

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09192

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フラボノイドの心筋保護効果

研究課題名（英文）Role of PI3K / Akt pathway on cardioprotective effects of flavonoids against ischemia-reperfusion injury

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では心筋虚血前にフラボノイドを投与することで保護効果を発揮するか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、フラボノイドの一つであるミリセチン投与による虚血再灌流時の心機能回復を検討した。更に、フラボノイドの一つであるダイゼインの代謝物質エクオールについても検討を加えた。本研究の結果、ミリセチンの虚血前投与により虚血再灌流時の心機能回復効果を認めた。また、エクオールの虚血前投与によっても虚血再灌流時の心機能回復効果を認めた。ミリセチンおよびエクオールの心筋保護効果にはPI3K/Akt経路の活性化が関与していることが本研究で示唆された。

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。果物や野菜の中に存在するフラボノイドにはPI3K/Akt経路を介した抗アポトーシス効果や脳梗塞障害軽減効果があることが報告されている。本研究では、フラボノイドの心筋虚血-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。本研究の結果、フラボノイドであるミリセチンとフラボノイド代謝物であるエクオールに心筋保護効果が認められ、機序としてPI3K/Akt経路の関与が示唆された。心臓外科手術においてフラボノイド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）：We examined the hypothesis that flavonoid (myricetin) and one of flavonoid's metabolites (S-equol) have preconditioning effects against myocardial ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart model. Our data showed that the left ventricular (LV) dp/dt max in the myricetin group was higher than that in the control group during postischemic reperfusion. The LV dp/dt max in the S-equol group during reperfusion was also greater than that in the control group. These effects were attenuated in the presence of a PI3K inhibitor. We demonstrated that flavonoid and its metabolite have cardioprotective effects against myocardial ischemia-reperfusion injury. Myocardial Akt phosphorylation is a possible mechanism by which flavonoids produce their cardioprotective effects.

研究分野：麻酔科学

キーワード：フラボノイド PI3K/Akt経路 心筋虚血 心筋保護

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) プレコンディショニング

長時間の心筋虚血の前に短時間の虚血再灌流を行うことにより虚血再灌流障害が軽減される。この現象を虚血プレコンディショニング効果と呼ぶが、吸入麻酔などの薬物でも同様の心筋保護効果(薬理的プレコンディショニング)があることが報告されている。一方、PI3K/Akt 経路の活性化は心臓における虚血-再灌流障害の保護に関与するとされ、我々は PI3K/Akt 経路を介したインスリンの心筋保護効果と高血糖との関係について過去に報告した(引用文献)。

(2) フラボノイドとプレコンディショニング

フラボノイドは果物や野菜の中に自然に存在する有機化合物であり、抗酸化作用、抗炎症作用などが報告されている(引用文献)。自然に存在しているフラボノイドの1つにミリセチンがあり、茶、ブドウなどに含まれている。ミリセチンにはPI3K/Akt 経路を介した抗酸化作用による抗アポトーシス効果、PI3K/Akt 経路を介した脳梗塞障害を軽減効果が報告されている(引用文献)。PI3K/Akt 経路の活性化は心臓における虚血-再灌流障害の保護に関与するとされ、PI3K/Akt 経路を活性化するフラボノイドには心筋虚血再灌流障害に対する保護効果があることが期待される。また、大豆に含まれるフラボノイド(ダイゼイン)の代謝物エクオールはエストロゲン活性を持ち、様々な保護効果を示すとされる(引用文献)。しかし、虚血心臓におけるフラボノイドの心筋保護効果とPI3K/Akt 経路の関与については依然として明確ではない。

2. 研究の目的

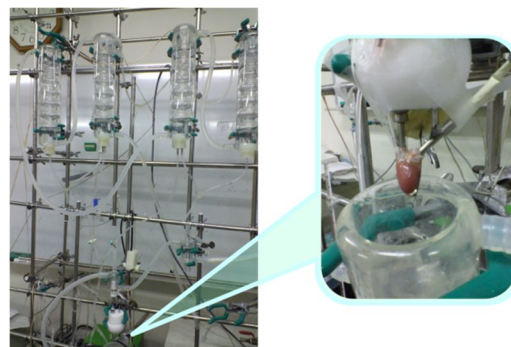
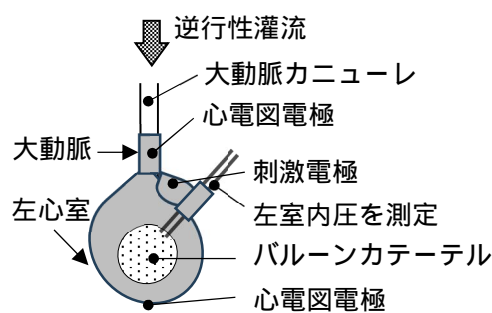
(1) 本研究では、「フラボノイドを心筋虚血前から投与するとPI3K/Akt 経路を活性化することにより心筋保護効果を発揮する」という仮説を立てて、ラットの摘出心筋モデルを用いて検討した。本研究では、フラボノイドとしてミリセチンに焦点を当てて研究した。更に、フラボノイドの一つであるダイゼインの代謝物質であるエクオールについても検討を加えた。

(2) Primary outcome は心収縮力とした。その機序を調べるために、PI3K/Akt 経路の阻害薬(Wortmannin)の影響、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以下の2つの実験を行った。

実験1: 虚血再灌流障害に対するミリセチンの心筋保護効果 (Fig. 2)

Control 群(薬剤投与なし)、Myr 群(ミリセチン 5 $\mu\text{mol/L}$)、MyrW 群(ミリセチン 5 $\mu\text{mol/L}$ + Wortmannin 100nmol/L) の3群間(各群 n=8)で比較検討した。各薬剤は心筋虚血の20分前から先行投与して、虚血15分間、再灌流20分間のプロトコルで、虚血中は222回/分でペーシングを行った。

実験2: 虚血再灌流障害に対するエクオールの心筋保護効果 (Fig. 3)

EQ 群(S-エクオール 1 $\mu\text{mol/L}$)、Cont 群(薬剤投与なし)、EQW 群(S-エクオール 1 $\mu\text{mol/L}$ + Wortmannin 100nmol/L)、ContW 群(Wortmannin 100nmol/L) の4群間(各群 n=8)で比

較検討した。各薬剤は心筋虚血の 20 分前から先行投与して、虚血 7.5 分間、再灌流 20 分間のプロトコルで、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、心収縮力の指標として左室圧 (LV) dp/dt max、心拍数、冠灌流量を先行投与前 (Baseline)、先行投与 20 分、再灌流 5 分、10 分、15 分、20 分で測定した。

(5) 実験 2 では再灌流 20 分後の心臓を液体窒素で瞬間凍結・凍結乾燥して、再灌流終了時の心筋内 pAkt を測定した。

Fig. 2 実験プロトコル (Myricetin)

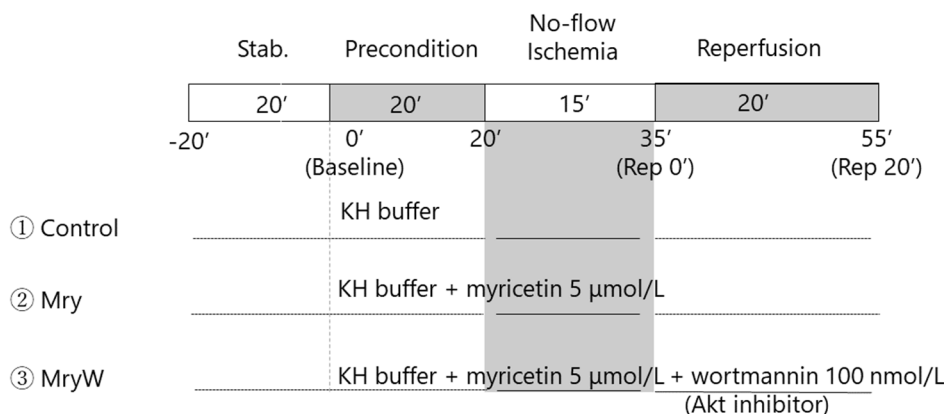
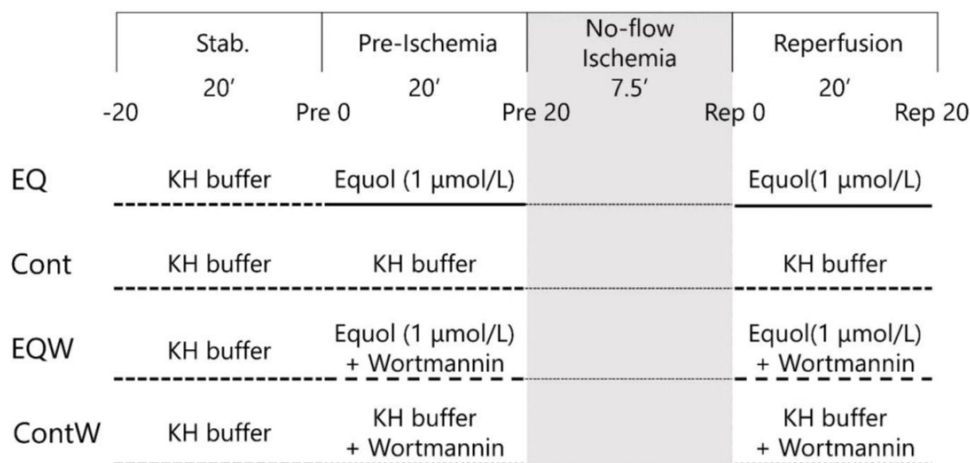


Fig. 3 実験プロトコル (Equol)



4 . 研究成果

(1) 実験 1 の結果 (ミリセチン)

虚血再灌流 15 分後の LV dp/dt max は、Cont 群と比較してミリセチンを投与した Mry 群で有意に高かったが、PI3K/Akt 阻害薬である Wortmannin を投与すると LV dp/dt max の有意な上昇は認めなかった (Fig. 4)。

(2) 実験 2 の結果 (エクオール)

虚血再灌流中の LV dp/dt max は、S エクオールを投与した EQ 群では Cont 群と比較して有意に高かったが、PI3K/Akt 阻害薬である Wortmannin の存在下 (EQW 群) では S エクオールの効果は消失した (Fig. 5)。心拍数と冠還流量に関しても、LV dp/dt max と同様に EQ 群では Cont 群と比較して有意に高かったが、Wortmannin 存在下 (EQW 群) では S エクオールの効果は消失した。再灌流終了時の心筋内 pAkt は、EQ 群では Cont 群と比較して有意に上昇したが、Wortmannin の存在下 (EQW 群) ではこの上昇は抑えられた。

Fig. 4 The changes in LV dp/dt max (Myricetin)

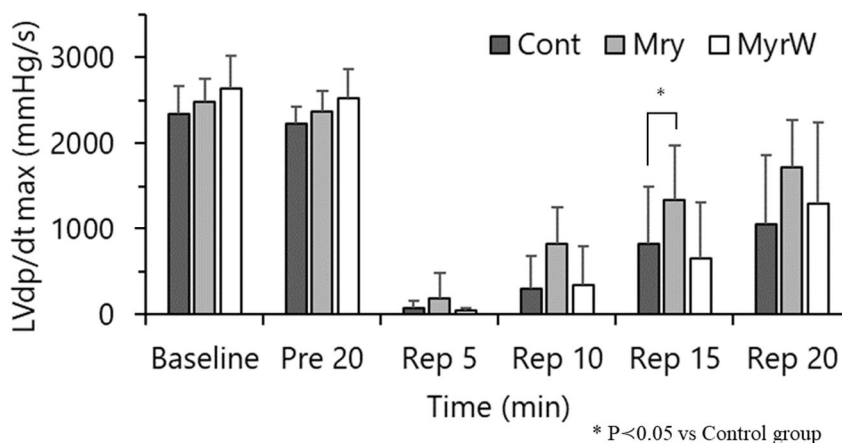
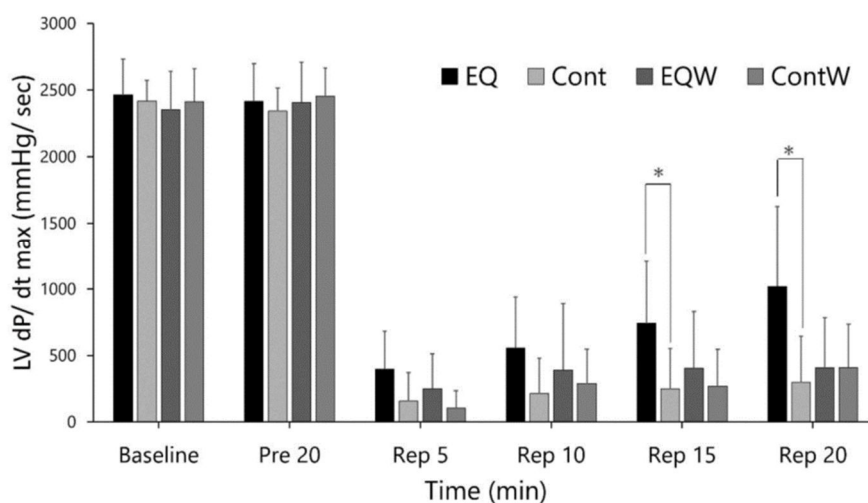


Fig. 5 The changes in LV dp/dt max (Equol)



(3) 本研究の結果、ラットの心筋虚血再灌流モデルにおいてフラボノイドの一つであるミリセチ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。PI3K/Akt 阻害薬により心収縮力回復作用が抑制されたことから PI3K/Akt 経路の関与が示唆された。また、大豆に含まれるフラボノイド(ダイゼイン)の代謝物であるエクオールの虚血前投与によっても虚血再灌流後の心収縮力回復を促進させ、その機序として PI3K/Akt 経路の活性化が示唆された。

(4) 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すとされており、フラボノイド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関与していることが本研究により示された。

(5) 本研究により心臓外科手術において、果物や野菜の中に自然に存在するフラボノイド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>

- Nakadate Y, Sato H, Oguchi T, Sato T, Kawakami A, Ishiyama T, Matsukawa T, Schrickler T: Glycemia and the cardioprotective effects of insulin pre-conditioning in the isolated rat heart. *Cardiovascular Diabetology*. 2017, 16, 43.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR: Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016, 5, e47
- Kang KA, Wang ZH, Zhang R, Piao MJ, Kim KC, Kang SS, Kim YW, Lee J, Park D, Hyun JW: Myricetin Protects Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis via

Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *International journal of molecular sciences*. 2010, 11(11), 4348-4360

Sun L, Xu P, Fu T, Huang X, Song J, Chen M, Tian X, Yin H, Han J: Myricetin against ischemic cerebral injury in rat middle cerebral artery occlusion model. *Molecular Medicine Reports*. 2018, 17, 3274-3280

Mayo B, Vázquez L, Flórez AB: Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects. *Nutrients*. 2019, 11(9), 2231.

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 Mariko Yamada, Yosuke Nakadate, Akiko Kawakami, Keisuke Omiya, Takeshi Oguchi, Tanaka Makoto, Takashi Matsukawa |
| 2. 発表標題 The Cardioprotective Effects of S-equol for Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury is Related to PI3K/Akt Pathway in the Experimental Animal Model |
| 3. 学会等名 カナダ麻酔学会 (Canadian Anesthesiologists' Society Annual Meeting 2023) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023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 |
|-------|--|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 中楯 陽介 (Nakadate Yosuke) (50597002) | 筑波大学・附属病院・病院講師 (12102) | |
| 研究分担者 | 石山 忠彦 (Ishiyama Tadahiko) (90293448) | 山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501) | |

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 |
|---------|---------|