

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592691

研究課題名(和文)心虚血・再灌流時における心筋間質セロトニン動態解明と心筋細胞傷害軽減の検討

研究課題名(英文)myocardial interstitial serotonin and 5-hydroxyindole acetic acid levels during ischemia-reperfusion

研究代表者

秋山 剛 (AKIYAMA, Tsuyoshi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70202554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔下ウサギあるいはラットにマイクロダイアリシス法を用い、虚血部心筋間質セロトニン(5-HT)、および5-HTのmonoamine oxidase (MAO)による代謝物である5-HIAAを同時モニタリングし、心虚血・再灌流時における5-HT動態を解明した。虚血中の心筋間質5-HT濃度上昇には、再取り込み機構の逆向き輸送によって流出した5-HTが関与していると考えられた。一方、虚血中の心筋間質5-HIAA濃度低下は、虚血によるMAO活性低下が原因と考えられた。また、再灌流後の心筋間質5-HIAA濃度の上昇は、MAO活性の回復によるもので、心筋間質5-HT濃度の低下に貢献していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using microdialysis technique, we monitored myocardial interstitial 5-HT and its metabolite by monoamine oxidase (MAO), 5-HIAA levels in the ischemic region of anesthetized rat or rabbit during ischemia and reperfusion. In vehicle, 5-HT levels increased during ischemia, but 5-HIAA levels decreased during ischemia. After reperfusion 5-HT levels transiently increased and then declined. 5-HIAA levels increased after reperfusion and kept high level. Fluoxetine decreased 5-HT levels during ischemia, but did not change 5-HIAA levels after reperfusion. Pargyline increased 5-HT levels after reperfusion and decreased 5-HIAA levels after reperfusion. During ischemia, the carrier-mediated 5-HT efflux could contribute to the increase in 5-HT levels and the decrease in 5-HIAA levels could be ascribed to the reduction of MAO activity due to oxygen depletion and acidosis. After reperfusion, washout to blood as well as removal by uptake carrier could contribute to the decrease in 5-HT levels.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：心臓 虚血・再灌流 セロトニン 5-HIAA マイクロダイアリシス法

1. 研究開始当初の背景

- (1) 心虚血・再灌流時、心筋間質 serotonin (5-HT)は、5-HT receptor を介して、血小板凝集の促進、冠動脈収縮、求心性交感神経線維刺激、不整脈、心肥大等の病態を引き起こし、心虚血・再灌流時における心筋細胞傷害を助長する (receptor-dependent effect)。一方、血小板から放出された 5-HT は、serotonin transporter (SERT)を介して心筋細胞内に取り込まれ、細胞内 monoamine oxidase (MAO)によって代謝され、最終的に 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)となって細胞外に放出される。その際に活性酸素である過酸化水素 (H_2O_2)が生成されるが、この H_2O_2 が心筋細胞傷害を起こすと考えられている (MAO-dependent effect)。
- (2) 心虚血・再灌流時の心筋間質の 5-HT 動態を決定する因子として、血液からの 5-HT の供給、血小板からの 5-HT 放出、心筋間質 5-HT の細胞内への取り込み、MAO による 5-HT 代謝などが考えられる。しかし、これら因子が心虚血・再灌流時の心筋間質 5-HT 動態にどのように関与しているかは解明されていない。また、receptor を介した直接作用と H_2O_2 を介した間接作用の二つ見地から、心筋間質 5-HT による心筋細胞傷害の軽減が可能かどうかは、検討されていない。

2. 研究の目的

- (1) in vivo において心虚血・再灌流時の心筋間質 5-HT 動態を解明するために、microdialysis 法を用いて、心虚血・再灌流時の虚血部心筋間質 5-HT をモニターし、5-HT の放出、SERT を介した細胞内への取り込み、MAO による代謝等の因子が、虚血部心筋間質 5-HT 動態にどのような関与をしているかを解明する。
- (2) microdialysis 法を用いて、心筋間質 5-HT と、MAO による代謝物である心筋間質 5-HIAA を同時モニターし、receptor を介した直接作用と H_2O_2 を介した間接作用の二つ見地から、in vivo において心虚血・再灌流時の虚血部心筋間質 5-HT 動態を解明する。また、心筋間質 5-HIAA 濃度変化から、薬理学的に MAO による心筋細胞内 H_2O_2 産生の抑制が可能かを検討する。

3. 研究の方法

- (1) ネプタール麻酔下および人工呼吸下で、ラットあるいはウサギを左開胸し、左冠状動脈に冠閉塞用の糸をかけ、虚血予定部位の心筋に microdialysis probe を植え込んだ。一方より微量注入 injection pump を用いてリンゲル液、あるいは薬剤を含んだリンゲル液を灌流し、他方よ

り心筋透析液を採取した。心筋間質の 5-HT, 5-HIAA は、半透膜部分の dialysis fiber を介して、濃度勾配により灌流液中に移動する。一方、リンゲル液に含まれた薬剤は、血流のない虚血部でも、dialysis fiber を介して、灌流液から心筋間質に移動する。採取した透析液中の 5-HT, 5-HIAA 濃度を、HPLC にて測定し、それぞれ心筋間質 5-HT, 5-HIAA 濃度の指標とした。

- (2) 麻酔下ウサギにおいて、心虚血 30 min および再灌流 60 min の間に、虚血部心筋間質 5-HT 濃度を、10 min の sampling time にてモニターし、serotonin uptake inhibitor (SSRI) および MAO inhibitor 投与の影響を調べた。
- (3) 麻酔下ラットにおいて、心虚血 30 min および再灌流 45 min の間に、虚血部心筋間質 5-HT および 5-HT の MAO による代謝物である 5-HIAA 濃度を、7.5 あるいは 15 min の sampling time にて同時モニターし、SSRI および MAO inhibitor 投与の影響を調べた。

4. 研究成果

- (1) 麻酔下ウサギの実験において、虚血部心筋間質 5-HT 濃度は、虚血中緩やかに上昇し、再灌流直後にはさらに上昇し、その後回復した。再灌流直後の上昇は、虚血部において血小板の activation が起こって 5-HT が大量に放出されるのが原因と考えられた。SSRI の局所投与により SERT を block することで、虚血中の心筋間質 5-HT の上昇は抑制され、再灌流後の心筋間質 5-HT 濃度は著明に上昇した。SERT は虚血時の 5-HT 上昇に関与しており、再灌流後の心筋間質 5-HT 濃度の低下に重要な役割を果たしていると考えられた。MAO inhibitor の局所投与により、虚血・再灌流全体を通じて心筋間質 5-HT 濃度は上昇し、MAO は虚血・再灌流時に心筋間質 5-HT 濃度の上昇抑制に貢献していると考えられた。
- (2) 麻酔下ラットの実験において、虚血中に虚血部心筋間質 5-HT 濃度は上昇し、再灌流直後、さらに上昇し、その後回復した。一方、心筋間質 5-HIAA 濃度は、虚血中に低下したが、再灌流後、心筋間質 5-HIAA 濃度は著明に上昇し、再灌流 45 min まで高い値を維持した。SSRI の局所投与により虚血中の心筋間質 5-HT 濃度の上昇は抑制されることから、虚血中の 5-HT の上昇は、SERT の逆向き輸送によって 5-HT が放出されたことによると推察された。しかし、SSRI の局所投与では再灌流後の心筋間質 5-HIAA 濃度の上昇は抑制されず、SSRI で block されない extra-neuronal

monoamine transporter (EMT)を介して5-HTは細胞内に取り込まれ、MAOの代謝を受けることで5-HIAAの上昇が起こると推察された。

MAO inhibitorの局所投与により、虚血中の心筋間質5-HT濃度は変化しなかったが再還流後の心筋間質5-HT濃度は著明に上昇した。また、虚血中の心筋間質5-HIAA濃度は変化せず、再灌流後の5-HIAAの上昇は強く抑制された。このことから、虚血中の心筋間質5-HIAA濃度の低下は、低酸素あるいはアシドーシスによってMAO活性が低下したことにより、5-HT代謝が抑制されたためと推察された。また、再灌流後、acidosisと低酸素から回復することでMAO活性が回復し、上昇した心筋間質5-HTの代謝が活発になったことが原因と考えられ、5-HT代謝は、血流によるwash out因子とともに、再灌流後の心筋間質5-HT濃度の低下に、貢献していると考えられた。

- (3) 以上の結果から、SSRIは心虚血・再灌流時の虚血部心筋間質5-HT濃度を低下させるが、再灌流時の虚血部においてH₂O₂の産生は抑制しない。一方、MAO inhibitorは再灌流時の虚血部においてH₂O₂の産生は抑制するが、心筋間質5-HT濃度を上昇させると推察された。今後、receptorを介した直接作用とH₂O₂を介した間接作用の二つ見地から、5-HTによる心筋細胞傷害の程度を検討する必要があると考えられた。

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10件)

Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sonobe T, Kamiya A, Shishido T, Tokudome T, Hosoda H, Shirai M, Kangawa K, Sugimachi M. Centrally administered ghrelin activates cardiac vagal nerve in anesthetized rabbits. *Auton Neurosci* 162: 60-65, 2011. <doi: 10.1016/j.autneu.2011.04.001.> (査読有)

Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Mizuno M, Kamiya A, Shishido T, Inagaki M, Shirai M, Sano S, Sugimachi M. Medetomidine, an α_2 -adrenergic agonist, activates cardiac vagal nerve through modulation of baroreflex control. *Circulation Journal* 76: 152-159, 2012. <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0574> (査読有)

Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Sata Y, Shirai M, Sugimachi M. Central vagal activation by α_2 -adrenergic

stimulation is impaired in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol* 206: 72-79, 2012. <doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02439.x> (査読有)

Kakinuma Y, Akiyama T, Okazaki K, Arikawa M, Noguchi T, Sato T. A non-neuronal cardiac cholinergic system plays a protective role in myocardium salvage during ischemic insults. *PLoS. One* 7: e50761, 2012. <doi: 10.1371/journal.pone.0050761> (査読有)

Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of serotonin uptake and degradation to myocardial interstitial serotonin levels during ischemia-reperfusion in rabbits. *Acta Physiol* 207: 260-268, 2013. <doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02461.x> (査読有)

Kakinuma Y, Tsuda M, Okazaki K, Akiyama T, Arikawa M, Noguchi N, Sato T. Heart-specific overexpression of choline acetyltransferase gene protects murine heart against ischemia through hypoxia-inducible factor-1 α -related defense mechanisms. *J Am Heart Assoc* 2: e004887, 2013. <doi: 10.1161/JAHA.112.004887> (査読有)

Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shimizu S, Kawada T, Shirai M. In vivo monitoring of acetylcholine release from cardiac vagal nerve endings in anesthetized mice. *Auton Neurosci* 176: 91-94, 2013. <doi: 10.1016/j.autneu.2013.02.014.> (査読有)

Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Turner MJ, Shirai M, Sugimachi M. Sympathetic afferent stimulation inhibits central vagal activation induced by intravenous medetomidine in rats. *Acta Physiol* 209, 55-61, 2013. <doi: 10.1111/apha.12123.> (査読有)

Komaki F, Akiyama T, Yamazaki T, Kitagawa H, Nosaka S, Shirai M. Effects of intravenous magnesium infusion on *in vivo* release of acetylcholine and catecholamine in rat adrenal medulla. *Auton Neurosci* 177, 123-128, 2013. <doi: 10.1016/j.autneu.2013.03.004.> (査読有)

Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of calpain to myoglobin efflux from cardiomyocyte during ischemia and after reperfusion in anesthetized rat. *Acta Physiol* 210, 823-831, 2014. <doi: 10.1111/apha.12205.> (査読有)

[学会発表](計11件)

第89回日本生理学会大会 2012年3月29 - 31日(松本市)
「心筋間質 5-HT とモノアミンオキシダーゼによる 5-HIAA の同時モニタリング」
Simultaneous monitoring of myocardial interstitial serotonin (5-HT) and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)
杜 成坤、戦 冬雲、秋山 剛、曾野部 崇、白井 幹康

第89回日本生理学会大会 2012年3月29 - 31日(松本市)
「心虚血再灌流時の心筋間質中セロトニン動態 - 再取り込み・代謝の寄与 - 」
Contribution of reuptake and enzymatic degradation to myocardial interstitial 5-HT levels during ischemia-reperfusion
曾野部 崇、秋山 剛、杜 成坤、戦 冬雲、白井 幹康

第90回日本生理学会大会 2013年3月27 - 29日(東京都)
「マウス心臓交感神経終末におけるノルエピネフリン動態の解析」
In vivo assessment of norepinephrine kinetics at cardiac sympathetic nerve endings in the anesthetized mice
戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、曾野部 崇、白井 幹康

第90回日本生理学会大会 2013年3月27 - 29日(東京都)
「拡張型心筋症ノックインマウスに対するグレリンの治療効果」
Effects of ghrelin on survival and cardiac remodeling of dilated cardiomyopathy mice with troponin mutation
杜 成坤、戦 冬雲、森本 幸生、秋山 剛、寒川 賢治、白井 幹康

第90回日本生理学会大会 2013年3月27 - 29日(東京都)
「 α_2A アドレナリン受容体作動薬である Guanfacine は、過度の交感神経抑制なしに心臓迷走神経活動を亢進する」
 α_2A adrenergic agonist, Guanfacine, can activate cardiac vagal nerve without sympathetic over-suppression
清水 秀二、川田 徹、秋山 剛、神谷 厚範、白井 幹康、杉町 勝

第90回日本生理学会大会 2013年3月27 - 29日(東京都)
「腎血管性高血圧ラットモデルでの高血圧発症初期における動脈圧と交感神経活動の変化」
Changes in renal sympathetic nerve activity during development of renovascular-hypertension rats
吉本 光佐、秋山 剛、曾野部 崇、藤井 豊、三木 健寿、白井 幹康

第90回日本生理学会大会 2013年3月27 - 29日(東京都)

「非神経性コリン作動生システムの温故知新 - このシステムを利用した代謝制御インターベンションの可能性」

Old Knowledge but novel insight to the cardiac non-neuronal cholinergic system-The possible involvement of this system in metabolic intervention to cells-
柿沼 由彦、秋山 剛、岡崎 佳代、有川 幹彦、野口 達哉、佐藤 隆幸

第91回日本生理学会大会 2014年3月16 - 18日(鹿児島市)

「ストレス誘発性心筋症の新たな病態生理学的側面」

Another pathophysiological aspect of stress-related cardiomyopathy

柿沼 由彦、津田 正之、秋山 剛、岡崎 佳代、池谷 光江、及川 詩乃、佐藤 隆幸

第91回日本生理学会大会 2014年3月16 - 18日(鹿児島市)

「DCM ノックインマウスにおける心臓迷走神経調節機構」

Cardiac vagal control in a knock-in mouse of dilated cardiomyopathy with a troponin mutation

戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、森本 幸生、清水 秀二、川田 徹、白井 幹康

第91回日本生理学会大会 2014年3月16 - 18日(鹿児島市)

「4-HBA を用いた心筋虚血再灌流時のヒドロキシラジカル測定」

Application of 4-hydroxybenzoic acid as a trapping agent to monitor hydroxyl radical production during myocardial ischemia and reperfusion

稲垣 薫克、秋山 剛、戦 冬雲、杜 成坤、白井 幹康

第91回日本生理学会大会 2014年3月16 - 18日(鹿児島市)

「虚血/再灌流における心筋間質セロトニンの動態」

Myocardial interstitial serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) levels during ischemia-reperfusion

杜 成坤、戦 冬雲、秋山 剛、稲垣 薫克、白井 幹康

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 剛 (AKIYAMA, Tsuyoshi)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：70202554

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

曾野部 崇 (SONOBE, Takashi)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員
研究者番号：70548289

清水 秀二 (SHIMIZU, Shuji)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員
研究者番号：80443498