

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：34408
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23792395
研究課題名（和文） 軽度アルコール摂取による虚血心筋保護効果のシグナル伝達とアポトーシスの関与の解明
研究課題名（英文） Involvement of signal pathway and apoptosis of cardioprotection by regular ethanol consumption
研究代表者
金田 一弘 (KANEDA KAZUHIRO)
大阪歯科大学・歯学部・講師（非常勤）
研究者番号：90533886

### 研究成果の概要（和文）：

虚血プレコンディショニングでは NOS の刺激作用を有するブラディキニン B<sub>2</sub> 受容体の関与が明らかとなっている。エタノールプレコンディショニングにおいてブラディキニン B<sub>2</sub> 受容体の関与は報告されていない。エタノールの心筋保護効果にブラディキニンの関与をブラディキニン B<sub>2</sub> 受容体の阻害薬である HOE-140 を用いて、エタノールプレコンディショニング効果が消失するか否か、また NO の産生量を測定した。

### 研究成果の概要（英文）：

Bradykinin has been implicated in ischemic preconditioning and has been shown to induce mitochondrial reactive oxygen species generation through nitric oxide (NO). I investigated the involvement of the bradykinin B<sub>2</sub> receptor (BKB2R) and measured NO production in chronic ethanol-induced cardioprotection.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：虚血心筋・心筋保護・エタノール・シグナル伝達・アポトーシス

#### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞は癌、脳卒中とともに致死性の三大疾患のひとつであり、死亡率も高い。したがって、心筋梗塞などの虚血性心疾患を予防する方法および心筋梗塞後の残存心筋を保護する方法を究明することは死亡率の低下に貢献する。私はこれまで揮発性麻酔薬とアルコールによる虚血心筋保護のメカニズムについて研究を進めてきた。その結果、アルコールによる心筋保護作用はセボフルランによって増強され、その機序として PKC ならびにミトコンドリア K<sub>ATP</sub> チャンネルが関与していることを解明し、両者の併用による心筋保護に対する有益性を報告した (Kaneda et al. *Anesth Analg*, 106(1):9-16, 2008)。また、

IPC による虚血耐性獲得の持続時間は 2～3 日間との報告 (Marber *Circulation* 1993) があるが、私は 5%アルコール慢性摂取による心筋虚血耐性はアルコール中止後も少なくとも 7 日間持続し、そのメカニズムには endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の発現増強が関与することを報告した (Kaneda et al. *Circulation*, 118 (s) : 498, 2008)。eNOS は Bradykinin により活性化され、産生された NO はシグナル伝達として働くとの報告がある (Goto et al. *Circ Res* 1995)。アルコールによる保護効果において Bradykinin および NO の関与はわかっていない。一方、セボフルランによる IPC 効果では、私は保護効果の持続に PKC- $\alpha$ 、PKC- $\epsilon$  が関

与するが PKC- $\delta$  は関与しないこと (Okusa, Kaneda et al. Eur J Anaesthesiol 26(7):582-588, 2009), 再灌流後の PKC- $\delta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) のリン酸化が重要であること (Inamura, Kaneda et al. Anesthesiology 111:1036-1043, 2009), 効果発現にアポトーシスのシグナル伝達にかかわる 38 MAP kinase の障害が重要であること (Sugioka, Kaneda et al. Anesthesiology 2006), 抗アポトーシス作用のある Akt (protein kinase B) は再灌流後の活性化が見られず, これはイソフルランと大きく異なることを報告した (Kaneda et al. J Osaka Dent Univ 41(2):151-159, 2007). NO はアポトーシスにおいても中心的な役割を果たすことが報告されている (Feng J et al. Circulation 2005). Inamura らは揮発性麻酔薬であるセボフルランの虚血再灌流直後の投与でアポトーシスに関与する caspase 3, 9 の活性化を阻止することにより梗塞サイズを縮小できることを報告した (Inamura et al. J Anesth 2010). 慢性的に IPC 効果を惹起できる軽度~中等度のアルコール摂取による虚血心筋保護効果においては上記の Bradykinin-NOS-NO pathway およびアポトーシスの関与は明らかにされていない. 最近, 虚血再灌流後の心筋細胞残存に大きな役割を果たしていると言われる Reperfusion injury salvage kinase (RISK) cascade (Hausenloy DJ et al. Cardiovasc Res 2004) が提唱されている. この経路を構成する酵素である PI3K, MEK1/2, ERK1/2 などはアポトーシス関連タンパクであり, これらの発現が慢性アルコール摂取でどのように変化するかを明らかにしたい.

## 2. 研究の目的

アルコールは依存性や種々の循環器疾患の原因となるとされる一方, 適度の摂取は虚血性心疾患の発症を低下させるばかりでなく, 近年, 心筋梗塞後の生存率を改善することが明らかになった. アルコールは国民に広く飲用されている物質であり, その虚血心筋保護作用のメカニズムを解明することは心筋梗塞後の虚血再灌流障害を軽減する薬物の開発にもつながる. 本研究はアルコールのこの作用に着目し, 動物の心筋梗塞モデルを用いて梗塞範囲の縮小効果をもたらす細胞内シグナル伝達および心筋細胞死に関与するアポトーシスの役割を分子生物学的に解明することである.

## 3. 研究の方法

モルモットの Langendorff 灌流心で全群に 30 分間虚血 (I), 120 分間再灌流 (R) し, これを対照群 (C) とした. 5%EtOH を 8 週間摂取させ PC を誘発した群 (E), および E に

HOE-140 (100  $\mu$ M) (H), C に H を虚血前 15 分間灌流し BR の関与を検討した (E+H, C+H). 左心室圧 (LVDP), 左室拡張終期圧 (LVEDP), 冠灌流量および R 後の心筋梗塞サイズ (IS) を比較した. また, inNO-T nitric oxide sensor を用い, 冠灌流の排出液における NO 測定を虚血前, 再灌流後において連続的に測定し, 各群で比較検討した.

## 4. 研究成果

LVDP, LVEDP は E で改善し (Table1), IS 縮小効果が観察された (Fig.1). しかし, H の投与によりこの効果は消失した. NO 産生量は虚血前, 再灌流後ともに E (133.3  $\pm$  192 nM at R 30min) では C (43.9  $\pm$  6 nM at R 30min) より有意に増加した (Fig.2). これは H の投与で減少した. NO はシグナル伝達として働くことがわかっている. 以前の我々のデータから, 本実験における EtOH 心筋での NO 産生量の増加はシグナル伝達として働いたと思われる. EtPC では BRB2 を介し, NO 産生を増加させ, その保護効果を発現していると考えられる.

**Table 1. Hemodynamic Variables**

	baseline	HOE	reperfusion (min)		
			30	60	120
<b>LVDP (mmHg)</b>					
CTL	114 $\pm$ 17		40 $\pm$ 5	34 $\pm$ 7	26 $\pm$ 8
ETOH	113 $\pm$ 13		74 $\pm$ 12*	68 $\pm$ 13*	62 $\pm$ 14*
CTL+HOE	99 $\pm$ 12	97 $\pm$ 13	39 $\pm$ 12	32 $\pm$ 10	34 $\pm$ 9
ETOH+HOE	96 $\pm$ 10	101 $\pm$ 11	27 $\pm$ 9	37 $\pm$ 10	34 $\pm$ 9
CTL+L-NAME	112 $\pm$ 15		27 $\pm$ 9	21 $\pm$ 9	22 $\pm$ 7
ETOH+L-NAME	102 $\pm$ 12		34 $\pm$ 13	26 $\pm$ 12	23 $\pm$ 9
<b>LVEDP (mmHg)</b>					
CTL	10 $\pm$ 0		50 $\pm$ 10	55 $\pm$ 16	59 $\pm$ 15
ETOH	10 $\pm$ 0		16 $\pm$ 13*	16 $\pm$ 16*	17 $\pm$ 16*
CTL+HOE	10 $\pm$ 0	11 $\pm$ 5	52 $\pm$ 10	53 $\pm$ 11	52 $\pm$ 11
ETOH+HOE	10 $\pm$ 0	9 $\pm$ 1	51 $\pm$ 10	49 $\pm$ 13	48 $\pm$ 13
CTL+L-NAME	10 $\pm$ 0		49 $\pm$ 9	50 $\pm$ 9	52 $\pm$ 8
ETOH+L-NAME	10 $\pm$ 0		44 $\pm$ 11	45 $\pm$ 10	46 $\pm$ 10
<b>CF (ml/min)</b>					
CTL	28 $\pm$ 7		21 $\pm$ 4	21 $\pm$ 7	20 $\pm$ 7
ETOH	31 $\pm$ 4		21 $\pm$ 3	19 $\pm$ 4	18 $\pm$ 4
CTL+HOE	31 $\pm$ 9	29 $\pm$ 10	21 $\pm$ 7	22 $\pm$ 8	22 $\pm$ 8
ETOH+HOE	30 $\pm$ 8	31 $\pm$ 8	23 $\pm$ 8	23 $\pm$ 8	22 $\pm$ 9
CTL+L-NAME	26 $\pm$ 3		18 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2	18 $\pm$ 2
ETOH+L-NAME	32 $\pm$ 5		24 $\pm$ 7	22 $\pm$ 7	22 $\pm$ 6

mean $\pm$ SD \*p<0.05 vs.CTL

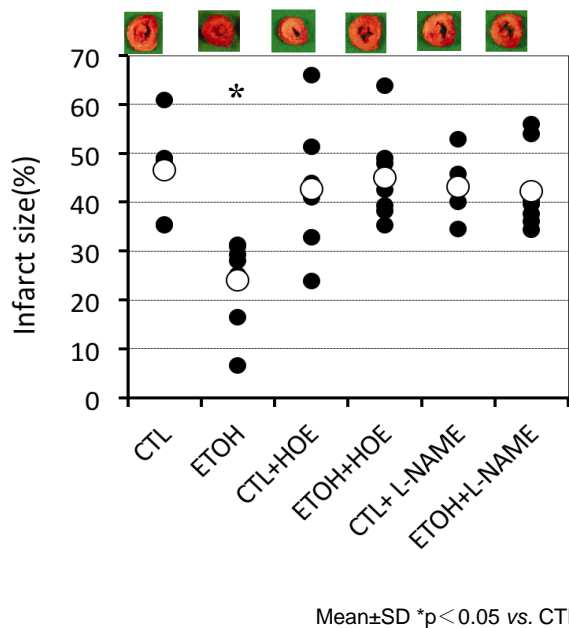


Fig.1 梗塞サイズ

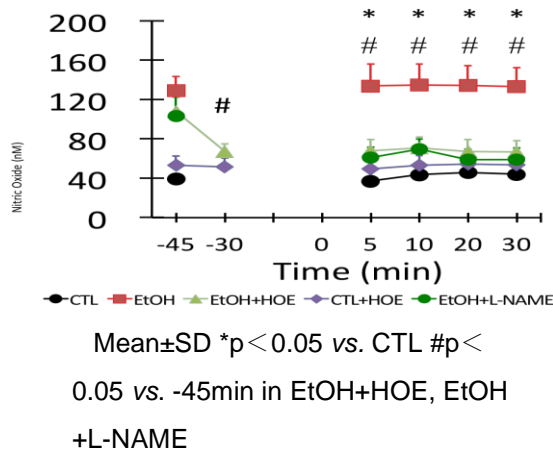


Fig.2 NO 産生量

### 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2件)

(1) Onishi A, Miyamae M, Inoue H, Kaneda K, Okusa C, Inamura Y, Shiomi M, Koshinuma S, Momota Y, Figueredo VM. Sevoflurane

confers additive cardioprotection to ethanol preconditioning associated with enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2012 in press. 査読有  
DOI : 10.1053/j. jvca. 2012. 10. 002.

(2) Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes: Comparison with cyclosporine A. Eur J Pharmacol 2012 : 657 : 40-46. 査読有  
DOI : 10.1016/j. ejphar. 2011. 11. 040.

[学会発表] (計13件)

(1) 越沼 静. 心筋虚血再灌流障害における necroptosis の関与. 第40回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2012. 10. 6. アクロス福岡 (福岡市)

(2) 稲村吉高. セボフルランポストコンディショニングの虚血心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要である. 第40回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2012. 10. 6. アクロス福岡 (福岡市)

(3) 大西杏奈. セボフルラン・エタノールによる心筋プレコンディショニングの細胞内メカニズムの解明. 第9回日本歯科麻酔学会中国・四国地方会 2012. 7. 29. 岡山大学 (岡山市)

(4) 稲村吉高. セボフルランポストコンディショニングの虚血心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要である. 日本麻酔科学会第59回学術集会 2012. 6. 8. 神戸国際会議場 (神戸市)

(5) 塩見真由美. 心筋虚血前のオートファジーの誘導は長時間虚血により消失したセボフルランプレコンディショニング効果を回復させる. 日本麻酔科学会第59回学術集会 2012. 6. 8. 神戸国際会議場 (神戸市)

(6) Yamabayashi K. Lidocaine postconditioning attenuates myocardial infarct size *in vivo* rabbits hearts: role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 ERK 1/2. 3th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation, and Pain Control 2012. 3. 2. Kona, Hawaii (USA)

(7) Momota Y. Cerebral protection effects of lidocaine using a transient cortical ischemia model. 3th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation, and Pain Control 2012.3.2. Kona, Hawaii (USA)

(8) 大西杏奈. セボフルランプレコンディショニングは cyclosporine A と同程度にミトコンドリア膜遷移透過性ポア開口を抑制し心筋保護をもたらす. 第 531 回大阪歯科学会例会 2011.12.10. 大阪歯科大学 (枚方市)

(9) Inamura Y. Sevoflurane postconditioning reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by induction of autophagy in isolated guinea pig hearts. 9<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD) from Prevention to Intervention 2011 2011.10.25. Venive (Italy)

(10) Okusa C. Dipyridamole-induced cardiac preconditioning persists for 3 days after discontinuing therapy and is mediated through Akt activation. 9<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD) from Prevention to Intervention 2011 2011.10.25. Venive (Italy)

(11) Onishi A. Sevoflurane enhances ethanol preconditioning associated with augmenting phosphorylation of GSK3 $\beta$ ; and inhibition of MPTP opening. American Society of Anesthesiology 2011 2011.10.18. Chicago, Illinois (USA)

(12) Shiomi M. Induction of autophagy restores the loss of sevoflurane preconditioning. American Society of Anesthesiology 2011 2011.10.16. Chicago, Illinois (USA)

(13) Onishi A. Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes: Comparison with cyclosporine A. The 4<sup>th</sup> Annual Meeting of Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies 2011.10.8. 神戸国際会議場 (神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金田 一弘 (KANEDA KAZUHIRO)  
大阪歯科大学・歯学部・講師 (非常勤)  
研究者番号 : 90533886