

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591803
 研究課題名 (和文) siRNAによる遺伝子発現抑制系を用いたプレコンディショニングの機序の解明
 研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism involved in ischemic preconditioning using siRNA technology
 研究代表者
 上林 卓彦 (KAMIBAYASHI TAKAHIKO)
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：10273640

研究成果の概要 (和文)：

臓器虚血に対するプレコンディショニング現象に siRNA による低酸素誘導転写因子 HIF-1 α 遺伝子の抑制が影響を与えるかを検討したが、モデルの作成に難渋し、有意な結果を得ることができなかった。実験を通じて中枢神経系へのダメージが心機能に悪影響を与えることを明らかにし、その現象に虚血プレコンディショニングのメカニズムとしての有力な候補であるミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャンネルが関与することをつきとめた。

研究成果の概要 (英文)：

We tried to elucidate the role of hypoxia inducible factor (HIF) -1 α in ischemic preconditioning by regulating HIF-1 α gene expression using siRNA technology, but the effect of the siRNA did not reach statistical significance. During the experiment, we found that brain damage significantly affected cardiac function, and that the mitochondrial ATP sensitive potassium channel, which is known to be another important component of preconditioning, played an important role in the phenomenon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：ラット プレコンディショニング 脳虚血 心筋虚血 脳死 心機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化・食生活の欧米化などにより動脈硬化性病変を合併する患者が増えてきている。それに伴い、冠状動脈狭窄や内頸動脈狭窄など心筋・中枢神経系に虚血のリスクをもつ患者の麻酔管理を行う機会が急増している。近年、主要臓器を短時間虚血状態にいたりある種の薬剤を短時間作用させたりするとその後しばらくの間臓器の虚血耐用

能が増加する、いわゆるプレコンディショニングという現象が注目されるようになった。プレコンディショニングの機序に関する詳細を知ることができれば主要臓器の虚血性疾患を持つ周術期患者の予後の改善に大きく寄与できると考える。

(2) 虚血が起こった場合に組織に起こる特異的な反応のひとつに低酸素誘導転写因子の一つである HIF-1 の活性化をあげることが

できる。HIF-1 は低酸素状態で転写プロモーター上に hypoxia response element (HRE) を持つ遺伝子の転写を活性化して各種生理活性物質の遺伝子の転写を制御する。その標的遺伝子の働きは多岐にわたっており、低酸素に対する生体反応における HIF-1 の重要性が注目されている。虚血プレコンディショニングの際には組織内の HIF-1 活性が増加することが報告されている。また、通常の麻酔薬は HIF-1 活性を低下させるがイソフルレンなど虚血に対する臓器保護作用のある麻酔薬は細胞内の HIF-1 活性を維持することも知られている。これらの事実は HIF-1 の活性化が主要臓器の虚血に対する保護作用、とくにプレコンディショニングに重要な役割を演じている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は siRNA を用いて HIF-1 活性を制御することにより中枢神経系・および心筋に対するプレコンディショニングの効果がどのように影響を受けるか明らかにし、プレコンディショニングのメカニズムの一端を解明することである。具体的には、ラットの心筋虚血モデル・脳虚血モデルにおいて虚血解除後の臓器の機能や梗塞巣の大きさを評価する。虚血イベントの直前に一時的に血流を遮断することによる短時間の臓器虚血（プレコンディショニング）を施し、その臓器保護効果を検討する。その後 HIF-1 機能を制御したラットを用いて同様の実験を行い、プレコンディショニングにおける HIF-1 の役割を明らかにする。

従来生理活性物質の機能を検討する際には knock out mouse や transgenic mouse などその遺伝子の発現を修飾した動物を用いることが多かった。しかし、遺伝子の発現を先天的に修飾された動物には各種代償機構が働くため、正常な動物におけるその生理活性物質の機能を評価するために必ずしも理想的な系であるとはいえない。本研究では siRNA を用いて HIF-1 蛋白質の発現制御を行う。siRNA は遺伝子の発現を短期間、後天的・特異的に抑制することができるので、代償機構など実験結果の解釈を困難にする要素が少ない。また、siRNA を用いたストラテジーは遺伝子治療への応用も可能である。

3. 研究の方法

(1) プレコンディショニングに対する

HIF-1 α 制御の効果の検討

①ラット脳虚血モデルの作成

300g 前後の雄 SD ラットにセボフルレン麻酔を施し、右総頸動脈を露出する。血管壁に小孔を開け、そこから径 0.25mm のナイロン繊維を末梢側に向かって抵抗を感じるところまで挿入し、右中大脳動脈を閉塞する。60 分後にナイロン繊維を抜去し、止血を行った

後に閉創し、麻酔より覚醒させる。この処置から 2 週間後にラットをペントバルビタールで安楽死させ、灌流固定後脳組織を摘出する。摘出した脳組織はパラフィン包埋し、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色を行う。光学顕微鏡視下に梗塞部位をトレースし、その面積を測定・集計することにより梗塞を起こした脳の体積を計算する。

②ラット脳虚血モデルにおけるプレコンディショニング効果の確認

実験①において右中大脳動脈の閉塞を行う 10 分前に一時的な右中大脳動脈閉塞（虚血プレコンディショニング）を施し、梗塞巣の体積を対照群と比較することによりプレコンディショニングの効果を確認する。

③ラット心筋虚血モデルの作成

300g 前後の雄 SD ラットにセボフルレン麻酔を施す。開胸し、心嚢膜を切り開いて左冠状動脈のまわりに 6-0 ポリプロピレン糸をかけ、結び目を作る。結び目に別のポリプロピレン糸を 2 本通しておき冠状動脈周囲の結び目を容易に締めたり緩めたりできるようにする。30 分間血流を遮断した後に結び目を緩める。再灌流から 1 時間後、左冠状動脈にかけた糸を再び締め、エバンスブルーを外頸静脈より投与した後に致死量のペントバルビタール投与にてラットを安楽死させ、速やかに心臓を摘出する。心室筋の切片を作成し、triphenyltetrazolium chloride (TTC) にて染色を行う。エバンスブルーで染色されなかった部位の体積（左冠状動脈結紮により虚血に陥った心筋組織の量）と TTC で染色されなかった部位の体積（梗塞に陥った心筋組織の量）を測定し、虚血心筋に陥った心筋の何%が梗塞に至ったかを記録する。

④ラット心筋虚血モデルにおけるプレコンディショニング効果の確認

実験③において冠状動脈血流遮断を行う 10 分前に一時的な冠状動脈の血流遮断（虚血プレコンディショニング）を施し、同様に心筋梗塞巣の評価を行ってプレコンディショニング効果を確認する。

⑤ラット虚血モデルに対する HIF-1 α 制御の効果の検討

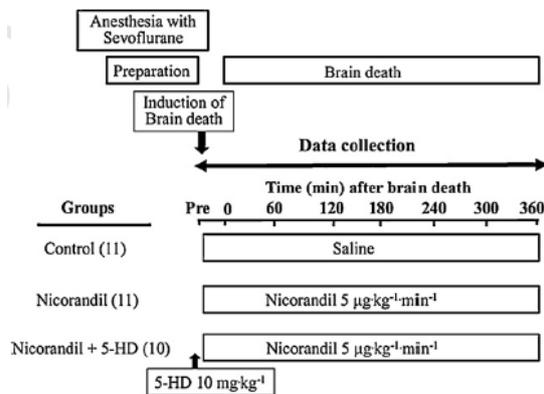
既知のラット HIF-1 α 遺伝子配列に特異的な siRNA を合成する。これをラットの尾静脈より静注投与し、2 日後に上記①-④の虚血モデル実験を行う。siRNA によりプレコンディショニングの効果が影響を受けるか検討する。

(2) 中枢神経系の障害に伴う心機能低下のメカニズムの解明

プレコンディショニングの実験を通じて脳障害が心機能の低下を引き起こす事例を多数経験し、またプレコンディショニングのメカニズムに関わると報告されている薬剤の内でニコランジルに心機能温存傾向があっ

たため、その詳細を明らかにする目的で下記実験を追加した。

300g 前後の雄SDラットにセボフルレン麻酔を施す。心電図をモニターした上で内頸動脈・外頸静脈にカニューレシオンを行う。胸骨縦切開により開胸し、心尖部より左心室腔に向かって心室内圧一容積測定用のカテーテルを挿入し、連続して心室容積を計測することにより左心機能の解析を行う。頭蓋骨に小孔を開け、フォガティカテーテルを挿入しバルーンを膨らませることにより脳死を導入する。(この後セボフルレン投与は停止する。)脳死導入6時間後まで30分おきに血行動態パラメーターを記録する。脳障害時の心機能低下発生のメカニズムを検討するため、血行動態の変化に対するニコランジル(ミトコンドリアATP依存性カリウムチャンネル開口薬) $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$ またはニコランジル+5-hydroxydecanoic acid (5HD:ミトコンドリアATP依存性カリウムチャンネルブロッカー) $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ の効果を確認する。



4. 研究成果

(1) プレコンディショニングに対するHIF-1 α 制御の効果の検討

①②ラットの脳虚血モデルについて

ラットの脳虚血モデルの作成についてはプレコンディショニングの効果を確認する段階で難渋した。当初設定した条件ではデータのばらつきが大きくプレコンディショニングの有意な効果が確認できないため、より効果的なプレコンディショニングの条件(プレコンディショニング時間の増減、プレコンディショニングのタイミングを変える、など)を模索したが、パワーアナリシスにおいても有意差を出すためにはかなりの動物数が必要と判断された。データのばらつきを減少させる目的でラットの系列を遺伝子の個体差が少ない近交系Fisherラットに変更したが、やはりプレコンディショニング群で梗塞巣が小さくなる傾向をしめしたのみで、統計学的有意に至らなかった。今後2群の差を明らかにするために電子顕微鏡や免疫組織化学的手法を用いたより鋭敏な脳細胞のダメージの評価を行う必要があることが示唆さ

れた。また、ラットの脳虚血モデルでは循環動態が不安定になりやすい傾向があり、実験結果に少なからず影響を与えている印象があった。

③④⑤ラットの心筋虚血モデルについて

心筋についてはプレコンディショニング群で対照群に比し有意に梗塞範囲が減少することを確認した。しかしながらHIF-1 α 遺伝子に対するsiRNAの尾静脈内注入はこの効果に有意な影響を与えなかった。ただ、摘出心筋組織内のHIF-1 α 遺伝子のmRNA量にもsiRNAは有意な影響を与えておらず、より遺伝子抑制効率のよいsiRNA投与方法またはsiRNAのデザインの検討が必要と考えられた。

(2) 中枢神経系の障害に伴う心機能低下のメカニズムの解明

平均動脈圧、心拍数、最大心室内圧増加率(dP/dT)、左心室駆出率(EF)について3群を比較した。脳障害導入前には循環系のパラメータについて各群間に差がなかった。平均動脈圧の経時変化を示す。

平均血圧 (mmHg) の推移

分	Control	Nicorandil	Nicorandil+5-HD	群間P値
Pre	65 (62-66)	72 (55-79)	65 (59-70)	0.63
0	66 (58-77)	65 (59-68)	73 (61-79)	0.27
30	70 (63-79)	63 (59-78)	65 (58-104)	0.56
60	73 (64-84)	67 (60-93)	69 (60-110)	0.72
90	78 (56-83)	72 (59-100)	72 (62-112)	0.67
120	64 (57-83)	66 (50-78)	73 (56-110)	0.62
150	67 (51-74)	60 (45-82)	66 (57-108)	0.52
180	58 (50-66)	47 (40-63)	66 (50-97)	0.31
210	54 (47-64)	40 (44-64)	62 (44-98)	0.54
240	57 (47-62)	50 (32-64)	59 (43-92)	0.54
270	47 (38-73)	47 (29-61)	58 (46-96)	0.27
300	41 (33-48)	50 (32-64)	47 (38-88)	0.44
330	39 (32-53)	51 (31-62)	45 (36-57)	0.52
360	30 (28-50)	58 (33-60)	32 (28-56)	0.037

ニコランジルは平均血圧に影響を与えなかった。

心拍数の経時変化を示す。

心拍数 (bpm) の推移

分	Control	Nicorandil	Nicorandil+5-HD	群間P値
Pre	334 (297-347)	325 (281-351)	291 (285-313)	0.30
0	334 (322-414)	408 (288-470)	399 (378-415)	0.63
30	332 (325-367)	381 (303-423)	353 (323-374)	0.59
60	361 (319-383)	381 (314-443)	365 (334-382)	0.84
90	371 (340-409)	415 (328-437)	356 (317-373)	0.39
120	358 (334-390)	386 (306-422)	333 (319-381)	0.33
150	358 (338-409)	369 (317-418)	331 (306-347)	0.52
180	367 (336-410)	366 (303-424)	330 (310-357)	0.11
210	401 (331-429)	360 (317-429)	337 (316-361)	0.32
240	357 (331-397)	370 (282-446)	335 (293-386)	0.65
270	352 (336-401)	360 (279-405)	344 (313-379)	0.73
300	357 (329-382)	360 (306-427)	321 (301-397)	0.60
330	349 (331-377)	346 (306-435)	330 (318-349)	0.58
360	337 (318-364)	346 (306-435)	306 (294-318)	0.24

ニコランジルは心拍数に影響を与えなかった。

dP/dT の経時変化を示す。

dP/dt	maxの推移			
分	Control	Nicorandil	Nicorandil+5-HD	群間P値
Pre	3550 (3163-4349)	3418 (2763-4305)	4172 (3182-4308)	0.83
0	3710 (2940-4895)	4454 (3418-5117)	4791 (3873-5670)	0.14
30	3498 (2924-4451)	3645 (2950-4794)	4676 (3111-5915)	0.45
60	3977 (3357-5415)	4185 (3735-5180)	4326 (3528-6538)	0.93
90	4208 (2622-4515)	5190 (3683-6868)	5276 (3683-6488)	0.21
120	3212 (2339-4917)	4203 (2991-5723)	4303 (3445-6015)	0.31
150	2812 (2667-4272)	3084 (2435-4854)	3757 (2870-5111)	0.58
180	2510 (2057-3297)	2622 (2178-4024)	3341 (2288-4602)	0.44
210	2600 (2168-3349)	2373 (2075-3873)	3073 (2136-4430)	0.65
240	2191 (2081-2841)	2789 (1994-3210)	2742 (1922-4098)	0.76
270	2205 (1471-2459)	2290 (2066-2877)	2867 (1969-4056)	0.34
300	2024 (1471-2459)	2290 (2066-2877)	2803 (1681-4834)	0.32
330	1867 (1425-2179)	2530 (2213-2629)	2082 (1873-2477)	0.07
360	1834 (1465-1876)	2500 (1947-3010)*	1763 (1604-1935)	0.016

ニコランジル群は360分の時点でのみ有意にdP/dTを増加させた。

駆出率の経時変化を示す。

駆出率 (%) の推移				
分	Control	Nicorandil	Nicorandil+5-HD	群間P値
Pre	55.0 (49.3-57.4)	58.1 (55.3-58.8)	58.2 (47.4-63.2)	0.43
0	60.1 (44.8-68.5)	68.0 (53.0-71.1)	64.8 (55.5-69.7)	0.44
30	53.7 (48.8-59.4)	59.3 (52.4-66.3)	57.1 (52.8-66.8)	0.18
60	61.8 (48.2-65.2)	72.4 (62.35-74.4)	66.0 (53.0-67.0)	0.066
90	53.8 (40.9-73.9)	71.4 (60.3-80.5)	65.2 (59.2-71.7)	0.060
120	50.7 (34.2-67.8)	66.2 (57.4-72.7)	60.4 (53.6-67.4)	0.119
150	46.0 (31.1-54.2)	61.0 (52.5-67.3)*	49.2 (44.5-66.7)	0.038
180	35.4 (26.3-41.4)	58.0 (48.2-64.8)*	45.9 (34.9-69.2)	0.006
210	36.9 (26.5-41.4)	50.5 (42.3-60.8)*	41.9 (36.9-57.2)	0.008
240	31.4 (27.2-39.5)	53.9 (45.6-58.5)*	37.3 (31.8-51.7)	0.004
270	32.1 (25.1-35.5)	51.7 (47.1-55.3)*	40.5 (35.4-50.3)	0.002
300	30.8 (21.0-38.3)	50.9 (42.9-52.5)*	36.7 (31.8-47.9)	0.014
330	28.8 (20.8-35.5)	50.4 (41.9-57.0)*	38.9 (23.9-51.3)	0.026
360	28.7 (22.2-38.9)	47.9 (43.2-52.9)	34.5 (28.8-54.0)	0.056

ニコランジルは150分から300分にかけて有意に駆出率を改善した。この効果は5HDにより消失した。

以上の結果よりニコランジルはミトコンドリアATP依存性カリウムチャンネルを介するメカニズムで脳障害後の心機能低下を抑制することが明らかになった。

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1件)

① Mitsuo Iwasaki, Yukio Hayashi, Hiroo Yamanaka, Takahiko Kamibayashi, Takashi Mashimo, Nicorandil preserves myocardial function following brain death in rats by mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channel-dependent mechanism. Eur J Cardiothorac Surg 印刷中 (電子出版済), 2011, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上林 卓彦 (KAMIBAYASHI TAKAHIKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10273640

(2) 研究分担者

林 行雄 (HAYASHI YUKIO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60294063

澁田 達史 (SHIBUTA SATOSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20324767

(3) 連携研究者

なし