

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591395

研究課題名（和文）チアノーゼ型心疾患モデル再灌流心筋の酸化ストレスに対するカルニチンの効果

研究課題名（英文）Effects of carnitine to oxygen stress occurred in the reperfused myocardium from the cyanotic congenital heart disease model

研究代表者

糸井 利幸（ITOI TOSHIYUKI）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10264780

研究成果の概要（和文）：

慢性低酸素暴露によるチアノーゼ型先天性心疾患のモデル心臓を作成した。心臓灌流システムとして冠血流を一定にしたランゲンドルフ法を新たに採用し、その心臓の虚血後再灌流障害を検討した。結果は予想に反して低酸素暴露心の方が対照心に比べて虚血後再灌流時の心機能低下が少ないことが明らかとなり、膜脂質構成の変化、過酸化脂質産生の変化、抗酸化酵素類の濃度変化などを逐次検討中である。

研究成果の概要（英文）：

We have created a rat model of cyanotic congenital heart disease by chronic hypoxic exposure. A constant Langendorff coronary perfusion system was adopted as a new model for examination of cardiac ischemic reperfusion injury. The result was that, contrary to expectations, the hearts from low oxygen exposed rats showed less suppression of cardiac function after ischemic reperfusion to the contrast with the control hearts. Currently, we are considering the sequential changes in the composition of membrane lipids, changes in lipid peroxide production, and changes in the concentration of antioxidant enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児循環器学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：未熟心、循環器、心筋代謝、再灌流障害、脂質

1. 研究開始当初の背景

チアノーゼ性先天性心疾患(CHD)に対する手術成績は飛躍的に向上し、手術技術の進歩により低年齢での手術が可能となってきたが、術後の心機能回復は非チアノーゼ型 CHD と比較して未だに満足な状態ではない。チアノーゼ型 CHD の周術期の心筋代謝を考える上で重要な要素は、1) 心筋肥大、2) 慢性低酸素、3) 虚血後再灌流であるが、それぞれの現象を包括的・統合的に検討されたことは無い。

●慢性低酸素と脂質過酸化

酸化ストレス特にフリーラジカル発生にとまなう脂質過酸化は、心臓を含め周術期の生体内組織に傷害を生じる重要な要因とされている。チアノーゼ型 CHD の場合、術前血中酸素分圧が 35-40mmHg 程度であるのが、術中人工心肺装置から送血される供給血液の酸素分圧は 200mmHg 以上に達する。組織が高濃度酸素にされされる際にフリーラジカルが発生する。生体内では細胞膜上に多量の脂肪酸をリン脂質として含有しており、二重結合をふたつ以上もつ多価不飽和脂肪酸

(polyunsaturated fatty acid: PUFA) が傷害されて過酸化脂質を生じる。

われわれは、生後 4 週ラットを 2 週間の低酸素環境で飼育し、心臓組織では n-6 系 PUFA であるリノール酸が有意に減少し、n-3 系 PUFA であり二重結合の多いドコサヘキサエン酸が有意に増加することを見出した (Circ J. 2008)。一方、抗酸化酵素である superoxide dismutase (SOD) は減少し、低酸素負荷後の高酸素暴露により過酸化脂質産生の指標である malondialdehyde (MDA) が有意に増加した。したがって、低酸素環境に適応した細胞膜は、過酸化脂質を発生しやすい PUFA の増加と SOD の低下で、高濃度酸素暴露の際には多量の過酸化脂質が産生することを明らかにした (Circ J. 2008)。

●心肥大におけるエネルギー代謝と膜脂質

心筋肥大は外的負荷に対する適応反応で、成熟肥大心では「胎児型」の代謝状態に回帰することが指摘されている (Circulation. 2001)。われわれは圧負荷肥大心では解糖系が亢進し、脂肪酸酸化能が低下することを示した (Am J Physiol. 1994, Circ Res. 1997, Heart Fail Rev. 2002)。肥大におけるこれらのエネルギー代謝上の変化は脂肪酸酸化の律速酵素である carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) 活性を制御する諸酵素の幼若化が原因となり得る。解糖系の亢進は中間代謝物の

ひとつである glycerol-3 phosphate (G3P) の増加を、脂肪酸酸化能の低下は活性脂肪酸すなわち acyl-CoA の増加を誘導する。G3P と acyl-CoA は phospholipase の働きにより細胞膜を構成するリン脂質合成の基質となるが、肥大心の細胞膜リン脂質構成に関してはほとんど検討されていない。

●心筋脂肪酸代謝と apoptosis

膜構成スフィンゴ脂質の ceramide は apoptosis 制御の中心のひとつで、心筋では虚血後再灌流などのストレスに対する細胞反応を協調させる働きも注目されている。

Ceramide の産生は sphingomyelin の加水分解以外に palmitoyl-CoA からの de novo 合成の存在が最近確認された。慢性低酸素負荷による新生児ラットの肥大右心室心筋では、ceramide 濃度が低下しており (Pediatr Res 2002)、われわれも容量負荷幼若心筋で ceramide 濃度が減少することを確認した (論文作成中)。これら肥大心での apoptosis 抑制は物理的負荷に対する適応と考えられるが、圧負荷肥大心が慢性低酸素環境で apoptosis を誘導するのか、またそのような心臓の虚血後再灌流時の機能障害に酸化ストレスによって誘導された apoptosis が関与しているのかは不明である。

●carnitine およびそのエステルの薬理効果

最近、酸化ストレスによる細胞障害に対して carnitine が抗酸化作用を有するということが報告されている (Int J Cardiol. 2006)。われわれは 2 週間の低酸素暴露中に carnitine 投与を続けると、ドコサヘキサエン酸の増加にもかかわらず高濃度酸素暴露による MDA の増加すなわち脂質過酸化の促進が抑制されることを報告した (Circ J. 2008)。これまで心不全、虚血再灌流障害に対する carnitine の有効性は報告されていたが、病的心における apoptosis を含めた脂肪酸代謝動態の変化と carnitine との相互関係は十分解明されていない。

carnitine 濃度の増加は acyl-CoA の減少と sphingomyelin の加水分解を抑制して ceramide 産生制御による apoptosis の抑制を行なう。最近の報告では carnitine およびそのエステルが、heme oxygenase-1 (HO-1), endothelial NO synthase (eNOS) の活性を増強することによっても apoptosis を抑制するが示された (Int J Cardiol. 2006)。

2. 研究の目的

われわれはこれまでの研究で、ラット、幼若家兔に対する圧負荷心、容量負荷心の作成、

幼若ラットに対する慢性低酸素実験、孤立灌流心に対する虚血後再灌流実験を行い、その方法を確立してきた。

本研究では、1年次にそれぞれを一連の実験系として統合化するシステムを確立する。具体的には生後4週ラットに対して動脈狭窄を作成し、その後低酸素環境(10%)で2週間飼育する。2週間の飼育後超音波検査で心肥大の程度と心機能を確認後、心臓を摘出し、開心術を想定したworking mode 孤立灌流システムを開始(灌流液は高濃度酸素)して20分の前灌流、30分の完全虚血後40分の再灌流を行なう。2週間低酸素環境、孤立灌流虚血前、再灌流開始前、再灌流後それぞれのタイミングで、心臓の膜脂質構成、抗酸化酵素(SOD, catalase, HO-1, eNOS)、carnitine濃度を測定する(対象 vs 肥大心)。1年次では肥大心の低酸素負荷、高濃度酸素暴露、再灌流の一連の状況における、膜脂質構成とくにn-3系PUFAの増加と過酸化脂質産生増加とceramideの関与する酸化ストレスと脂質誘導性のapoptosisの亢進/抑制を明らかにする。2年次は低酸素2週間の飼育中にcarnitineの投与を行い、1年次と同様のシステムでサンプルを取得して対象と比較する。更にcarnitine エステル投与の優位性を検討するためacetylcarnitineを投与して同様の実験を行なう。3年次では、肥大心における膜脂質構成の変化による過酸化脂質増加、ceramide増加、apoptosis誘導をcarnitine エステルが抑制することを明らかにする。

3. 研究の方法

◆使用動物: Sprague-Dawley rat (4週齢、離乳直後)

◆飼育条件: 水、餌 制限無し、2時間サイクル照明

◆大動脈狭窄手術:

4週齢のラットに対して2%セボフルランを用いて吸入麻酔し、左側腹部切開により大動脈の腎動脈分岐部を露出する。腎動脈分岐上部をリガクリップにより狭窄作成し閉腹する。対象はシャム手術を施す。

◆慢性低酸素のための送気ガス方法

圧縮空気と窒素の混合ガスを密閉した飼育チャンバーに送気し、チャンバー内の酸素濃度を10%として2週間暴露する。

◆心臓摘出と心筋組織採取

酸素濃度10%の調節ガスによる人工呼吸器下に、心エコー(既存)にて心臓の各種計測を行なった後開胸し心臓摘出する。心筋組

織採取の際はそのまま液体窒素にて冷やしたWallenburger clamp(既存)で瞬時に凍結圧挫して液体窒素中に保管する。灌流実験のためには摘出した心臓を直ちにWorking mode 孤立灌流システムに導入する。灌流液中の酸素分圧は200mmHg以上の高濃度となっている。灌流心筋の採取は20分の前灌流後、30分の虚血直後、そして40分の再灌流後にそれぞれWallenburger clampで瞬時に凍結圧挫して液体窒素中に保管する。心臓まるごとの凍結なので、後述の通り各段階の実験スケジュールを個別に設定する。

◆Langendorff mode 孤立灌流

灌流液: Krebs-Henseleit 緩衝液 (pH=7.4), 5.5mM glucose, 1.2mM palmitate, 1.25mM Ca²⁺

当初予定していたWorking mode 灌流より冠血流が比較的一定であり、左室圧を測定できるLangendorff modeによる灌流法を行った。左心室圧と心拍数の連続測定を行なう。心機能は血圧 x 心拍数(double product)、心拍出量 x 心拍数で評価する。

◆脂質分離: Bligh-Dyer 法にて行なう

◆各種リン脂質分離: 薄層クロマトグラフィーにて行なう

◆脂肪酸測定 (Lepage 法を改変)

機器: gas chromatography(GC-17A) mass spectrometer(QP-5000) 既存
使用カラム: column DB23 (30m x 0.25mm i.d., film thickness 0.25µm)

リン脂質分画 PE および PC

測定脂肪酸:

C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, C20:5, C22:6 の十種

◆リン脂質構造分析および Ceramide 測定

機器: Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) (Bruker)
移動相: acetonitril/methanol/water (6:7:2), 0.1% 蟻酸アンモニウム(pH=7.4)

◆carnitine 測定 <Millington らの方法を改変>

装置: triple stage quadruple mass spectrometer, QUATTROにて測定 既存

◆過酸化脂質測定 (チオバルビツール酸法) <Ohkawa 変法を改変>

使用機器: SmartSpec (BioRad Co.) 既存
ホモジナイズ: 心筋湿重量 30mg に対し 1.15%KCl 0.5ml)

過酸化脂質は単位組織蛋白量に対するmalondialdehyde(MDA)量で表示する

◆SOD, catalase 測定

SOD Assay Kit-WST および catalase assay kit

を用いる

◆灌流実験

各群 Sham、肥大それぞれについて n=8 ずつの 2 グループで、術後 14 日間飼育する。心筋組織は液体窒素保存して上記の生化学的検討を行なう。□は高濃度酸素投与を示す。

- 1 群：低酸素なし→心筋採取
- 2 群：低酸素負荷→心筋採取
- 3 群：低酸素なし→前灌流→心筋採取
- 4 群：低酸素負荷→前灌流→心筋採取
- 5 群：低酸素なし→前灌流→虚血→心筋採取
- 6 群：低酸素負荷→前灌流→虚血→心筋採取
- 7 群：低酸素なし→前灌流→虚血→再灌流→心筋採取
- 8 群：低酸素負荷→前灌流→虚血→再灌流→心筋採取

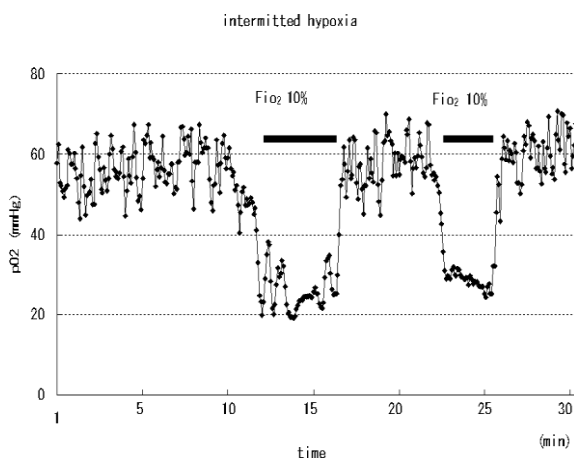
4. 研究成果

慢性低酸素負荷

圧縮空気と窒素の混合ガスを密閉した飼育チャンバーに送気し、チャンバー内の酸素濃度を 10%として 2 週間暴露する。

この条件でラットは活動および餌摂取量が減少するため体重増加が 20%程度減少したが、全例生存した。

この状態で OXY LAB (Primetech Co.)を用いて心筋組織内 pO₂ 連続測定した結果、心筋内酸素分圧は平均 60mmHg から 20-30mmHg に低下した。これはチアノーゼ性先天性心疾



患に類似の心筋酸素分圧と考えられた(図1)。

図 1

心臓灌流

当初、左心房への前負荷、左心室への後負

荷を一定にする心臓の孤立灌流システムである working mode の確立を目指したが、虚血後再灌流時の心機能が極めて不安定で十分な効果判定が得られなかった。そこで、心臓灌流法として Langendorff mode の確立に変更した。

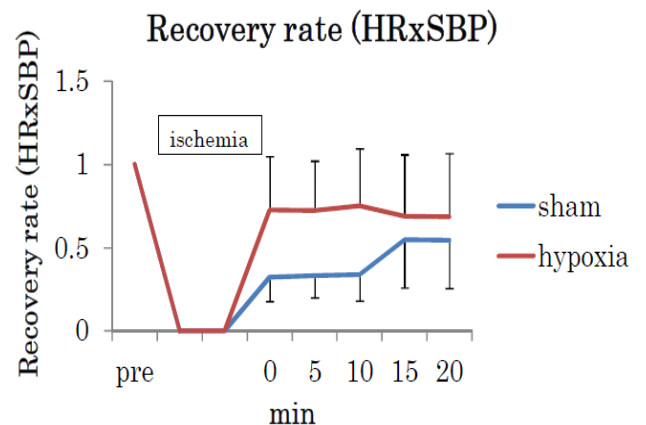
Langendorff 法は左心房から左心室に balloon を挿入し左室内圧を測定するもので、虚血後再灌流時の心機能が比較的安定した状態で得ることができた。

虚血後再灌流

対象群での再灌流時心機能が虚血前の心機能の 50~60%程度となる虚血時間を検討したところ、虚血時間は 30 分が適当と判定された。本研究での虚血時間を 30 分として再灌流障害について検討した。

低酸素負荷心の 30 分虚血後の再灌流時の心機能

当初高度の低下を想定していたが、今回の



検討では予想に反して対照群よりも良好な心機能回復を認めた(図2)。

図 2

*上記の現象を説明するためにはいわゆる Pre-conditioning の概念を導入する必要がある。現在、脂肪代謝に必要な GC-MS が運転不能状態で、脂肪酸プロファイルの同定と脂肪酸過酸化の詳細については検討が不十分であることも踏まえて、実験計画の一部見直しを行っている。

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)

〔図書〕(計1件)

Toshiyuki Itoi (2011). Myocardial Lactate Metabolism in Children with Non-Cyanotic Congenital Heart Disease, Congenital Heart Disease - Selected Aspects, P. Syamasundar Rao (Ed.), ISBN: 978-953-307-472-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/myocardial-lactate-metabolism-in-children-with-non-cyanotic-congenital-heart-disease>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸井 利幸 (ITOI TOSHIYUKI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：10264780

(2) 研究分担者

問山 健太郎 (TOIYAMA KENTAROU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：00433285