

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19591805

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流障害に対する薬理的ポストコンディショニング法の開発と分子機序の解明

研究課題名(英文) Development of pharmacological postconditioning against liver ischemia reperfusion injury, and clarification of mechanisms

研究代表者

趙 成三 (CHO SUNGSAM)

長崎大学・病院・講師

研究者番号：90325655

研究成果の概要(和文)：ラット肝虚血再灌流モデルで、PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬の再灌流時投与によって保護効果を組織学的障害の有無と TUNEL アッセイにより検討し、PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬が薬理的ポストコン作用を有することが明らかになった。PI3K-Akt 活性化阻害薬 wortmannin、LY294002 と ERK 活性化阻害薬 PD-98059、eNOS 阻害薬 L-NAME を用いた検討ならびに免疫組織染色、ウエスタンブロット法によって、PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬の薬理的ポストコン作用に虚血ポストコンと同様に PI3-Akt、ERK、eNOS が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We showed that both phosphodiesterase III inhibitors and Rho kinase inhibitors administered just before reperfusion protect against liver ischemia reperfusion injury and apoptosis. This protective effect was attenuated by wortmannin, a PI3K-Akt inhibitor, PD-98059, an ERK inhibitor, or L-NAME, a eNOS inhibitor. Both phosphodiesterase III inhibitors and Rho kinase inhibitors administered just before reperfusion activated PI3K-Akt, ERK, or eNOS. Thus both phosphodiesterase III inhibitors and Rho kinase inhibitors could have postconditioning effects via PI3K-Akt, ERK, or eNOS activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：肝臓、虚血再灌流、ポストコンディショニング、ホスホジエステラーゼ阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓においては再灌流早期に短時間虚血を行うことで心筋壊死の程度が縮小する現象(虚血ポストコン)や薬理的ポストコンに関する検討が行われ、そのメカニズムにおいて虚血・薬理的プレコンと同様に、再灌流早期の reperfusion injury salvage kinase (RISK) 経路である pathway phosphatidylinositol-3-kinase (PI3)-Akt と ERK の活性化が重要とされており、薬剤においてもこの経路を活性化させるものは虚血前や再灌流早期に投与することで保護作用を有する可能性が示唆されている。予期せぬ虚血に対し再灌流時に投与できるという点で、ポストコンはさらに臨床応用の機会が増加することが予想される。

また、心臓において揮発性麻酔薬は PKC 活性化と KATP チャンネル開口により、心筋スタンピングと心筋梗塞サイズの減少作用を生じることが知られている。一方、PDEIII 阻害薬は、プレコンの重要なメディエーターである PKC を介する経路とは独立した cAMP-PKA を活性化することで、その下流にある P38MAPK の活性化と Rho キナーゼの活性化抑制により心筋梗塞サイズの減少作用を発揮する。しかし、PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬の再灌流早期投与の影響や RISK 経路の関与についての検討はなされていなかった。

肝臓においては、短時間先行虚血(虚血プレコン)や PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬の虚血前投与の肝虚血再灌流障害に対する保護作用は報告されているが、そのメカニズムに関する報告は少ない。また、虚血・薬理的ポストコンに関する検討はなされていない。

(2) 現在までに、我々の実験グループはヒト肝細胞株を用い、

1) 一酸化窒素(NO)ドナーによるプレコン作用に HSP70 が関与すること、

2) 肝でのプレコンにおける KATP チャンネルの関与は否定的であること、

また、ラット心虚血再灌流モデルを用いて、  
3) PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬の虚血前および再灌流早期投与が保護作用を有すること、

4) これらのメカニズムに再灌流早期における PI3-Akt の活性化が関与することを報告してきた。

近年、肝の虚血プレコンに再灌流早期の PI3-Akt の関与を示唆する報告もあり、肝臓においても心臓と同様に虚血ポストコンならびに再灌流早期の PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬投与により虚血再灌流障害を軽減する可能性が考えられる。

術中虚血再灌流が行われる肝切除術や肝移植術のみならず問脈塞栓などの予定外の肝虚血において、効果的な薬理的ポストコン効果が期待できれば、周術期管理においても有用である。生体モデルを用いて、薬理的ポストコン法の開発をすることで、臨床への応用の可能性を検討し、メカニズムの検討を行うことでより有効な保護法の開発へ寄与できると考える。

## 2. 研究の目的

今回、ラット肝虚血再灌流モデルを用い、虚血ポストコンおよび PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬の再灌流時投与による保護効果の検討と RISK 経路(PI3-Akt、ERK)と eNOS の関与を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 肝虚血再灌流障害に対する虚血ポストコンならびに再灌流早期の PDEIII 阻害薬、Rho

キナーゼ阻害薬投与が肝虚血再灌流障害に与える影響について検討

肝虚血再灌流モデル：雄性ウイスターラットにペントバルビタール腹腔内投与にて基礎麻酔後、右総頸静脈に静脈ルート、右内頸動脈にA-lineを確保、開腹し90分の部分肝虚血(70%)を行う。

シャム群、コントロール群：肝虚血再灌流のみ、虚血ポストコン群；再灌流直後30秒虚血1分再灌流5回、PDEIII阻害薬ポストコン群：再灌流直前にミルリノンまたはオルプリノン投与、Rhoキナーゼ阻害薬ポストコン群：再灌流直前にファスジル投与を行う。

再灌流6時間後に採血し、肝細胞障害の指標としてAST、ALT、LDH、 $\alpha$ -GSTを測定する。また、組織標本を作製し組織学的障害の有無とTUNELアッセイによりアポトーシスの検討を行う。

(2) ポストコンにおける分子機序の解明：RISK経路とeNOSに関する検討

コントロール群、虚血ポストコン群、PDEIII阻害薬ポストコン群、Rhoキナーゼ阻害薬ポストコン群に加えて、PI3K-Akt活性化阻害薬wortmannin、LY294002とERK活性化阻害薬PD-98059、eNOS阻害薬L-NAMEを再灌流5分前に投与する。

再灌流6時間後に採血し、肝細胞障害の指標としてAST、ALT、LDH、 $\alpha$ -GSTを測定する。また、組織標本を作製し組織学的障害の有無とTUNELアッセイによりアポトーシスの検討を行う。

再灌流15分後に肝前葉を摘出しホモジナイズする。ホモジナイズしたサンプルを用いてPI3-Akt、ERK、Rhoキナーゼの活性化をウエスタンブロット法により確認する。

再灌流6時間後に肝前葉を摘出し、組織標本を作製し、PI3-Akt、ERK、eNOSの免疫組織

学的検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 肝虚血再灌流障害に対する虚血ポストコンならびに再灌流早期のPDEIII阻害薬、Rhoキナーゼ阻害薬投与が肝虚血再灌流障害に与える影響について

90分の部分肝虚血(70%)・再灌流6時間後、肝細胞障害の指標であるAST、ALT、LDH、 $\alpha$ -GSTが著明に上昇していた。組織学的傷害やアポトーシスも強く観察された。

虚血ポストコンのみならず、PDEIII阻害薬、Rhoキナーゼ阻害薬を臨床使用量で再灌流早期に投与することで、AST、ALT、LDH、 $\alpha$ -GSTの上昇、組織学的傷害、アポトーシスが抑制された。

(2) ポストコンにおける分子機序の解明：RISK経路とeNOSに関する検討

PI3K-Akt活性化阻害薬wortmannin、LY294002とERK活性化阻害薬PD-98059、eNOS阻害薬L-NAMEを再灌流5分前に投与すると、コントロール群では差を認めなかったが、虚血ポストコン群、PDEIII阻害薬ポストコン群、Rhoキナーゼ阻害薬ポストコン群によるAST、ALT、LDH、 $\alpha$ -GSTの上昇抑制、組織学的傷害やアポトーシス抑制効果が消失した。

ウエスタンブロット法による検討では、再灌流15分後に、

コントロール群；

PI3-Akt $\rightarrow$ 、ERK $\rightarrow$ 、Rhoキナーゼ $\uparrow$ 、  
虚血ポストコン群；

PI3-Akt $\uparrow$ 、ERK $\uparrow$ 、Rhoキナーゼ $\rightarrow$ 、  
PDEIII阻害薬ポストコン群；

PI3-Akt $\uparrow$ 、ERK $\uparrow$ 、Rhoキナーゼ $\rightarrow$ 、  
Rhoキナーゼ阻害薬ポストコン群；

PI3-Akt $\uparrow$ 、ERK $\uparrow$ 、Rhoキナーゼ $\rightarrow$   
であり、虚血ポストコン群、PDEIII阻害薬ポ

ストロン群、Rho キナーゼ阻害薬ポストロン群で、細胞保護的に働く PI3-Akt、ERK の活性化が生じ、細胞障害へ働く Rho キナーゼ活性化が抑制されていた。

今回の結果から、PDEIII 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬は臨床用量で薬理学的ポストロン作用を有しており、虚血ポストロンと同様に PI3-Akt、ERK、eNOS が関与していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 戸坂真也、戸坂玲子、松本周平、前川拓治、趙 成三、澄川 耕二、Roles of cyclooxygenase-2 in sevoflurane- and olprinone-induced early phase of preconditioning and postconditioning against myocardial infarction in rat hearts、J Cardiovasc Pharmacol Ther、査読有、Vol. 16、2011、pp. 72-78
- ② Eisenach JC、澄川 耕二、榎田徹次、趙 成三、Anesthesiology and the Japanese Society of Anesthesiologists: The Science Is Amazing、Anesthesiology、査読有、Vol. 112、2010、pp. 1301-1302
- ③ 穂山大治、原 哲也、吉富 修、前川拓治、趙 成三、澄川 耕二、Postischemic infusion of sivelestat sodium hydrate、a selective neutrophil elastase inhibitor、protects against myocardial stunning in swine、Journal of anesthesia、査読有、Vol. 24、2010、pp. 575-581
- ④ 戸坂玲子、戸坂真也、趙 成三、前川拓治、原 哲也、澄川 耕二、Direct effect of mild hypothermia on the coronary vasodilation induced by an ATP-sensitive K channel opener、a nitric oxide donor and isoflurane in isolated rat hearts、Journal of anesthesia、Vol. 24、2010、pp. 564-568
- ⑤ 関野元裕、榎田徹次、嬉野浩行、趙 成三、澄川 耕二、Synthetic atrial natriuretic peptide improves systemic and splanchnic circulation and has a lung-protective effect during endotoxemia in pigs、Anesthesia & Analgesia、査読有、Vol. 110、2010、pp. 141-147
- ⑥ 松本周平、趙 成三、戸坂真也、嬉野浩行、前川拓治、原 哲也、澄川 耕二、Pharmacological preconditioning in type 2 diabetic rat hearts: the roles of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway、Cardiovascular Drugs and Therapy、査読有、Vol. 23、2009、pp. 263-270
- ⑦ 柴田伊津子、吉富 修、鶴瀬匡祐、嬉野浩行、趙 成三、前川拓治、原 哲也、澄川 耕二、Administration of the Rho-kinase inhibitor Fasudil before ischemia or just after reperfusion、but not 30 min after reperfusion、protects the stunned myocardium in swine、Cardiovascular Drugs and Therapy、査読有、Vol. 20、2008、pp. 327-334
- ⑧ 戸坂真也、榎田徹次、戸坂玲子、前川拓治、趙 成三、原 哲也、嬉野浩行、澄川 耕二、Cardioprotection induced by olprinone、a phosphodiesterase III inhibitor、involves

phosphatidylinositol-3-OH kinase-Akt and a mitochondrial permeability transition pore during early reperfusion、Journal of anesthesia、査読有、Vol. 21、2007、pp. 176-180

〔学会発表〕（計 1 件）

① 趙 成三 他 2 名、The Effects of Pharmacological Postconditioning with A Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor Milrinone、 and A Calcium Sensitizer Levosimendan、アセアン麻酔学会、2009 年 7 月 2～5 日、マレーシア

〔図書〕（計 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/>

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/anesthesia/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

趙 成三 (CHO SUNGSAM)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90325655