

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11604

研究課題名(和文)心虚血・再灌流時のセロトニン動態への薬理的介入による心筋細胞傷害軽減の検討

研究課題名(英文) Myocardial interstitial serotonin kinetics and cardiomyocyte injury during ischemia-reperfusion in rats

研究代表者

秋山 剛 (Akiyama, Tsuyoshi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員

研究者番号：70202554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心虚血時に心筋間質のセロトニン(5-HT)濃度は上昇し、心筋細胞傷害を助長する。虚血部の心筋間質5-HT濃度の上昇には、ATP枯渇により起こる血小板からのcarrier-mediated 5-HT effluxが関与していることが示唆された。また、心臓組織にはplasma membrane monoamine transporter (PMAT)が存在し、心筋間質5-HT濃度を制御しており、虚血時に蓄積した心筋間質5-HTは、再灌流時に主にPMATを介して心筋組織細胞内に取り込まれて5-HIAAに代謝され、その過程で活性酸素が産生されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性心筋梗塞症の急性期治療において、心筋細胞傷害を減弱させることは、その後の心不全への移行を防止、予後を改善させることが可能であるが、いまだにその有効な治療法は見つかっていない。我々の心虚血・再灌流時における虚血部セロトニン動態の研究結果から、虚血時のセロトニン放出、および再灌流時におけるセロトニン代謝を抑制して、心筋細胞傷害を減弱させることが可能であり、急性心筋梗塞症急性期の新たな治療法につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Serotonin (5-HT) accumulates in the heart during myocardial ischemia and induces deleterious effects on the cardiomyocytes through receptor-dependent and monoamine oxidase-dependent pathways. During myocardial ischemia, depletion of ATP inhibits both sodium-potassium ATPase of cell membrane and ATP dependent vesicle transport of vesicle membrane and causes carrier-mediated 5-HT efflux from platelet via reverse-mode of 5-HT reuptake transporter, which is sensitive to the selective 5-HT reuptake inhibitor. During myocardial reperfusion, accumulated interstitial 5-HT is taken up into cardiac cells via plasma membrane monoamine transporter, one of extra-neuronal monoamine transporters and then metabolized by monoamine oxidase to produce 5-hydroxyindole acetic acid and hydrogen peroxide, which causes myocardial cell injury.

研究分野：循環生理学

キーワード：心虚血・再灌流 セロトニン 血小板 トランスポーター 心筋細胞傷害 マイクロダイアリシス法

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞症において、虚血・再灌流による心筋細胞傷害の程度は、その後の心機能ならびに予後を左右する。したがって、この心筋細胞傷害を可能な限り阻止することが、急性心筋梗塞症の治療戦略上、重要な課題であり、そのためには急性心虚血・再灌流における詳しい病態解明が欠かせない。

心虚血・再灌流時において、心筋間質セロトニン(5-HT)は、以下の二つの作用機序により心筋細胞を傷害すると考えられる。

5-HT receptor を介した心筋細胞傷害(receptor-dependent effect)

虚血・再灌流時、虚血部において血小板より 5-HT が放出され、心筋間質 5-HT が上昇する。上昇した 5-HT は、5-HT receptor を介して、血小板凝集の促進、冠動脈収縮、求心性交感神経線維刺激、不整脈、心肥大等の病態を引き起こし、心虚血・再灌流時における心筋細胞傷害を助長する。

MAO 代謝によって発生する過酸化水素を介した心筋細胞傷害(MAO-dependent effect)

心筋間質 5-HT は、serotonin transporter を介して細胞内に取り込まれ、ミトコンドリア外膜に存在する monoamine oxidase (MAO)により脱アミノ化され、最終的に 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)に代謝され diffusion により細胞外へ放出される。虚血・再灌流時、5-HT の再取り込み(reuptake)・代謝により生成された高濃度の H₂O₂ が、直接的、間接的に核 DNA に損傷を与え、ミトコンドリア呼吸鎖に傷害を与え、酵素や細胞骨格蛋白等の細胞内タンパクを変性させ、細胞膜脂質を酸化させ、心筋細胞に傷害を与える。

これまでに研究代表者は、心虚血・再灌流実験において microdialysis法を用い、receptor-dependent effectによる心筋細胞傷害の指標として心筋間質5-HT濃度を、MAO-dependent effectによる心筋細胞傷害の指標として心筋間質5-HIAA濃度を同時にモニターすることで、虚血部心筋間質5-HT動態に関して以下の知見を得た (ref. Acta Physiol 207: 260-268, 2013, Free Radic Res 50, 645-653, 2016, Am J Physiol 312:H60-H67, 2017)。

虚血時における虚血部 5-HT 動態

虚血部に残存する血小板から 5-HT が放出され、虚血部心筋間質 5-HT 濃度は著明に上昇する。selective 5-HT reuptake inhibitor (SSRI)は、生理的条件下では間質 5-HT の reuptake を block して、間質 5-HT 濃度を上昇させるが、驚くべきことに、この虚血時における 5-HT 上昇は、SSRI である fluoxetine により強く抑制される。一方、心筋間質 5-HT が上昇しているにもかかわらず、虚血部心筋間質 5-HIAA 濃度は上昇しない。低酸素、低 pH により MAO 活性が低下しているため、5-HT の代謝、すなわち 5-HIAA の産生は強く抑制されていると考えられる。

再灌流後における虚血部 5-HT 動態

再灌流後、血液から再灌流された血小板の activation により、いったん虚血部心筋間質 5-HT 濃度は上昇するが、血流による washout の回復、および MAO 活性の回復にともなう 5-HT 代謝の亢進により、虚血部心筋間質 5-HT 濃度は徐々に低下する。一方、心筋間質 5-HIAA 濃度は、再灌流後より著明に上昇する。この心筋間質 5-HIAA の上昇は、MAO inhibitor である pargyline で抑制されるが、SSRI である fluoxetine では全く抑制されない。すなわち、再灌流後の 5-HT の reuptake には、SERT 以外の SSRI に resistant な transporter が関与していると考えられる。

したがって、receptor-dependent effect による心筋細胞傷害は、虚血時と再灌流直後に引き起こされ、MAO-dependent effect による心筋細胞傷害は、再灌流後に引き起こされると考えられる。しかし、心虚血時における心筋間質 5-HT 濃度の上昇機構、再灌流後における 5-HT reuptake 機

構に関して、いまだ不明な点が多く解明されていない。

2. 研究の目的

虚血時におけるSSRIにsensitiveな虚血部心筋間質5-HT濃度上昇機構の解明

虚血部心筋間質 5-HT 上昇が SSRI である fluoxetine で強く抑制される機構として、虚血時において SSRI に sensitive な 5-HT reuptake transporter (SERT)を介した carrier-mediated 5-HT efflux が起きている可能性が強く示唆される。今回、虚血時に血小板から carrier-mediated 5-HT efflux が起きるかを、薬理学的手法により明らかにする。

再灌流後の SSRI に resistant な細胞内への 5-HT reuptake 機構の解明

再灌流後の心筋間質 5-HIAA 上昇が SSRI である fluoxetine で抑制されない機構として、再灌流後の間質 5-HT の reuptake に、SSRI に resistant な extra-neuronal monoamine transporter (EMT)が関与していると強く示唆される。MAO-dependent effect による心筋細胞傷害には、間質の 5-HT が心筋細胞に reuptake されて MAO によって代謝される必要がある。MAO は交感神経終末、血小板など多くの細胞に幅広く存在しているが、SSRI に sensitive な SERT は心筋細胞に存在しない。今回、再灌流後の細胞内への 5-HT reuptake に EMT が関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

心臓 microdialysis 法による 5-HT, 5-HIAA 動態モニタリング

麻酔下ラットの左室心筋に microdialysis probe を植え込み、一方よりリンゲル液、あるいは薬剤を含んだリンゲル液を灌流し、他方より microfraction collector にて心筋透析液を連続的に採取する。心筋間質の 5-HT, 5-HIAA は半透膜部分の dialysis fiber を介して、濃度勾配に従って灌流液中に移動する。一方、リンゲル液に含まれた薬剤は、血流のない虚血部でも、dialysis fiber を介して、灌流液中から心筋間質に移動する。採取した透析液中の 5-HT, 5-HIAA 濃度を HPLC にて測定し、それぞれ心筋間質 5-HT, 5-HIAA 濃度の指標とする。

虚血時における SSRI に sensitive な虚血部心筋間質 5-HT 濃度上昇機構の解明

非虚血時、間質の 5-HT は、血小板細胞膜を介した Na^+ の ion gradient によって、SERT を介して co-transport の形式で細胞内に reuptake される。しかし、虚血時、血小板細胞内の Na^+ が上昇すると、血小板細胞膜を介した Na^+ gradient が逆転し、血小板細胞内の 5-HT は SERT を介して細胞外に co-transport、すなわち carrier-mediated 5-HT efflux が起こると考えられる。また SERT を選択的に block する SSRI は、細胞内への reuptake も carrier-mediated 5-HT efflux のどちらも block すると考えられる。したがって、生理的条件下では SSRI は間質 5-HT 濃度を上昇させるが、虚血時における間質 5-HT の上昇が、carrier-mediated 5-HT efflux が原因とすれば、SSRI は虚血時 5-HT 上昇を抑えると考えられる。

そこで、麻酔下ラットの心臓に microdialysis 法を用い、心臓において reverse mode を介した血小板からの carrier-mediated 5-HT efflux が起こりえるかどうか、その 5-HT efflux が SSRI で block されるかどうかを、薬理学的手法により明らかにする。

- 1) cyanide によって dialysis fiber 付近を薬理的 anoxia にした際に、carrier-mediated 5-HT efflux が引き起こされるか、また、この 5-HT efflux が SSRI で block されるかを明らかにする。
- 2) Na^+ - K^+ ATPase inhibitor (ouabain) + ATP 依存性 vesicle transporter の inhibitor (reserpine)により

血小板内の Na^+ 濃度を上昇させ、血小板細胞質の 5-HT 濃度を上昇させることで、carrier-mediated 5-HT efflux が引き起こされるか、また、この 5-HT efflux が SSRI で block されるかを明らかにする。

再灌流後の SSRI に resistant な細胞内への 5-HT reuptake 機構の解明

麻酔下ラットの心臓にマイクロダイアリシス法を用い、まず生理的条件下において、extra-neuronal monoamine transporter (EMT)が心筋間質5-HTのreuptakeにどの程度関与しているかを明らかにする。また、心虚血(冠動脈閉塞30分)・再灌流時において、extra-neuronal monoamine transporter (EMT)が虚血・再灌流時の心筋間質5-HTのreuptake、その後の代謝にどの程度関与しているかを明らかにする。

- 1) 生理的条件下において、間質5-HTの細胞内へのreuptakeに、EMTであるorganic cation 3 transporter (OCT3)、およびplasma membrane monoamine transporter (PMAT)が関与しているかを、OCT3 inhibitorであるcorticosterone、OCT3/PMAT inhibitorであるdecinium-22を局所投与して明らかにする。また、これらのEMTがSSRIにsensitiveなSERTと、5-HTのreuptakeに関して非競合的に働いているかどうか明らかにする。
- 2) 生理的条件下の結果に基づいて、decinium-22を局所投与して、心虚血・再灌流時の心筋間質5-HT動態を明らかにする。

4. 研究成果

虚血時における SSRI に sensitive な虚血部心筋間質 5-HT 濃度上昇機構の解明

- 1) sodium cyanide (NaCN, 30mM)を dialysis probe を介して局所投与することで、心筋間質 5-HT 濃度は上昇し、その上昇は SSRI である fluoxetine により抑制された。またこの心筋間質 5-HT 濃度上昇は、 α_2 adrenergic receptor inhibitor (phentolamine, 100 μM)により影響を受けなかった。心臓組織の chemical anoxia すなわち低酸素により、血小板から 5-HT release が起き、その 5-HT 上昇は SSRI により抑制され、生理的条件下においては血小板の aggregation を抑制する α_2 adrenergic receptor inhibitor により影響を受けないことから、低酸素によって血小板からの carrier-mediated 5-HT release が起こると考えられた。
- 2) $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase inhibitor (ouabain, 20 mM) によって血小板細胞膜の Na^+ gradient の破綻を起こし、ATP 依存性 vesicle transporter の inhibitor (reserpine 100 μM)にて血小板細胞質の 5-HT 濃度を上昇させることで、心筋間質 5-HT 濃度は上昇し、その上昇は SSRI である fluoxetine により抑制された。血小板細胞膜を介した Na^+ gradient を逆転させ、血小板細胞内の 5-HT 濃度を上昇させると、SERT を介して細胞外に co-transport、すなわち carrier-mediated 5-HT efflux が起き、それは SSRI で block されることが示された。このことは虚血時に ATP が枯渇し、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase、および ATP 依存性 vesicle transporter が block され、carrier-mediated 5-HT efflux が起こる可能性を強く示唆した。

再灌流後の SSRI に resistant な細胞内への 5-HT reuptake 機構の解明

- 1) 生理的条件下において、decinium-22により心筋間質5-HT濃度は上昇したが、corticosteroneでは変化しなかった。また、decinium-22存在下でfluoxetineによる心筋間質5-HT応答に変わりはない。この実験結果から、心臓組織細胞にOCT3が存在しないか、心臓組織においてOCT3は心筋間質5-HTの細胞内へのreuptakeに関与していない可能性が示唆さ

れた。一方、PMATは心臓組織細胞に存在し、心筋間質5-HTの細胞内へのreuptakeに大きく貢献しており、そのreuptakeはSSRIにsensitiveなSERTと、非競合的に働いていることが示された。

- 2) decinium-22により、vehicleで見られたような再灌流時の心筋間質5-HTの急激な低下は消失し、再灌流後も心筋間質5-HTは高濃度を維持した。一方、心筋間質5-HIAAは再灌流後vehicleに比べ有意に低下した。心虚血・再灌流時において、虚血時に上昇した虚血部間質の5-HTは、再灌流時に主としてEMTであるOCT3を介してreuptakeされ、細胞内でMAOにより代謝され、その際にH₂O₂が産生されることが示された。すなわちMAO-dependent effectは心臓組織のOCT3を介して起きることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sonobe Takashi, Akiyama Tsuyoshi, Du Cheng Kun, Pearson James T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Serotonin uptake via plasma membrane monoamine transporter during myocardial ischemia reperfusion in the rat heart in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawada Toru, Sonobe Takashi, Hayama Yohsuke, Nishikawa Takuya, Miyamoto Tadayoshi, Akiyama Tsuyoshi, Pearson James T., Sugimachi Masaru	4. 巻 218
2. 論文標題 Accentuated antagonism of vagal heart rate control and less potent prejunctional inhibition of vagal acetylcholine release during sympathetic nerve stimulation in the rat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autonomic Neuroscience	6. 最初と最後の頁 25 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.autneu.2019.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kakehi Kazuyoshi, Iwanaga Yoshitaka, Watanabe Heitaro, Sonobe Takashi, Akiyama Tsuyoshi, Shimizu Shuji, Yamamoto Hiromi, Miyazaki Shunichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Modulation of Sympathetic Activity and Innervation With Chronic Ivabradine and β -Blocker Therapies: Analysis of Hypertensive Rats With Heart Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 387 ~ 396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1074248419829168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawada T, Akiyama T, Sonobe T, Shimizu S, Hayama Y, Pearson JT, Shishido T, Sugimachi M	4. 巻 219
2. 論文標題 Central activation of cardiac vagal nerve by α 2-adrenergic stimulation is impaired in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autonomic Neuroscience	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.autneu.2018.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Hayama Y, Sugimachi M	4. 巻 73
2. 論文標題 Mild hypothermia is ineffective to protect against myocardial injury induced by chemical anoxia or forced calcium overload.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 100-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FJC.0000000000000639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Morimoto S, Shimizu S, Kawada T, Shirai M, Pearson JT	4. 巻 205
2. 論文標題 Cardiac vagal control in a knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with a troponin mutation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autonomic Neuroscience	6. 最初と最後の頁 33-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.autneu.2017.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Fukumitsu M, Kamiya A, Sugimachi M	4. 巻 205
2. 論文標題 Desipramine increases cardiac parasympathetic activity via alpha2-adrenergic mechanism in rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autonomic Neuroscience	6. 最初と最後の頁 21-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.autneu.2017.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 秋山 剛、清水 秀二、杜 成坤、戦 冬雲、稲垣 董克、吉本 光佐、曾野部 崇、川田 徹、ピアソン ジェームズ	4. 巻 38
2. 論文標題 綜説「心臓マイクロダイアリシス法の利点」	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 循環制御	6. 最初と最後の頁 208-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sobobe T
2. 発表標題 虚血再灌流時の心筋間質における細胞膜モノアミン輸送体を介したセロトニン取り込み
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Cheng-Kun Du
2. 発表標題 Evaluation of cardiac function in a knock-in mouse model for human DCM at early postnatal stages
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sonobe T
2. 発表標題 Carrier-mediated serotonin efflux from platelets in the heart.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimizu S
2. 発表標題 alpha2C-Adrenoceptors play a key role in alpha2-adrenergic agonist-induced cardiac autonomic nervous responses.
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimizu S
2. 発表標題 Cardiac-specific micrRNAs significantly increase after myocardial reperfusion in the ischemic region.
3. 学会等名 第82回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----