマウス心筋代謝に与える影響の検討

耐糖能異常の梗塞後心筋に与える影響を検討するため、KKAYなどの糖尿病マウスに心筋梗塞を作成し、高血糖状態に長期間さらされることによりいかなる遺伝子発現変化をきたすかをaffimetrix社製のmicro chipを利用して解析する。また $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬等の薬剤による遺伝子発現変化を検討し、また高血糖及びその是正による心筋代謝への影響を検討する。

マウス心筋梗塞モデル、およびイヌ心筋梗塞モデルにおける食後高血糖抑制による心不全予防効果の検討

糖尿病のない野生型マウス、およびイヌに心筋梗塞を作成し、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬(boglibose)を経口で投与し、心エコーなどを用いて心機能を検討する。

(倫理面への配慮)

以下の点を明記し、倫理委員会の承認手続きを経て研究を開始した。拡散か施設でも同様の手続きを開始している。

(21) 学研究及び医療行為の対象となる個人の  
人権の擁護

本研究は遺伝子情報を扱わず臨床情報のみの解析であるが、臨床データの収集は「連結匿名化」を行った上で中央解析施設(国立循環器病センター)に集積し、解析時には個人特定に繋がるデータとは切り離した状態での解析を行う。

(22) 医学研究及び医療行為の対象となる個人  
への利益と不利益

本研究で使用される薬剤は臨床の現場で日常使われている薬剤であり、開発途中のいわゆる治験薬とは根本的に異なる。本研究ではコントロール目標を立て厳密にコントロールするので、より細やかな治療を受けられる可能性がある。また検査項目に関して一般の診療に必要な物に限っており新たな採血等の必要がなく対象となる個人への負担は少ない。個人情報の保護に努めれば個人への不利益は少ないものと考えられる。



### (23) 医学的貢献度

我が国における心不全による死亡は全死因の第二位を占めており、その抑止は社会的急務となっている。特に心筋梗塞後の心機能低下に起因する慢性心不全については、5年生存率が50%以下と低いことから、その改善が急がれている。心筋梗塞後の心機能低下は再梗塞によりその危険性が増大する。心筋梗塞再発予防における大規模薬剤介入を念頭に置いた本研究は、医学的貢献度も非常に高いと考える。

### (24) 医学研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

患者さん用説明文書を用いて、研究遂行者の担当者が説明し、別紙の同意文書により同意を得る。

### (25) 動物を用いた実験について

動物実験は施設の倫理規定に基づき審査に通過した実験のみを行い、マウス等動物の生命を最大限尊重し、効率的に実験を進める。

## C. 研究結果

現在わが国において、心臓死は全国民死亡原因の第2位を占めている。なかでも慢性心不全患者は増加し続けており、その原因としては心筋梗塞後の心機能低下が重要である。くり返す入院、多種類の治療薬の使用は医療費増加につながり、厚生行政上の重要課題である。また臨床的見地から、梗塞後心不全患者のQOLは低く、健康寿命の延長のためにも梗塞後の心不全発症を抑制することは極めて重要な案件である。

くり返す心筋梗塞後の心機能低下に対して、二次予防および心筋リモデリング抑制というアプローチがあげられる。加齢そのものが発症のリスクファクターであるため、今後わが国が迎える超高齢化社会の到来にあたり、心筋梗塞二次予防の重要性が増している。一方で心筋梗塞のリスクファクターである生活習慣病のうち、その発症・予後に最も影響を与えるとされる糖尿病およびその予備軍は、生活習慣の変化、高齢化をうけて非常に勢いで増加している。したがって今後わが国の心筋梗塞二次予防において、耐糖能異常への新たな対処の必要性が高まっている。

血糖の上昇は酸化ストレスを引き起こすことが知られており、食後高血糖のみがすでに大血管障害のリスクとなり、心筋梗塞の発症リスクを高めることがわかっている(Donahue RP, et al. Diabetes 36: 689-692, 1987)。そこで心筋梗塞後の症例に対し

て、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬により食後の血糖上昇を抑えることが、心筋梗塞二次予防につながると考え我々は本研究を立案した。当該患者数が相当数にのぼる治療法は、当然のことながら検討段階から安全な薬剤の使用が必須である。われわれが考慮している $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬は、血中には原則取り込まれず、消化管にとどまり糖分の吸収を抑える薬剤であるため、幅広い患者層への適用が可能であると考えられる。

### 当該研究期間3年の研究計画

1年目 研究体制の整備、症例エントリーの開始、動物実験による検討

平成16年度は、参加予定施設とキックオフミーティングを行いプロトコルの確定をすると共にインターネット登録用のホームページを立ち上げた。中央施設である国立循環器病センターの倫理審査委員会を通過し予定通りエントリーが開始された。また、イヌ心不全モデルにおいて糖代謝に関連する遺伝子が変化しており、ヒト心不全症例での検討でも同様のことが見付かった。

2年目 症例のエントリー、エントリーされた症例の観察、動物実験による検討

H17年度は、参加施設にて倫理委員会の通過を得て、目標症例数を目指しエントリーを開始した。これまでに予備登録症例を含め約1100症例の登録が終了している。また、マウスTACモデルおよび慢性非虚血性心不全症例においてボグリボースが心不全を改善することが示唆された。このことから一過性高血糖は心不全の増悪因子であり、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤には心筋保護効果があると考えられた。

3年目 エントリーされた症例の観察、データ解析

## D. 考察

心機能と生体の糖利用は密接な関係にあることが基礎医学の成果として明らかになりつつある。本研究は大規模臨床研究にて、抗高血糖薬の投与により心筋梗塞二次予防が可能であるかを臨床的に検討するものであり、以下の結果が期待される。

1. 心筋梗塞の二次予防により慢性心不全患者の増加を抑制できれば、厚生行政面においては大幅な医療費抑制効果が期待され、また医療面においては患者のQOLの著明な改善、健康寿命の延長が期待できる。
2. 包括医療制度の導入により急性心筋梗塞を含

めた心血管イベントの発症数の減少は、そのまま医療費の抑制につながる。

H18年度は、これまでに登録された症例を観察(2年間)すると同時に、目標症例数(3000例)まで登録を進め、観察期間終了後に $\alpha$ グルコシダーゼ阻害薬の投与により血管イベントの再発予防が達成されるか解析を行う。

#### E. 結論

糖利用の正常化は、新しい心血管疾患の治療法になりうると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記なし

#### G. 研究発表

##### 9. 論文発表

特記なし

##### 10. 学会発表

特記なし

#### H. 知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

##### 13. 特許取得

特記なし

##### 14. 実用新案登録

特記なし

##### 15. その他

特記なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表 (主任及び分担研究者の業績一覧)

課題名：食後血糖上昇の抑制による心筋梗塞二次予防に関する大規模薬剤介入臨床研究

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	頁	出版年
Hirata A, <u>Tomoike H</u> (13 人省略 15 番目), Hori M, <u>Kitakaze M</u> .	Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts.	Cardiovasc Drugs Ther	19(1)	33-40	2005
Liao Y, <u>Tomoike H</u> (6 人省略 8 番目), Hori M, <u>Kitakaze M</u> .	Amlodipine ameliorates myocardial hypertrophy by inhibiting EGFR phosphorylation.	Biochem Biophys Res Commun	327(4)	1083-7	2005
Liao Y, <u>Tomoike H</u> (6 人省略 8 番目), Hori M, <u>Kitakaze M</u> .	Benidipine, a long-acting calcium channel blocker, inhibits cardiac remodeling in pressure-overloaded mice.	Cardiovasc Res	65(4)	879-88	2005
Li Y, <u>Kitakaze M</u> (13 人省略 last author).	Ablation of MEK kinase 1 suppresses intimal hyperplasia by impairing smooth muscle cell migration and urokinase plasminogen activator expression in a mouse blood-flow cessation model.	Circulation	111(13)	1672-8	2005
Fujita M, <u>Kitakaze M</u> (12 人省略 last author).	Aldosterone nongenomically worsens ischemia via protein kinase C-dependent pathways in hypoperfused canine hearts.	Hypertension	46(1)	113-7	2005
Liao Y, <u>Kitakaze M</u> (8 人省略 last author).	Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism.	Cardiovasc Res	67(4)	705-13	2005
Asanuma H, <u>Kim J</u> (3 人省略 5 番目)	A calcium channel blocker amlodipine increases coronary blood flow via both	J Mol Cell Cardiol	39(4)	605-14	2005

目), <u>Tomoike H</u> (6 人省略 12 番目), <u>Kitakaze M</u> .	adenosine- and NO-dependent mechanisms in ischemic hearts.				
Tsukamoto O, Asanuma H, <u>Kim J</u> , <u>Tomoike H</u> (7 人省略 11 番目), <u>Kitakaze M</u> .	A role of opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning via activation of protein kinase C in the canine heart.	Biochem Biophys Res Commun	338(3)	1460-6	2005
Komamura K, Sasaki T, Hanatani A, <u>Kim J</u> , <u>Kitakaze M</u> , (10 人省略 last author).	Heart-type fatty acid binding protein is a novel prognostic marker in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy.	Heart.(in press).			
Tsukamoto O, <u>Kitakaze M</u> (14 人省略 last author).	Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice.	Biochem Biophys Res Commun	340(4)	1125-33	2006
Terashita K, <u>Tomoike H</u> (4 人省略 last author).	Increased endothelin-1 levels of BAL fluid in patients with pulmonary sarcoidosis.	Respirology	11(2)	145-51	2006
Kajimoto K, Shioji K, Tago N, <u>Tomoike H</u> , (以下 3 人省略).	Assessment of MEF2A mutations in myocardial infarction in Japanese patients.	Circ J	69(10)	1192-5	2005
後藤葉一、友池仁暢	3.虚血性心筋症の疫学 Ischemic Heart Disease(IHD)	Frontier	6(6)	29-35	2005
Kosuge M, <u>Yamagishi M</u> (9 人省略 11 番目、以下 6 人省略 last author).	on behalf of the Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators.	Circ J	70(3)	217-21	2006
Maruo T, Nakatani S, Kanzaki H, Kakuchi H, <u>Yamagishi M</u> , <u>Kitakaze M</u> , Ohe T,	Circadian variation of endothelial function in idiopathic dilated cardiomyopathy.	Am J Cardiol	97(5)	699-702	2006

Miyatake K.					
Lazarevic AM, <u>Nakatani S</u> , <u>Yamagishi M</u> (6 人省 略 9 番目), Miyatake K.	Determinants of rapid progression of aortic root dilatation and complications in Marfan syndrome.	Int J Cardiol	106(2)	177-82	2006
<u>Yamagishi M</u> , <u>Tomoike H</u> (7 人省略 9 番目、以下 1 人省 略).	Sustained upregulation of inflammatory chemokine and its receptor in aneurysmal and occlusive atherosclerotic disease: results from tissue analysis with cDNA macroarray and real-time reverse transcriptional polymerase chain reaction methods.	Circ J	69(12)	1490-5	2005
Ishihara M, <u>Yamagishi M</u> (8 人省 略 10 番目、以下 6 人 省略).	Japanese Acute Coronary Syndrome Study Investigators. Acute hyperglycemia is associated with adverse outcome after acute myocardial infarction in the coronary intervention era.	Am Heart J	150(4)	814-20	2005
Saito S, <u>Yamagishi M</u> (5 人省略 7 番目), Yagihara T, Kitamura S.	Successful excision of a cystic tumor of the atrioventricular nodal region.	Circ J	69(10)	1293-4	2005
Higo S, Uematsu M, <u>Yamagishi M</u> (以下 6 人省略).	S.Elevation of plasma matrix metalloproteinase-9 in the culprit coronary artery in patients with acute myocardial infarction: clinical evidence from distal protection.	Circ J	69(10)	1180-5	2005
Nagaya N, <u>Yamagishi M</u> (8 人省 略 10 番目 ), Tokudome T, Mori H,	Related f mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy.	Circulation	112(8)	1128-3 5	2005

Miyatake K, Kitamura S.					
Kojima S, <u>Yamagishi M</u> (4 人省略 6 番目、 以下 9 人省略).	Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators. Prognostic usefulness of serum uric acid after acute myocardial infarction (the Japanese Acute Coronary Syndrome Study).	Am J Cardiol	96(4)	489-95	2005
Higashikata T, <u>Yamagishi M</u> , <u>Tomoike H</u> (7 人省略 10 番目), Sakamoto A.	Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method.	Atherosclerosis	185(1)	165-72	2006
Kosuge M, <u>Yamagishi M</u> (9 人省略 11 番目), Ikeda Y, Shirai M, Hiraoka H, Inoue T, Saito F, Ogawa H.	Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators. Beneficial effect of preinfarction angina on in-hospital outcome is preserved in elderly patients undergoing coronary intervention for anterior acute myocardial infarction.	Circ J	69(6)	630-5	2005
Kosuge M, <u>Yamagishi M</u> (10 人省略 12 番目), Ikeda Y, Shirai M, Hiraoka H, Inoue T, Saito F, Ogawa H.	Japanese Acute Coronary Syndrome Study (JACSS) Investigators. Effects of glucose abnormalities on in-hospital outcome after coronary intervention for acute myocardial infarction.	Circ J	69(4)	375-9	2005
Ogata T, Yasaka M, <u>Yamagishi M</u> (以下 3 人省略).	Atherosclerosis found on carotid ultrasonography is associated with atherosclerosis on coronary intravascular ultrasonography	J Ultrasound Med	24(4)	469-74	2005
Abe K, <u>Yoshimasa Y</u> (7 人省略 9 番目), Saito Y, Nakao K,	Increase in the transcriptional activity of the endothelial nitric oxide synthase gene with fluvastatin:a relation with	Pharmacogenetics Genomics	15	329-33 6	2005

Yasue H, Ogawa H.	-786T>C polymorphism.				
Okazawa K, <u>Yoshimasa Y</u> (以下 8 人省略).	The haplotypes of the IRS-2 gene affect insulin sensivity in Japanese patients with type 2 deabetes.	Diabetes Res. Clin. Pract.	68	39-48	2005
Kouyama R, <u>Yoshimasa Y</u> (7 人省 略 9 番目), Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, Ogawa Y.	Attenuation of diet-Induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin □type 1a receptor.	Endocrinology.	146(8)	3481-3489	2005
Horio T, <u>Yoshimasa Y</u> (9 人省略 11 番目), Kawano Y.	Pioglitazone improves left ventricular diastolic function in patients with essential hypertension.	Am J Hypertens.	18	949-957	2005

## BASIC PHARMACOLOGY

# Erythropoietin Just Before Reperfusion Reduces Both Lethal Arrhythmias and Infarct Size via the Phosphatidylinositol-3 Kinase-Dependent Pathway in Canine Hearts

Akio Hirata<sup>1</sup>, Tetsuo Minamino<sup>1</sup>, Hiroshi Asanuma<sup>1</sup>, Shoji Sanada<sup>1</sup>, Masashi Fujita<sup>1</sup>, Osamu Tsukamoto<sup>1</sup>, Masakatsu Wakeno<sup>2</sup>, Masafumi Myoishi<sup>2</sup>, Ken-ichiro Okada<sup>1</sup>, Hidekazu Koyama<sup>1</sup>, Kazuo Komamura<sup>3</sup>, Seiji Takashima<sup>1</sup>, Yoshiro Shinozaki<sup>4</sup>, Hidezo Mori<sup>3</sup>, Hitonobu Tomoike<sup>3</sup>, Masatsugu Hori<sup>1</sup>, and Masafumi Kitakaze<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine and Therapeutics, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan;

<sup>2</sup>Department of Bioregulatory Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan;

<sup>3</sup>Cardiovascular Division of Internal Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; <sup>4</sup>Department of Physiological Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan

**Summary.** Although recent studies suggest that erythropoietin (EPO) may reduce multiple features of the myocardial ischemia/reperfusion injury, the cellular mechanisms and the clinical implications of EPO-induced cardioprotection are still unclear. Thus, in this study, we clarified dose-dependent effects of EPO administered just before reperfusion on infarct size and the incidence of ventricular fibrillation and evaluated the involvement of the phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase in the *in vivo* canine model. The canine left anterior descending coronary artery was occluded for 90 min followed by 6 h of reperfusion. A single intravenous administration of EPO just before reperfusion significantly reduced infarct size (high dose (1,000 IU/kg):  $7.7 \pm 1.6\%$ , low dose (100 IU/kg):  $22.1 \pm 2.4\%$ , control:  $40.0 \pm 3.6\%$ ) in a dose-dependent manner. Furthermore, the high, but not low, dose of EPO administered as a single injection significantly reduced the incidence of ventricular fibrillation during reperfusion (high dose: 0%, low dose: 40.0%, control: 50.0%). An intracoronary administration of a PI3 kinase inhibitor, wortmannin, blunted the infarct size-limiting and anti-arrhythmic effects of EPO. Low and high doses of EPO equally induced Akt phosphorylation and decreased the equivalent number of TUNEL-positive cells in the ischemic myocardium of dogs. These effects of EPO were abolished by the treatment with wortmannin. In conclusion, EPO administered just before reperfusion reduced infarct size and the incidence of ventricular fibrillation via the PI3 kinase-dependent pathway in canine hearts. EPO administration can be a realistic strategy for the treatment of acute myocardial infarction.

**Key Words.** erythropoietin, myocardial infarction, ventricular arrhythmia, phosphatidylinositol-3 kinase, ischemia-reperfusion injury, apoptosis

## Introduction

Recent studies have extended the traditional role of erythropoietin (EPO) from a mediator of erythroid maturation to one that provides protection against apoptotic cell death [1,2]. Recombinant human EPO (rhEPO) has been shown to exert marked protective effects against ischemia/reperfusion injury in rats and rabbits when rhEPO is administered at different time points [3–8]. Indeed, rhEPO reduced myocardial infarct size, enhanced recovery of left ventricular developed pressure, reduced the number of apoptotic cells, and induced the phosphorylation of Akt [3–8]. In these studies, high (1,000–5,000 IU/kg) doses of rhEPO, nearly 10 times higher than that used in anemic patients with chronic renal failure [9], have been applied. Recently, it was reported that phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase

Address for correspondence: Tetsuo Minamino, MD, PhD, Department of Internal Medicine and Therapeutics, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, Tel.: 81-6-6879-3635; Fax: 81-6-6879-3473; E-mail: minamino@medone.med.osaka-u.ac.jp



activity is required for rhEPO to recover contractile dysfunction and to block apoptosis induced by myocardial ischemia-reperfusion in isolated hearts (*ex vivo*) [10]. However, it is not determined whether rhEPO just before reperfusion reduces infarct size via PI3 kinase-dependent pathway in the *in vivo* model.

In addition to myocardial cell death, myocardial ischemia-reperfusion triggers lethal arrhythmias [11]. It is believed that at least half of the deaths due to coronary artery disease are caused by a lethal arrhythmia [12]. Although high doses of rhEPO exert cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury in small animals [3–8], its effects on lethal arrhythmias remain unknown. If rhEPO reduces the incidence of ventricular fibrillation (VF) in the clinical setting, there would be additional advantage to use this drug in the realistic situation of acute myocardial infarction. Thus, in the present study, we examined dose-dependent effects of rhEPO administered just before reperfusion on myocardial infarct size and the incidence of VF in the *in vivo* canine model. We also evaluated whether any such effects were mediated via the PI3 kinase pathway.

## Materials and Methods

### Materials

Wortmannin was obtained from Sigma (St. Louis, MO) and Phospho-Akt and Akt antibodies were obtained from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). RhEPO was provided by Chugai Pharmaceutical Co., Ltd (Tokyo, Japan).

### Instrumentation

Forty-eight beagle dogs (Kitayama Labes, Yoshiki Farm, Gifu, Japan) weighing 8 to 12 kg were anesthetized by an intravenous injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg), intubated, and ventilated with room air mixed with oxygen (100% O<sub>2</sub> at flow rate of 1.0 to 1.5 L/min). Thoracotomy was done at the left fifth intercostal space, and the heart was suspended by a pericardial cradle. After intravenous administration of heparin (500 U/kg), the left anterior descending coronary artery (LAD) was cannulated for perfusion with blood from the left carotid artery through an extracorporeal bypass tube. Coronary blood flow was measured with an electromagnetic flow probe attached to the bypass tube. We can selectively infuse drugs into LAD-perfused areas through this bypass tube. The left atrium was catheterized for microsphere injection to measure myocardial collateral blood flow during ischemia. Hydration was maintained by a slow normal saline infusion. The femoral artery was also cannulated to measure the mean systemic blood pressure (SBP). Both SBP and heart rate (HR) were monitored continuously during the study. All procedures were performed in conformity with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85–23, 1996 revision), and were approved by the

Osaka University Committee for Laboratory Animal Use.

### Experimental protocols

**Protocol 1. Long-term effects of rhEPO on hematometric parameters in dogs.** To test the long-term effects of rhEPO on hematometric parameters, 100 IU/kg ( $n = 5$ ) or 1,000 IU/kg ( $n = 5$ ) of rhEPO was intravenously administered as a single injection. Blood was collected under pentobarbital (15 mg/kg) anesthesia before and 7, 14 days after rhEPO treatment. Hematometric parameters including hematocrit, white blood cell, and platelet counts were measured.

**Protocol 2; Measurement of infarct size, coronary blood flow and myocardial collateral blood flow.** After hemodynamic stabilization, we administered a low (100 IU/kg), or high (1,000 IU/kg) dose of rhEPO, or saline 10 min prior to reperfusion ( $n = 8$ –12 each) as a single intravenous injection (Fig. 1). To clarify whether rhEPO reduces myocardial infarct size through a PI3 kinase-dependent pathway, a PI3 kinase inhibitor, wortmannin, was selectively administered into the LAD (1.5  $\mu$ g/kg/min) for 60 min after the onset of reperfusion. We have previously confirmed that the dose of wortmannin employed in this study is appropriate for blocking the phosphorylation of Akt in myocardium [13]. We measured infarct size and regional myocardial collateral blood flow during 90 min of ischemia as described previously [14]. In brief, infarct size was evaluated at the end of the protocol by Evans blue/TTC staining, while collateral blood flow was assessed by the non-radioactive microsphere method [14]. Coronary blood flow was monitored continuously during the study. To ensure that all of the animals included in the data analysis were healthy and were exposed to a similar extent of ischemia, the exclusion criteria reported previously for excessive myocardial collateral blood flow ( $>15$  mL/100 g/min) and lethal arrhythmia (more than two consecutive attempts required to convert VF with low-energy DC pulses applied directly to the heart) were adopted [14].

### Effects of rhEPO on VF during reperfusion period

In Protocol 2, we also evaluated the incidence of VF during the 6 h reperfusion period (Fig. 1). Since myocardial collateral blood flow during ischemia exhibited a negative correlation with the incidence of VF [15,16], the dogs with excessive collateral blood flow ( $>15$  mL/100 g/min) were excluded from VF analysis.

### Phosphorylation of Akt

We used 12 dogs for western blot in the control, low EPO, high EPO, and high EPO + WTMN groups ( $n = 3$  each) in Protocol 2 (Fig. 1). After 90 min of ischemia followed by 6 h of reperfusion, hearts were excised and

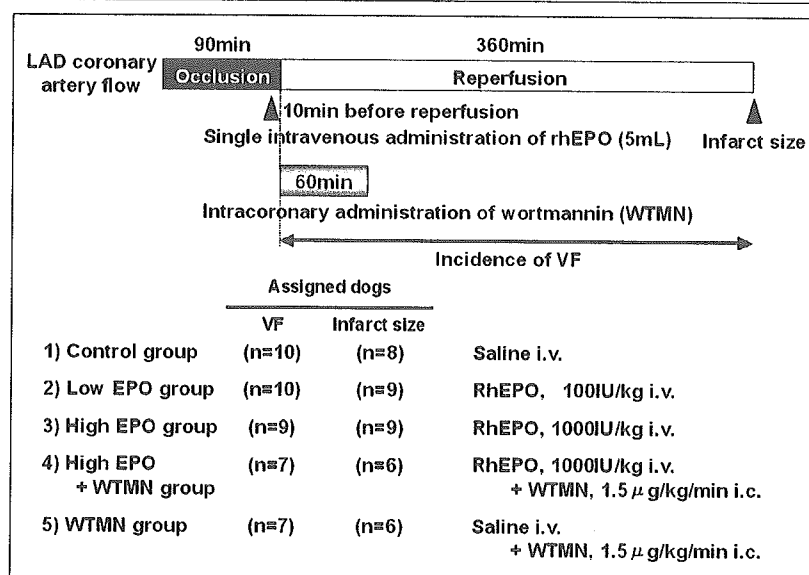


Fig. 1. Experimental protocol for infarct size and VF.

the myocardial tissue in the ischemic zone was quickly placed into liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Phosphorylation of Akt and total content of Akt were evaluated as reported previously [13]. The immunoreactive bands were quantified by densitometry (Molecular Dynamics).

#### Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)

In Protocol 2, the myocardial tissue samples were taken from the ischemic zone of dogs in the control, low EPO, high EPO, and high EPO + WTMN groups ( $n = 3$  each). These were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, and serially sectioned in the frontal plane at 5- $\mu\text{m}$  thickness. Analysis by TUNEL method was performed according to the protocol supplied with the in situ apoptosis detection kit, the Apop Tag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (CHEMICON International, USA). TUNEL-positive cell nuclei and total cell nuclei stained methylgreen were counted in 10–15 random high-power fields ( $\times 400$ ), and the percentage

of TUNEL-positive cell nuclei to total cell nuclei ( $n = 1,000$ ) were then calculated.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed by one-way fractional analysis of variance (ANOVA) with modified Bonferroni's post hoc test when the data were compared among groups. Time courses of the changes were compared by repeated measures ANOVA. The incidence of VF was compared using the  $\chi^2$ -test and Fisher's exact probability test. Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM, with  $p < 0.05$  considered significant.

#### Results

##### The long-term effects of rhEPO on hematometric parameters

The single administration of either 100 IU/kg or 1,000 IU/kg of rhEPO did not change any hematometric parameters including hematocrit, white blood cells, and platelet counts 7 or 14 days after rhEPO treatment (Table 1).

Table 1. Long-term effects of rhEPO on hematometric parameters in dogs

Parameters	EPO 100 IU/kg			EPO 1000 IU/kg		
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 0	Day 7	Day 14
Ht (%)	50.1 $\pm$ 0.8	51.1 $\pm$ 0.9	51.3 $\pm$ 1.0	51.5 $\pm$ 1.3	52.0 $\pm$ 1.0	53.1 $\pm$ 0.7
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	11.7 $\pm$ 1.3	12.1 $\pm$ 0.7	11.4 $\pm$ 0.6	11.5 $\pm$ 1.3	11.7 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 1.0
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	33.7 $\pm$ 2.0	33.7 $\pm$ 1.8	33.3 $\pm$ 1.7	33.2 $\pm$ 1.9	34.0 $\pm$ 2.4	36.4 $\pm$ 3.4

Data are presented as Mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$ .

Abbreviations: rhEPO = recombinant human erythropoietin, Ht = hematocrit, WBC = white blood cell.

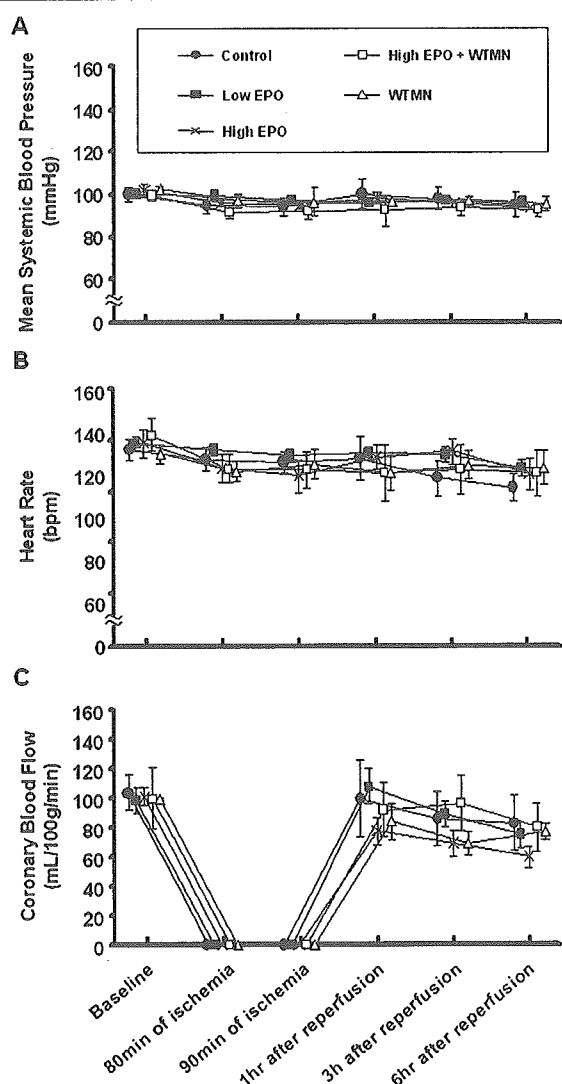


Fig. 2. The changes in mean systemic blood pressure, heart rate and coronary blood flow during the experiment in groups tested.

#### Effects of rhEPO on infarct size and VF during the reperfusion period

Since 5 of 48 dogs were excluded from analysis because of excessive collateral blood flow ( $>15$  mL/100 g/min) (control: 1, low EPO: 2, high EPO: 1, high EPO + WTMN: 0, WTMN: 1), 43 dogs were evaluated for VF analysis. Among these 43 dogs, we excluded 5 dogs (control: 2, low EPO: 1, high EPO: 0, high EPO + WTMN: 1, WTMN: 1) that matched the exclusion criteria of lethal arrhythmia from infarct size analysis.

Throughout the study, neither SBP (Fig. 2A), nor HR (Fig. 2B), nor coronary blood flow (Fig. 2C) differed among the 5 groups. The area at risk (Fig. 3A) and myocardial collateral blood flow in the LAD region during myocardial ischemia (Fig. 3B) were also comparable in the groups tested.

Table 2. Effects of rhEPO on the incidence of VF during reperfusion periods

Group	Incidence of VF	
Control	50.0%	(5/10)
Low EPO	40.0%	(4/10)
High EPO	0%*	(0/9)
High EPO + WTMN	42.9%	(3/7)
WTMN	42.9%	(3/7)

\*  $p < 0.05$  vs. control group.

Abbreviations: VF = ventricular fibrillation, rhEPO = recombinant human erythropoietin, WTMN = wortmannin.

Figure 4 shows infarct size in the groups tested. A low or high dose of rhEPO significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the infarct size compared with that in the control group. Furthermore, a high dose of rhEPO reduced infarct size more than a low dose of rhEPO did. The intra-coronary administration of wortmannin for 60 min after the onset of reperfusion abrogated the infarct-limiting effect of rhEPO, although wortmannin alone did not affect infarct size.

The high, but not low, dose of rhEPO significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the incidence of VF during the 6 h reperfusion period compared with the control. The anti-arrhythmic effects of rhEPO were abolished by wortmannin (Table 2).

#### Effects of rhEPO on Akt phosphorylation

After 90 min of ischemia followed by 6 h of reperfusion, the ratio of phosphorylated Akt to total Akt in the low and high EPO groups significantly ( $p < 0.05$ ) increased compared with that in the control group. The increase in this ratio was completely abolished by the treatment with wortmannin (Fig. 5).

#### Effects of rhEPO on apoptosis

The ratio of TUNEL positive cells to total cells in the low and high EPO groups decreased compared with that in the control group. The reduction of TUNEL-positive cells by rhEPO was completely abolished by the treatment with wortmannin (Fig. 6).

#### Discussion

In this study, we demonstrated that a single intravenous administration of rhEPO just before reperfusion limited not only infarct size but also the incidence of VF. Moreover, our data suggest that the infarct size-limiting and anti-arrhythmic effects of rhEPO were through the PI3 kinase-dependent pathways in the *in vivo* canine hearts.

Important considerations towards clinical application of rhEPO are the timing and dose of its administration. The previous studies reported that rhEPO administered at the onset of reperfusion [7,8] as well

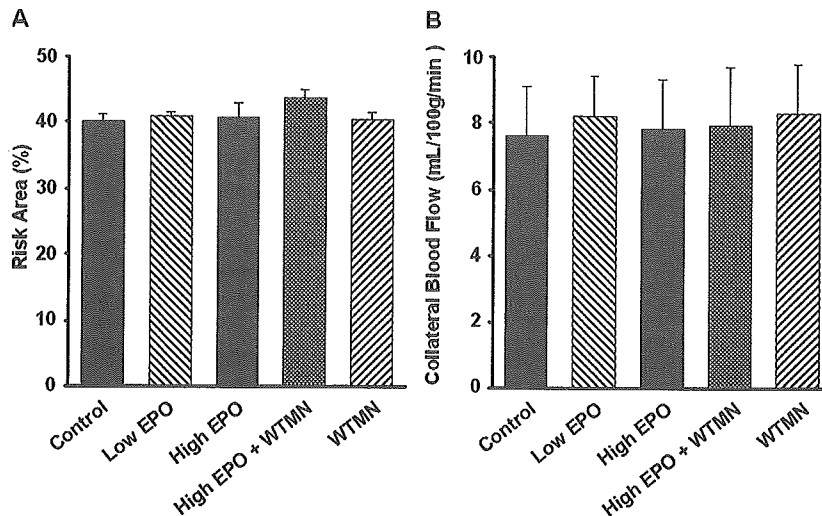


Fig. 3. Area at risk and myocardial collateral blood flow during ischemia in groups tested.

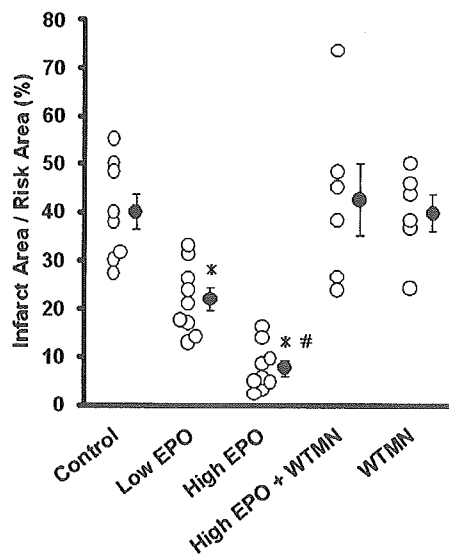


Fig. 4. Infarct size in groups tested. \* $p < 0.05$  vs. control group. # $p < 0.05$  vs. low EPO group. Open circles show the infarct size in each individual.

as ischemia [7,8] reduces infarct size in rabbit and rat hearts. Consistent with these reports, we confirmed that rhEPO administered 10 min before reperfusion reduced myocardial infarct size in dogs. Our findings support the idea that in humans the adjunctive therapy with rhEPO treatment during coronary intervention would reduce myocardial infarct size.

The doses of rhEPO (1,000–5,000 IU/kg) administered in previous experimental studies [3–8] were nearly 10 times higher than those clinically used in anemic patients with chronic renal failure [9]. In the

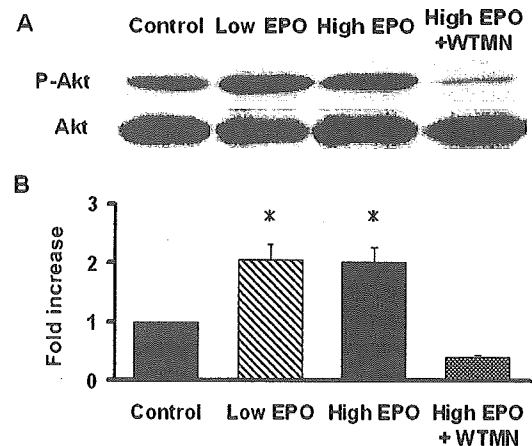


Fig. 5. Phosphorylation of Akt in canine hearts. (A) Representative Western blot for phosphorylated and total Akt. (B) Densitometry graphs indicating fold expression over control for Akt.  $n = 3$  each. \* $p < 0.05$  vs. control group.

present study, we demonstrated that both 100 IU/kg and 1,000 IU/kg of rhEPO as a single administration significantly reduced myocardial infarct size, although a high dose of rhEPO significantly reduced infarct size more than a low dose of rhEPO did. This finding suggests that the clinically relevant dose of rhEPO used in patients with chronic renal failure can reduce myocardial infarct size. In the previous clinical studies, a high dose (33,000 IU once daily for the first 3 days) of intravenously administered rhEPO was well tolerated in patients with stroke and improved clinical outcome at 1 month [17]. On the other hand, a high dose (40,000–60,000 IU per week) of subcutaneously administered rhEPO, while not as a single injection,