

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25年4月23日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791442

研究課題名（和文）糖尿病ラットでの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）The development of pharmacological postconditioning in diabetes rats and the elucidation of the molecular mechanism.

研究代表者

一ノ宮 大雅 (TAIGA ICHINOMIYA)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：50404249

研究成果の概要（和文）：

ラットの心筋梗塞モデルにおいて Rho kinase 阻害薬である塩酸ファスジルを再灌流直前に投与することで心筋保護効果が得られた（ポストコンディショニング）。塩酸ファスジルのポストコンディショニング作用はミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネル（mKATP チャネル）の活性化を介しており高血糖により阻害されるが、高用量の塩酸ファスジルは高血糖下においてもポストコンディショニング作用を発揮することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Fasudil induces PostC against myocardial infarction via activation of m-KATP channels in the rat. Although hyperglycemia attenuates the PostC, high-dose fasudil can restore cardioprotection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成24年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：薬理的ポストコンディショニング、塩酸ファスジル、糖尿病

1. 研究開始当初の背景

あらかじめ短時間の虚血または薬剤投与を行うことでその後の長時間虚血による心筋梗塞サイズが縮小する現象をプレコンディショニング（PreC）といい、その臨床応用に向けて多くの研究がなされてきた。近年、長時間虚血後の再灌流初期に短時間の虚血や薬剤投与を行うことで心筋梗塞サイズが縮小する現象、ポストコンディショニング（PostC）が報告された。予測できない虚血

イベントに対しても応用できる可能性があるため、有効な薬理的 PostC 法の開発は臨床的にも非常に有用であると考えられる。

糖尿病患者や高血糖状態においては、虚血または揮発性麻酔薬によるプレコン・ポストコンによる心筋保護作用が減弱することが近年報告されている。しかし、糖尿病患者の虚血性心疾患発生のリスクは高いため、糖尿病患者や高血糖状態に影響を受けない薬理的ポストコン法を確立することは臨床応用す

るために必須と思われる。

高血糖状態においては、主に細胞内酸化ストレス、PKC活性化抑制、KATPチャンネル開口障害がプレコン・ポスココン作用減弱の機序として報告されてきているが、近年注目されてきている Rho-kinase や mPTP の関与についてはほとんど知られていない。

Rho-kinase 阻害薬である塩酸ファスジルは脳動脈瘤破裂後の脳血管攣縮に対して臨床使用されているが、冠動脈疾患に対しても有用であるとされている。Rho kinase は様々な細胞機能に関連する酵素であり、心血管系の疾患において極めて重要な役割をなすとされている。虚血心筋において Rho kinase の活性化が認められ、Rho kinase 阻害薬を投与することで心筋保護効果が得られるとされているがその分子細胞機構については明らかにされていない。加えて、薬理的ポスココン法（投与量、投与時期）に関する検討は少なく、糖尿病や高血糖の影響に関する検討はなされていない。

2. 研究の目的

ラット心筋虚血再灌流モデルを用いて Rho kinase 阻害薬であるファスジルの高血糖下 (BS≒350 mg/dl) での PostC 効果及びミトコンドリア ATP 感受性 K チャンネル (mKATP チャンネル) の役割について検討した。

3. 研究の方法

すでに確立された *in vivo* 心筋虚血再還流モデルを用い、ラット心筋虚血モデルにファスジルを虚血後に投与しコントロール群と比較してその心筋保護効果を検討する。またその投与量が心筋保護効果に及ぼす影響も合わせて検討する。同じく虚血前よりブドウ糖投与を行い高血糖状態としたラットの心筋虚血モデルにファスジルを虚血後に投与し、コントロール群と比較してその心筋保護効果を検討する。また、心筋虚血ラットにファスジル投与前に mKATP チャンネル阻害薬を投与し心筋保護作用の機序について検討する。

(1) 心筋虚血再灌流障害に対する薬理的ポスココン法の検討

①心筋虚血再還流モデル: SD ラットにペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔後、右内頸静脈に薬剤投与用静脈ルートを確認、右内頸動脈に圧トランスデューサーカテーテルを留置する。

②生体監視装置を用いて動脈圧、心拍数を経時的に測定する。

③気管切開の上人工呼吸管理とした後に左開胸し、心臓を露出した後に肉眼的に冠動脈

左前下行枝を同定し、7-0 ナイロン糸をかけ30分間の冠動脈閉塞を行い、その後120分間再還流時間を設ける。

④心筋虚血モデルにおいて以下に示す群を設定する。

コントロール群: 心筋虚血再還流のみ (CON)
塩酸ファスジル群: 虚血再灌流直前に塩酸ファスジル 0.15 mg/kg (LF) または 0.5 mg/kg (HF) 投与

⑤再灌流時間の後、冠動脈を再び閉塞した状態でパテントブルーダイを心腔内に投与し虚血危険領域を明らかにした状態で心臓を取り出し凍結保存し、その後に心筋切片を TTC 染色にて染色し梗塞領域を明らかにして、梗塞領域と虚血危険領域の面積比を求め各群間において比較する。

(2) 高血糖ラット心筋虚血再還流障害に対する薬理的ポスココン法の検討

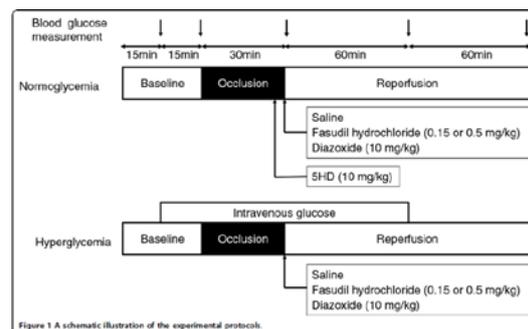
内頸静脈カニューレーション後よりブドウ糖 0.5 g/hr の投与を行い、血糖 ≒ 350 mg/dl の高血糖状態を作る (HG)。その後上記実験で得た心筋保護効果を示すファスジルの投与量でポスココンを行い、心筋保護効果への影響を検討する。

(3) 分子機序の解明 (mKATP チャンネルの役割)

①高血糖ラットに対して mKATP チャンネル開口薬: ジアゾキサイド 10 mg/kg (DIA) を再灌流直前に投与し保護効果への影響を検討する。

②mKATP チャンネル阻害薬: 5-hydroxydecanoic acid (5HD) 10 mg/kg を塩酸ファスジルに先立って投与し、保護効果への影響を検討する。

実験タイムコース



4. 研究成果

1) 血行動態

①群内及び群間において MAP、HR ともに有意差を認めなかった。

2) 虚血危険領域及び心筋梗塞範囲

	AAR/LV (%)	IS/AAR (%)
CON	51 ± 9	42 ± 7
LF	46 ± 9	23 ± 8*
HF	52 ± 9	21 ± 9*
DIA	46 ± 7	21 ± 10*
5HD	48 ± 8	46 ± 12
HF + 5HG	44 ± 7	42 ± 13
HG	43 ± 13	42 ± 10
LF + HG	50 ± 9	40 ± 11
HF + HG	45 ± 7	21 ± 13*
DIA + HG	48 ± 9	44 ± 14

Date are mean ± SD, and n = 10 for each.
 CON = control; LF or HF = 0.15 or 0.5 mg/kg fasudil hydrochloride; DIA = 10 mg/kg diazoxide; 5HD = 5-hydroxydecanoic acid; HG = hyperglycemia.
 *Significantly (p < 0.05) different from control.

①各群で虚血危険領域に有意差を認めなかった。

3) 血糖値

	baseline	before ischemia	just after reperfusion	1 h after reperfusion	2 h after reperfusion
CON	105 ± 12	81 ± 19	112 ± 27	105 ± 32	101 ± 30
LF	95 ± 11	106 ± 14	122 ± 26	118 ± 26	100 ± 29
HF	89 ± 17	87 ± 13	111 ± 13	93 ± 35	95 ± 26
DIA	90 ± 14	88 ± 14	107 ± 31	120 ± 35	107 ± 28
5HD	88 ± 12	85 ± 16	101 ± 28	108 ± 18	111 ± 28
HF + 5HG	87 ± 8	86 ± 9	105 ± 24	101 ± 26	104 ± 24
HG	92 ± 12	349 ± 32**	360 ± 50**	353 ± 38**	300 ± 39
LF + HG	92 ± 13	338 ± 29**	378 ± 52**	327 ± 29**	305 ± 40
HF + HG	92 ± 12	341 ± 29**	374 ± 29**	337 ± 49**	310 ± 28
DIA + HG	91 ± 13	349 ± 22**	350 ± 53**	353 ± 38**	306 ± 37

Date are mean ± SD, and n = 10 for each.
 CON = control; LF or HF = 0.15 or 0.5 mg/kg fasudil hydrochloride; DIA = 10 mg/kg diazoxide; 5HD = 5-hydroxydecanoic acid; HG = hyperglycemia.
 **Significantly (p < 0.05) different from baseline.
 *Significantly (p < 0.05) different from control.

- ①高血糖群において糖液投与中の血糖はコントロールと比較して有意に高かった。
- ②高血糖群において各測定ポイントにおいて、群間に有意差を認めなかった。

4) 塩酸ファスジル、ジアゾキサイドの心筋保護効果と高血糖の影響

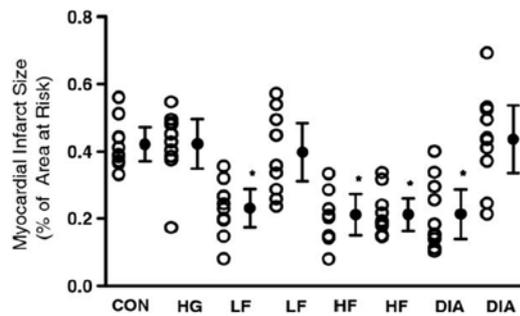


Figure 2 Myocardial infarct size expressed as a percentage of the left ventricular area at risk. Hyperglycemia (HG) group was administered 50% glucose during occlusion and until 1 h after reperfusion. CON received saline just before reperfusion; LF or HF, 0.15 or 0.5 mg/kg fasudil hydrochloride; and DIA, 10 mg/kg diazoxide. Data are mean ± SD and n = 10 for each. *Significantly (p < 0.05) different from control.

- ①低用量、高用量塩酸ファスジルの投与は共に心筋保護効果を示した。
- ②低用量塩酸ファスジルの心筋保護効果は高血糖下において抑制されたが、高用量塩酸ファスジルの心筋保護効果は高血糖下においても維持された。
- ③ジアゾキサイドの心筋保護効果は高血糖下において抑制された。

5) 塩酸ファスジルの心筋保護効果におけるmKATPチャンネルの役割

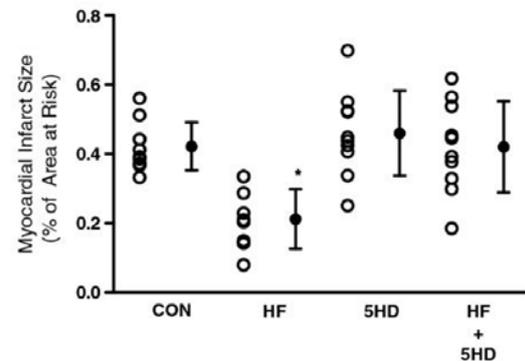


Figure 3 Myocardial infarct size expressed as a percentage of the left ventricular area at risk. 5HD group was administered 10 mg/kg 5-hydroxydecanoic acid at 5 min before reperfusion. CON received saline just before reperfusion; HF, 0.5 mg/kg fasudil hydrochloride. *Significantly (p < 0.05) different from control.

①高用量塩酸ファスジルの心筋保護効果は5HDの投与により抑制された。

本研究により塩酸ファスジルが薬理的なポストコンディショニング効果を発揮し、高血糖下においても用量を増やせば心筋保護効果を得ることが出来ることが明らかとなった。また作用機序としてmKATPチャンネルの活性を介していることも明らかとなった。

臨床使用中の薬剤であり且つ冠動脈疾患においても冠拡張作用から有用だとされている塩酸ファスジルが、高血糖下においても心筋保護効果を発揮できることを明らかにしたことは、薬理的なポストコンディショニングを臨床応用する点において非常に有益である。

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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Taiga Ichinomiya, Sungsam Cho, Ushio Higashijima, Shuhei Matsumoto, Takuji Maekawa, Koji Sumikawa, High-dose fasudil preserves postconditioning against myocardial infarction under hyperglycemia in rats: role of mitochondrial KATP channels, Cardiovasc Diabetol. 2012 Mar 22;11(1):28
DOI: 10.1186/1475-2840-11-28

[学会発表] (計2件)

- ① 一ノ宮大雅 他、急性高血糖ラット心筋虚血モデルにおける塩酸ファスジルの心筋ポストコンディショニング効果、日本集中治療医学会 2010/3/5、広島

②Koji Sumikawa, Taiga Ichinomiya, et al.
High-dose fasudil preserves
postconditioning against myocardial
infarction under hyperglycemia in
rats:role of mitochondrial KATP
channels 、 World Congress of
Anesthesiologists 2012/4/22(トルコ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

一ノ宮 大雅 (TAIGA ICHINOMIYA)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：50404249