

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16486

研究課題名(和文) Limb remote ischemic preconditioningの解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of limb remote ischemic preconditioning

研究代表者

澤下 泰明 (Sawashita, Yasuaki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60806800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：昨今、世界中で虚血性心疾患に罹患する患者が増加している中で虚血性心疾患、とりわけ心臓虚血再灌流傷害に対する心保護戦略の確立は極めて重要な課題である。虚血性心疾患に対する心保護戦略には吸入麻酔薬などによる薬物による介入と直接冠動脈を虚血にする虚血プレコンディショニングといった非薬物による介入がある。本研究では心臓虚血再灌流傷害に対する非薬物介入の一つである遠隔虚血プレコンディショニングの未知の機序の解明として、非アシル化グレリンが遠隔虚血プレコンディショニングの液性保護因子の一つとして心筋細胞内のシグナル伝達を活性化し心臓虚血再灌流傷害を減弱させる可能性があるが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は遠隔虚血プレコンディショニングの機序の解明の一助となり、今後さらなる心臓虚血再灌流傷害に対する心保護戦略へ貢献し得るものである。現在の遠隔虚血プレコンディショニングの臨床応用では成人に比べて小児を対象とした臨床研究で有効とされているが、本研究の結果は小児だけでなく成人においても遠隔虚血プレコンディショニングの心臓虚血再灌流傷害に対する新たな心保護効果を確立し、RIPCを確かな臨床応用へと発展させるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Remote ischemic preconditioning (RIPC) offers cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. The humoral factors involved in RIPC that are released from parasympathetically innervated organs have not been identified. Previous studies showed that ghrelin, a hormone released from the stomach, is associated with cardioprotection. However, it is unknown whether or not ghrelin is involved in the mechanism of RIPC. This study indicated that RIPC reduces myocardial ischemia and reperfusion injury through UAG induced-activation of JAK/STAT pathway. UAG may be one of the humoral factors involved in the cardioprotective effects of RIPC.

研究分野：麻酔科学

キーワード：心臓虚血再灌流傷害 遠隔虚血プレコンディショニング 液性保護因子 グレリン 周術期管理

1. 研究開始当初の背景

世界人口の増加に伴って、虚血性心疾患 (Ischemia Heart Disease ; IHD) の罹患率は増加の一途をたどっているのは言うまでもないが、昨今の医学の進歩により IHD 患者の生存率は改善傾向にある。IHD に対する主な治療は迅速な血行再建術である。しかしながら、虚血状態から血液が再灌流する際に心筋が障害されてしまう。この現象を心臓虚血再灌流傷害 (Ischemia Reperfusion Injury ; IRI) と知られており、心臓 IRI に対する心保護戦略は、IHD 罹患者の長期生存率の改善や周術期の予後改善に影響を与える^(1,2)。心臓 IRI に対する心保護戦略の 1 つに遠隔虚血プレコンディショニング (Limb remote ischemic preconditioning ; RIPC) が存在する。RIPC とは、非侵襲的に四肢を短時間の虚血と再灌流を数回施すことによって、遠隔臓器の IRI に対する保護効果を示すことである。現在、RIPC の機序は神経系の関与、液性保護因子の関与、それらの相互関係が関わり合い、炎症性サイトカインなどの全身性因子が活性化し、細胞内のタンパク質合成酵素や転写因子の発現によりミトコンドリアの ATP 感受性 K チャネルが開閉し、臓器保護効果が得られると考えられている。しかし、RIPC の機序は未だ全容解明には至っていない。基礎研究では、RIPC の臓器保護効果は迷走神経切断 (胃後枝) で抑制されることが示されている⁽³⁾。臨床研究では、小児の開心術における RIPC の心臓 IRI に対する心保護効果は示されているが、合併症を有する成人の開心術においては議論の余地がある。また、成長ホルモン分泌促進物質であるグレリンは、胃から産生されるペプチドホルモンであり、体内でアシル化型 (AG) と非アシル化型 (UAG) の 2 つで存在し共にさまざまな細胞内シグナル伝達を介して心臓 IRI に対する心保護効果を有するとされている。そのシグナル経路は、RIPC のシグナル経路と重なる点が多いが、RIPC の機序においてグレリンの関与は未知である。本研究では、RIPC 手技自体が体内のグレリン産生に関与する可能性の探索および、RIPC がグレリンを介して心臓 IRI に対し心保護効果の有無について検証する。さらに小児だけでなく成人においても RIPC の心臓 IRI に対する新たな心保護効果を確認し、RIPC を確かな臨床応用へと発展させる。

2. 研究の目的

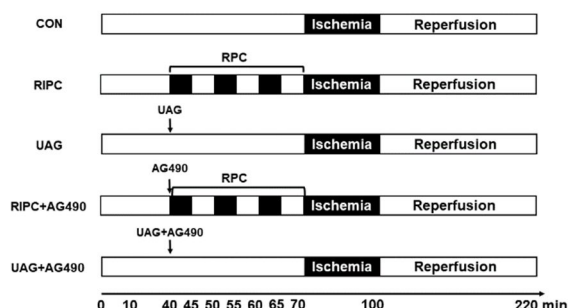
RIPC の機序に関する基礎研究では、既知の液性保護因子としてアデノシン、ブラジキニン、オピオイド、エリスロポエチン、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、一酸化窒素らが報告されている⁽⁴⁾。その他に、RIPC の心保護効果の減弱の原因として、高齢であること、迷走神経切断 (胃後枝)、プロポフォルの使用などが報告されているがその機序は明確になっていない^(3,5)。また、成長ホルモン分泌促進物質であるグレリンは胃から産生されるペプチドホルモンであり、さまざまな細胞内シグナル伝達を介して心臓 IRI に対する心保護効果を有するとされている⁽⁶⁾。また他の先行研究では、液性因子の特徴には 12-14kDa 未満であること、水溶性で凍結乾燥が可能であり熱に不安定であることからペプチドあるいはタンパクではないかという推測されている⁽⁷⁻¹⁰⁾。グレリンとは胃から分泌されるペプチドホルモンの 1 つで、成長ホルモン放出ホルモンであり、食欲亢進作用を示すが、心保護作用も報告されている⁽¹¹⁾。以上の点から、本研究では、RIPC 手技自体が体内のグレリン産生に関与する可能性の探索および、RIPC がグレリンを介して心臓 IRI に対し心保護効果の有無について検証する。

3. 研究の方法

本研究ではラットを用いて RIPC の新たな機序を探索する。RIPC 手技前後での体内グレリン値の測定および、体外からのグレリンを投与することで心臓 IRI に対する心保護効果を発揮するか否かについて検証する。

雄性 Wistar ラットを用い、in vivo での冠動脈前下行枝を 30 分間虚血と 120 分間再灌流させる心臓 IRI モデルを誘導し、5 群に分類した (右図)。RIPC 手技はラットの上下肢に血圧カフを装着し 200mmHg で 5 分間駆血と再灌流させるサイクルとして 3 回施行とした。UAG 投与量は 0.5mcg/kg、ヤヌスキナーゼおよびシグナル伝達兼転写活性化因子 (JAK/STAT) 経路の拮抗薬の 1 つである AG490 の投与量は 3 mg/kg をそれぞれ静脈内投与した。

血清 AG 値および UAG 値の測定は、RIPC 手技前後で測定した。全ての個体で Area at risk と梗塞サイズ (IS) を測定し、さらに RIPC の保護経路の 1 つとされる JAK2/STAT3 経路の活性化を検討するために STAT3 のリン酸化をウェストンブロット法により測定した。



4. 研究成果

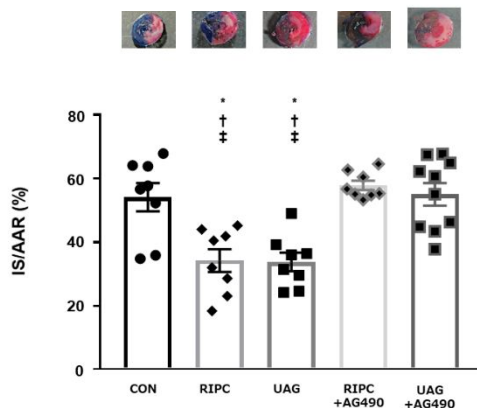
< 結果 >

対照 (CON) 群に比較しRIPC群およびUAG群で、ISが有意に減少した(A)。しかしAG490を投与することによってRIPCとUAGの心保護効果が棄却された。

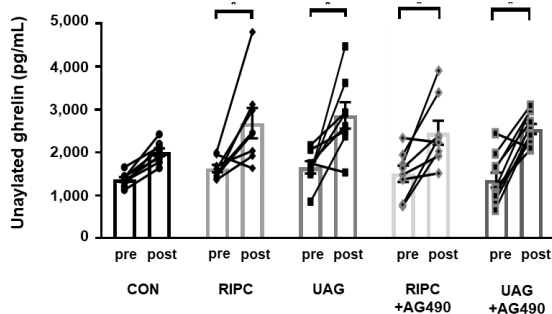
血中UAG値については、CON群のUAG値は有意な増減は認めなかったが、RIPC群で血清UAG値が有意に増加した(B)。

STAT3のリン酸化の割合については、RIPC群、UAG群ではプレコンディショニング後に比べて再灌流10分後で有意に増加した(C)。また、再灌流10分後でのRIPC群とUAG群では、有意にRIPC群で高い結果となった。UAG投与群でISが有意に減少し、JAK/STAT経路の阻害薬(AG490)投与によりRIPCおよびUAGの心保護効果はSTAT3のリン酸化が阻害されることによって棄却された。

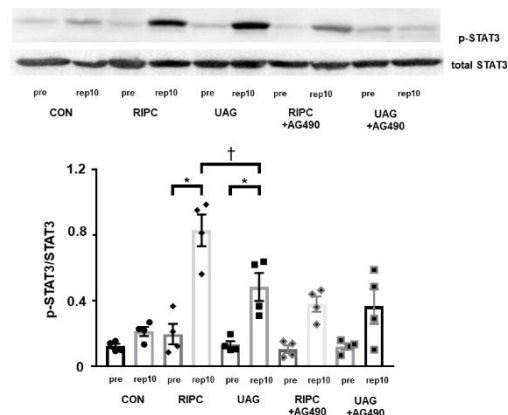
A. 梗塞巣サイズ



B. 血中UAG値



C. STAT3のリン酸化の割合



< RIPCによるUAG分泌の考察 >

四肢を駆血と再灌流を複数回施行することで末梢組織からの一酸化窒素(NO)が放出される⁽¹²⁾。そのNOが節前線維のNO-cGMP経路を介してアセチルコリンを放出させ、そのアセチルコリンが胃壁細胞に作用しUAGを放出させたのではないかと考えられる⁽¹³⁾。他の先行研究では、迷走神経切断あるいはムスカリン受容体拮抗薬を投与することでグレリンの分泌が減少することが報告されている⁽¹⁴⁾。

< 結論 >

本研究の結果から、RIPCによってAGではなくUAGの分泌が有意に増加し、増加したUAGはJAK2/STAT3経路を活性化させ心保護効果を示した。UAGがRIPCの液性因子の1つである可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- (1) Jennings RB. Circ Res. 2013
- (2) Heusch G. Lancet. 2013
- (3) Mastiskaya S et al. PLoS One. 2016
- (4) Gassanov N et al. J Am Soc Nephrol. 2014
- (5) Behmenburg F et al. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2017
- (6) Huang J et al. Int Heart J. 2017
- (7) Hildebrandt HA et al. JACC Basic Transl Sci. 2016
- (8) Lang SC et al. Basic Res Cardiol. 2006
- (9) Staes E et al. Biochim Biophys Acta. 2010
- (10) Shimizu M et al. Clin Sci (Lond). 2009
- (11) Labarthe et al. Front Endocrinol. 2014
- (12) Shahid A et al. Exp Physiol. 2008
- (13) Rassaf T et al. Circ Res. 2014
- (14) Herring N et al. J Physiol. 2001

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yasuaki Sawashita, Naoyuki Hirata, Yusuke Yoshikawa, Hirofumi Terada, Yasuyuki Tokinaga, Michiaki Yamakage	4. 巻 115
2. 論文標題 Remote ischemic preconditioning reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through unacylated ghrelin-induced activation of the JAK/STAT pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Basic Research in Cardiology	6. 最初と最後の頁 50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00395-020-0809-z.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sawashita Y, Hirata N, Yoshikawa Y, Terada H, Yamakage M.
2. 発表標題 Limb remote ischemic preconditioning protects against cardiac ischemia and reperfusion injury via modulation of the secretion of desacyl ghrelin in rats.
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2019 The european anaesthesiology congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sawashita Y, Hirata N, Yoshikawa Y, Terada H, Yamakage M.
2. 発表標題 Sevoflurane releases desacyl ghrelin for the cardioprotection from ischemia and reperfusion injury.
3. 学会等名 The 17th International Congress of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia in conjunction with the 13th Meeting of Asian Society of Cardiothoracic Anesthesia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤下泰明, 平田直之, 吉川裕介, 寺田拓文, 山蔭道明
2. 発表標題 セボフルランはグレリン分泌制御を介した遠隔虚血プレコンディショニングによる心保護作用を増強する
3. 学会等名 日本麻酔科学会 北海道・東北支部第9回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤下泰明, 平田直之, 吉川裕介, 寺田拓文, 山蔭道明
2. 発表標題 セボフルランは心保護効果を持つ非アシル化グレリンの分泌を促進し, 虚血再灌流障害の軽減に関与する
3. 学会等名 第24回日本心臓血管麻酔学会
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------