

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10955

研究課題名(和文)PI3K/Akt経路からみた虚血再灌流障害に対するアミノ酸の心筋保護作用の検討

研究課題名(英文)Myocardial preconditioning effects of amino acids and PI3K/Akt signaling pathway

研究代表者

小口 健史(OGUCHI, Takeshi)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：60201399

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文): 虚血前に薬剤を投与することで臓器保護効果を得ることをプレコンディショニング効果と呼ぶ。本研究では心筋虚血前にアミノ酸を投与することで保護効果を発揮するかを解明することを目的とした。ラット摘出心臓モデルを用いて、アミノ酸のうちアルギニン、ロイシン、グルタミン投与による虚血再灌流時の心機能回復を比較検討した。その結果、グルタミンの虚血前投与により虚血再灌流時の心機能回復を認め、アルギニンとロイシンでは心筋保護作用を認めなかった。心筋の虚血-再灌流障害にはPI3K/Akt経路が関与しているとされるが、グルタミンの心筋保護効果にPI3K/Akt経路が関与している証拠は本研究では得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋の虚血-再灌流障害にはPI3K/Akt経路が関与しているとされる。グルタミン、アルギニンなどのアミノ酸は肝臓・精巣・肺など他臓器の虚血-再灌流障害を軽減するとされている。本研究では、グルタミン・アルギニン・ロイシンの心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果を解明することを目的とした。その結果、グルタミンのみで心筋保護効果が認められたが、PI3K/Akt経路が関与している証拠は得られなかった。心臓外科手術においてグルタミンを使用する根拠が得られ、更に虚血性心疾患を合併した患者の麻酔管理においても新たな心筋保護戦略になることが期待される。

研究成果の概要(英文): While amino acids have organ protective effects, it is unknown whether they have preconditioning effects against myocardial ischemia-reperfusion injury. We examined the hypothesis that glutamine, leucine and arginine have preconditioning effects for a myocardial ischemic reperfusion injury in the isolated rat heart model.

Hearts were excised from rats and assigned as follows: 1) Control group, 2) Arginine group (Arg), 3) Leucine group (Leu) and 4) Glutamine group (Glu). The hearts were perfused with each solution before no-flow ischemia and then were reperfused.

While LV dp/dt max in Gln group was higher than that in the control group at 20 min after reperfusion, those in other three groups were similar. We demonstrated that glutamine is an only amino acid which has the cardioprotective effects against myocardial ischemia reperfusion injury. Myocardial Akt phosphorylation is not a possible mechanism by which glutamine produces the cardioprotective effect.

研究分野：麻酔科学

キーワード：アミノ酸 虚血再灌流障害 心筋保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) プレコンディショニング

心筋虚血プレコンディショニング効果についてはよく知られており、様々な薬物でも同様の心筋保護効果が報告され、吸入麻酔の心筋保護効果は麻酔科領域でも応用されている。我々は、ラットの虚血再灌流モデルにおいて、高用量インスリンは PI3K/Akt 経路を介して心筋保護作用を示すことを報告した。心臓における虚血-再灌流障害には PI3K/Akt 経路が関与しているとされる。

(2) アミノ酸とプレコンディショニング

グルタミン・アルギニンなどのアミノ酸には PI3K/Akt 経路への作用が報告されている。更に、アミノ酸のうちグルタミン・アルギニン・ロイシンには臓器保護作用が報告されている(引用文献 ~)。しかし、虚血心筋におけるアミノ酸の心筋保護効果と PI3K/Akt 経路の関与については未解明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、「アミノ酸を心筋虚血前から投与すると PI3K/Akt 経路を活性化することにより心筋保護効果を発揮する」という仮説を立てて、ラットの摘出心筋モデルを用いて検討した。

(2) Primary outcome は心収縮力とした。その機序を調べるために、心筋内の pAkt を測定した。

3. 研究の方法

(1) ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下にラットから心臓を摘出して、大動脈にカニューレを挿入し、Langendorff 法により modified Krebs-Henseleit buffer で灌流を行った (Fig. 1)

Fig. 1 Langendorff 法



(2) 心収縮力を測定するためにバルーンカテーテルを肺静脈から左心室内に挿入し、冠灌流量を測定するため、肺動脈にもカテーテルを挿入した。

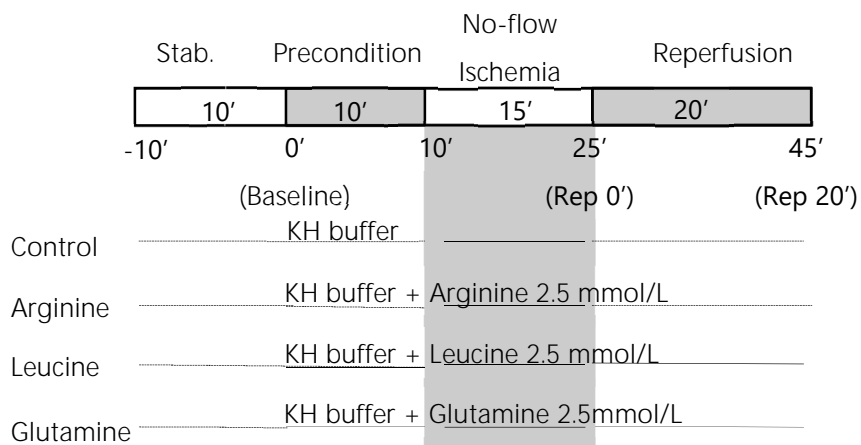
(3) 摘出心の心収縮が安定した後に、アルギニン群 (Arg)、ロイシン群 (Leu)、グルタミン群 (Gln) では各アミノ酸を 2.5 mmol/L で先行投与 10 分間を開始して、虚血 15 分間、再灌流 20 分間のプロトコール (Fig. 2) で、コントロール群を加えた 4 群間 (各群 n=8) で比較検討した。虚血中は 222 回/分でペーシングを行った。

(4) 測定項目として、心拍数、左室圧 (LV) dp/dt max、冠灌流量を先行投与前 (Baseline)、先行投与 10 分、再灌流 5 分、10 分、20 分で測定した。

(5) 再灌流 20 分後の心臓を液体窒素で瞬間凍結・凍結乾燥して、ELISA 法で再灌流終了時の心筋内 pAkt を測定した。

(6) 統計は、分散分析後に Dunnett post-hoc を行い p<0.05 を有意差有りとした。

Fig. 2 実験プロトコール



4. 研究成果

(1) 基準値は4群間で有意差はなかった (Fig. 3-4)。

(2) グルタミンを虚血前から投与することにより、虚血再灌流中の左室圧 dp/dt_{max} がコントロール群と比較して有意に高値であった。一方、アルギニン群とロイシン群はコントロール群と比較して虚血再灌流中の左室圧 dp/dt_{max} に有意な差を認めなかった (Fig. 3)。

(3) 心拍数は再灌流後4群ともに徐々に回復したが、4群間で有意な差を認めなかった (Fig. 4)。

(4) グルタミン群では虚血再灌流時の心機能の回復が促進されたが、心筋内 pAkt はコントロール群と比較して有意な上昇を認めなかった。

Fig. 3 The changes in LV dp/dt_{max}

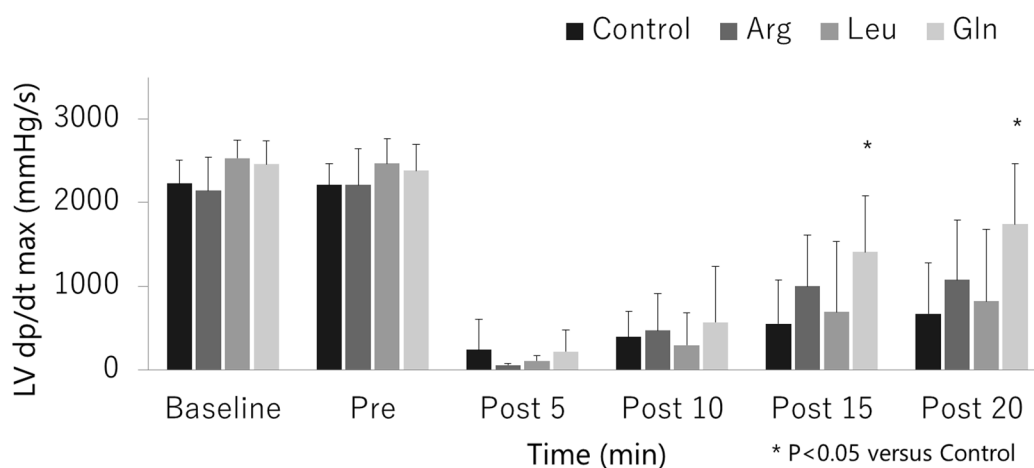
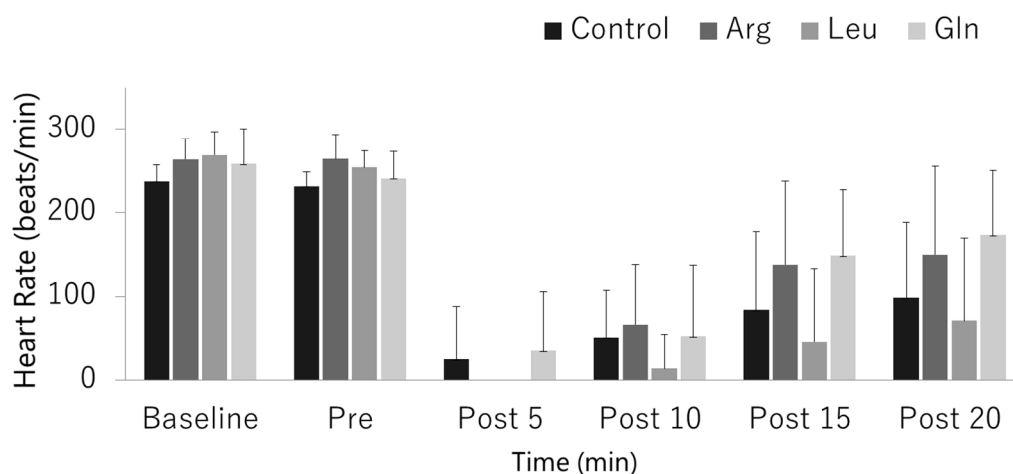


Fig. 4 The changes in heart rate



(5) 今回の研究では、ラットの心筋虚血再灌流モデルにおいてグルタミンの虚血前投与は虚血再灌流後の心収縮力回復を促進させた。しかし、アルギニンとロイシンは有意な心機能回復効果を示さなかった。

(6) Akt は虚血プレコンディショニング効果において重要な役割を果たしており、インスリンの心筋保護効果においても Akt シグナリングカスケードの活性化が作用機序の一つであると報告されている。

(7) グルタミンの心筋保護機序にも Akt 活性化が関与していると仮説を立てて、心筋内 pAkt 量を測定したが有意な上昇を認めず、グルタミンの心筋保護効果に PI3K/Akt 経路が関与している証拠は今回の研究では得られなかった。

(8) 本研究により心臓外科手術においてグルタミンを使用する根拠が得られ、更に虚血性心疾患を合併した患者の麻酔管理においても新たな心筋保護戦略になることが期待される。

< 引用文献 >

Khogali SE et al. Effect of L-glutamine on post ischemic cardiac function: protection and rescue. *J Mol Cell Cardiol.* 1998; 30: 819-27.

McRae MP. Therapeutic benefits of L-Arginine: An umbrella review of meta-analyses. *J Chiropr Med.* 2016; 15: 184-9.

De Moraes WM et al. Impact of leucine supplementation on exercise training induced anticardiac remodeling effect in heart failure mice. *Nutrients* 2015; 7: 3751-66.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keisuke Omiya, Yosuke Nakadate, Toru Matsuo, Akiko Kawakami, Hiroaki Sato, Takeshi Oguchi, Takashi Matsukawa
2. 発表標題 Which amino acids are cardioprotective against ischemia reperfusion injury ?
3. 学会等名 New Zealand Anaesthesia Annual Scientific Meeting +Annual Queenstown Update in Anaesthesia 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	石山 忠彦 (ISHIYAMA Tadahiko) (90293448)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	
連携研究者	松川 隆 (MATSUKAWA Takashi) (80209519)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	