

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10642

研究課題名(和文) 周術期心不全治療のための水チャンネル・アクアポリンの研究

研究課題名(英文) Study of water channel aquaporin for treatment of perioperative heart failure

研究代表者

網谷 亮輔 (Amitani, Ryosuke)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30763594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工心肺を使用した心臓手術を施行した患者の周術期(術前, 第1, 4, 7病日)の血中AVPと尿中AQP2の変化を検討した。血中AVPは第1病日には有意に一過性上昇を示し, 第4病日には減少に転じていることが認められた。尿中AQP2排泄は同様の変化がみられた。人工心肺をしないオフポンプ冠動脈バイパス術の患者の場合, 血中AVPの変化はpump症例と同様であったが, 尿中AQP2排泄は緩やかな変化であった。ランゲンドルフ灌流実験においてAQP7欠損がSt Thomas心筋保護液の効果に与える影響をAQP7-Knockoutマウスを作成して行い, 25分虚血に対してSt Thomas心筋保護液は効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血漿バソプレッシンは体液量と血漿浸透圧の調節を行っているが, 心不全患者では腎集合管へ作用し水チャンネルであるアクアポリン2を介して体液貯留・浮腫の一因となる。心臓血管外科領域においても術中侵襲により血漿バソプレッシンが上昇することは知られてきたが, 本研究により血漿バソプレッシン増加に相関して尿中アクアポリン2排泄の増加がみられ, 術後患者でもこのメカニズムが維持されていることが判明した。また, 肥満患者ではアクアポリン7チャンネルが欠損していることが示唆されているが, マウスを用いた基礎実験により心筋のアクアポリン7欠損状態でもSt Thomas2号液による心筋保護効果は発揮されることが証明された。

研究成果の概要(英文)：We examined changes in plasma AVP and urinary AQP2 during perioperative period (before operation, on the first, fourth and seventh postoperative day) in patients who underwent cardiac surgery using cardiopulmonary bypass. The plasma AVP showed a transient increase significantly on the first postoperative day, and turned to decrease on the fourth postoperative day. Urinary AQP2 excretion showed similar changes. In patients undergoing off-pump coronary artery bypass grafting, postoperative plasma AVP and urinary AQP2 levels were elevated similar to those with cardiopulmonary bypass. AQP7, a member of the aquaglyceroporin family that is permeated by glycerol and water, has been observed in cardiac tissue. We have investigated a protective efficacy of STH2 in an experimental preparation of isolated AQP7 knock-out murine hearts. We demonstrated the myocardial protection afforded by STH2 even through AQP7 was absent.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：アクアポリン2 アクアポリン7 心筋保護 周術期管理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国における高齢者の増加は内閣府の推計でも更なる加速が言われており、冠動脈疾患や弁膜症で心臓手術を必要とする高齢者も確実に増加する。しかし、75歳以上の後期高齢者では肺や腎臓などの併存疾患の多さ、また全身諸臓器の予備能の低さから開心術や人工心肺使用の侵襲が足枷となることも少なくない。オフポンプ冠動脈バイパス術や経カテーテル大動脈弁置換術など術式の工夫もさることながら、手術成績向上のためには人工心肺使用の侵襲を軽減する取り組みも急務である。アクアポリンは6回膜貫通型のタンパクで、水チャンネルとして機能しており、ある程度組織特異性をもって様々な組織に発現している。アクアポリン・ファミリーは現在までに13種類のアクアポリンアイソフォーム(AQP0-AQP12)が確認されており、水を選択的に透過させる古典的なアクアポリン(AQP1, AQP2, AQP4, AQP5)と、水およびグリセロールを透過させるアクアグリセロポリン(AQP3, AQP7, AQP9, AQP10)と、これら2つに分類されない(AQP6, AQP8, AQP11, AQP12)グループがある(Matsuzaki T; J Nippon Med Sch 2009, 5: 118-124)。心臓外科領域においては、人工心肺使用時や心筋保護液による心停止の際におきる心筋浮腫の一因としてAQP1の関与が中動物実験にて示されており、これはcGMPの活性化を介することが示唆されている(Fang-Bao D; Cell Physiol Biochem 2013, 32: 1320-1330, Yumei Y; Int J Mol Med 2013, 31: 637-643)。心臓においてはAQP1とAQP7が発現しておりAQP1が水のみを透過させるアクアポリンであることから、AQP7がグリセロールチャンネルとして機能し、心筋細胞内へのグリセロール取り込みに重要な役割を果たしている。このグリセロールが細胞内ATP含有量の増加へ寄与している可能性があり、心不全の発症機序への関与が示唆されている(Hibuse T; Cardiovasc Res 2009, 83: 34-41)。AQP2は腎臓の集合管に特異的に分布し、血中バソプレシン(ADH/AVP)濃度により影響を受け、cAMPを介して調節されることが分かっている。うっ血性心不全では、バソプレシンの分泌が亢進し集合尿細管において水の再吸収が増加し、浮腫が亢進する。臨床では、心不全治療薬としてバソプレシンV₂受容体拮抗薬による治療が導入され効果を上げている。最近、臨床例の蓄積から治療効果が顕著なresponderと反応が乏しいnon-responderが存在することが明らかとなってきた。その線引きとなるパラメータとして、尿浸透圧やAQP2についての研究が報告されるようになってきている(Imamura; Circ J 2013, 77: 1208-1213, Imamura; Circ J 2014, 78: 2240-2249)。

2. 研究の目的

周術期の心不全治療の改善の手がかりを探るため、水チャンネルのアクアポリン・ファミリーのうちAQP2とAQP7に着目する。

【課題1】AQP2に関する検討

心臓手術患者を対象に観察研究を行う。人工心肺を要する心臓手術および人工心肺を使用しない冠動脈バイパスの際のバソプレシン(Arginine vasopressin: AVP)の血中濃度と尿中AQP2排泄の変動を測定し、人工心肺使用の影響や周術期因子との相関を検証する。

【課題2】AQP7に関する検討

術中心筋保護における役割を明らかにするためAQP7-knock outマウスの摘出心を使用し、Langendorff灌流モデルを用いた基礎実験を行う。実際の臨床で用いられているSt Thomas 2号液による心筋保護作用が、AQP7欠損状態ではどのように作用するかを検証する。判定項目として、心機能の回復率や心筋障害の程度、心筋浮腫を評価する。

3. 研究の方法

【課題1】AQP2についての検討

【予備研究】人工心肺を使用した大動脈弁置換術を施行する患者 3 例の術前，第 1 病日，第 7 病日，1 ヶ月後の血中 AVP と尿中 AQP2 を測定する．この結果から，測定期間を決定する．

【本研究】人工心肺を使用した大動脈弁置換術を施行する患者の術前，第 1 病日，第 4 病日，第 7 病日の血中 AVP と尿中 AQP2 を測定する．

【本研究】オフポンプ冠動脈バイパス術を施行する患者の術前，第 1 病日，第 4 病日，第 7 病日の血中 AVP と尿中 AQP2 を測定する．

【課題 2】AQP7 についての検討

C57/BL6 マウスをベースに AQP7 欠損マウス(AQP7-Knock-out:AQP7-KO)を作成する．この AQP7-KO マウスと野生型マウス(Wild type:WT)を使用し，その摘出心と通常 Langendorff モデルを用いて灌流実験を行う．

【予備実験：虚血時間 X 分の決定】虚血時間を 10 分，20 分，25 分，30 分，40 分と変化させて左室発生圧の回復率を測定し，30%程度となる時間(X 分)を探索する．次に AQP7-KO マウスにおいて虚血時間 X 分およびその前後の回復率を検討した．

【予備実験：週数の決定】予備実験で決定した虚血時間を用いて，KO マウスの 9-11 週(Early adult 群)と 13-16 週(Adult 群)で比較検討する．

【本実験：StThomas 2 号液による心筋保護効果の検討】

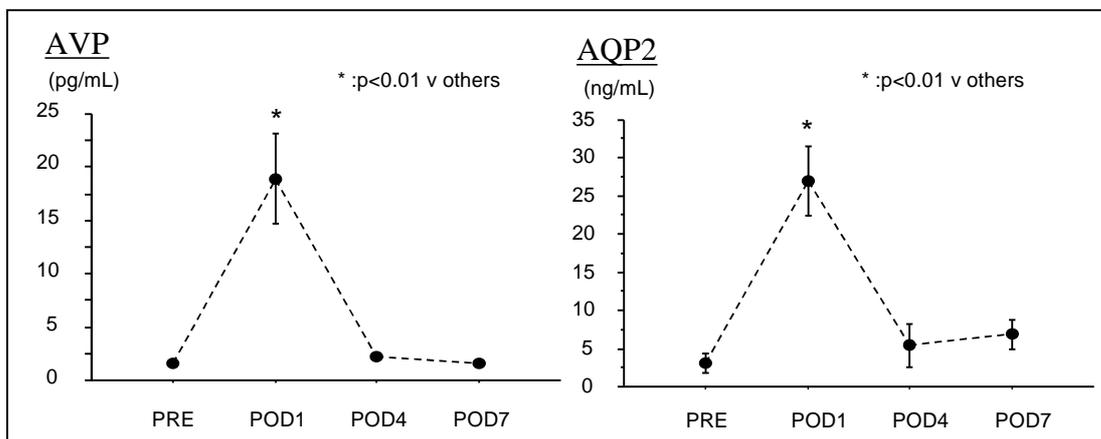
Langendorff モデルを使用して AQP7-KO マウスの摘出心による灌流実験を行う．20 分 KHB 灌流後，コントロール群：虚血時間 X 分・STH2 群：St Thomas 2 号液 5 分 + 虚血時間 X-5 分，その後 60 分間の再灌流を行う．心筋保護効果を心拍数や心機能回復率，冠灌流圧などのパラメータや心筋障害の程度(Troponin T)，心筋浮腫の程度を分析する．

4. 研究成果

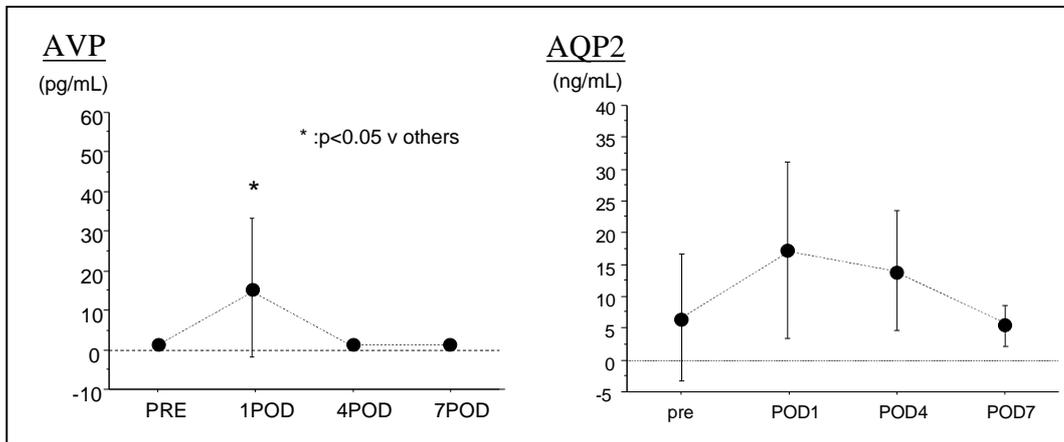
【課題 1】AQP2 についての検討

【予備研究】人工心肺を使用する大動脈弁置換術(Pump 群)を施行した症例の術前，第 1 病日，第 7 病日，術 1 ヶ月後の AVP と AQP2 の変化を検討したところ AVP・AQP2 のいずれも第 1 病日には有意に上昇を示し，第 7 病日には術前値に復し 1 ヶ月後も同様であった．

【本研究】人工心肺を使用した大動脈弁置換術を施行した 9 例の術前，第 1 病日，第 4 病日，第 7 病日の AVP と AQP2 の変化を検討した．AVP，AQP2 いずれの変化も第 1 病日には有意に一過性上昇を示し，第 4 病日には減少に転じていることが認められた．また，AVP と AQP2 には強い正の相関が見られた ($r=0.817$ $p<0.0001$)．

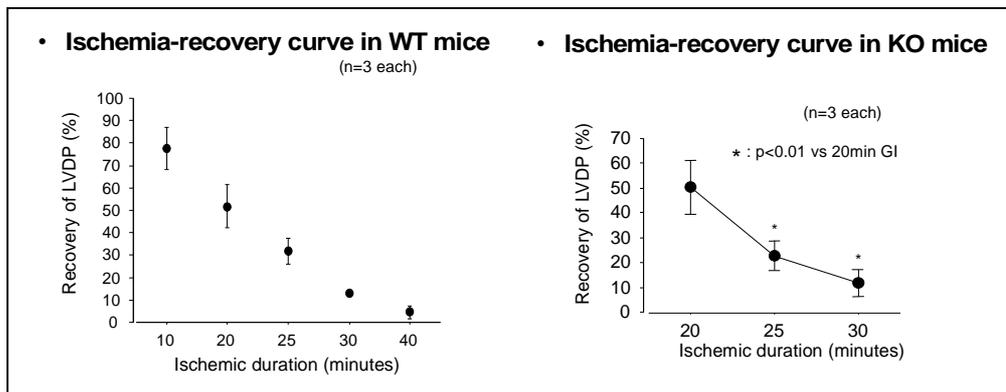


【本研究】オフポンプ冠動脈バイパス術(OPCAB)の症例の AVP と AQP2 の変化を検討するため，対象 6 例のデータ収集を実施した．術術期の AVP 変化は Pump 群と同様であったが，AQP2 変化は緩やかであった．



【課題2】AQP7 についての検討

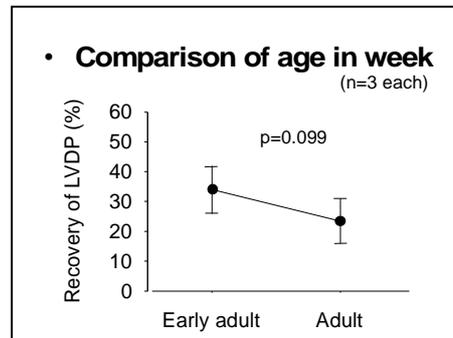
【予備実験 : 虚血時間 X 分の決定】



WT マウスの検討から、虚血時間 20 分、25 分、30 分を選択し AQP7-KO マウスで測定した結果、虚血時間を 25 分に決定した。

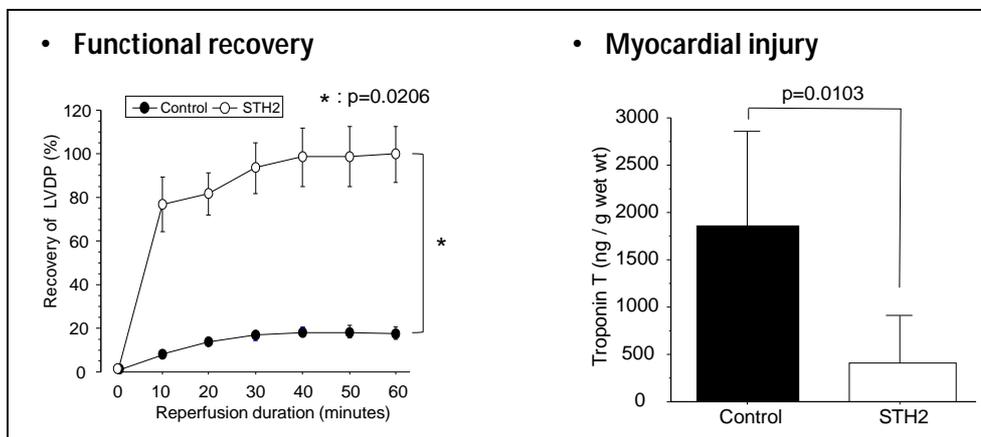
【予備実験 : 週数の決定】

虚血時間 25 分を用いて AQP7-KO マウスの 9-11 週 (Early adult 群) と 13-16 週 (Adult 群) で比較検討した結果、Adult 群で再灌流後の回復率がやや劣る傾向が見られた。本実験では、13 週以降のマウスを使用することとした。



【本実験 : StThomas 2 号液による心筋保護効果の検討】

25 分虚血に対する StThomas 2 号液の心筋保護効果に AQP7 欠損が与える影響を検討するため、AQP7-KO のマウスの摘出心を用いたランゲンドルフ灌流実験を行った結果、AQP7 欠損状態でも心筋保護効果を発揮した。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

藤井正大 他 , Change of perioperative aquaporin 2 in cardiac surgical patients. 第 70 回日本胸外外科学会定期学術集会 2017 年 10 月札幌

Masahiro Fujii et al , Perioperative Response of Aquaporin-2 in Cardiac Surgery. 第 82 回日本循環器学会学術集会 2018 年 3 月金沢

Masahiro Fujii et al , Perioperative Response of Aquaporin-2 in Off-pump Coronary-Artery Bypass Surgery. 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会 2018 年 10 月東京

藤井正大 他 ,OPCAB 周術期における バソプレッシン濃度と血漿および尿浸透圧について. 第 32 回日本冠疾患学会学術集会 2018 年 11 月熊本

Masahiro Fujii et al , Experimental Study On Myocardial Protection and Aquaporin 7. Annual Meeting 2019 of Society for Cardiothoracic Surgery in Great Britain & Ireland March 2019 , London

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤井正大

ローマ字氏名：Masahiro Fujii

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 60297926

研究分担者氏名：別所竜蔵

ローマ字氏名：Ryuzo Bessho

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60281432

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。