

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791600

研究課題名(和文)冠虚血危険因子による心筋コンディショニング阻害の分子機序とその制御

研究課題名(英文)The elucidation and control of mechanisms underlying inhibition of myocardial conditioning with risk factors in coronary disease

研究代表者

東島 潮(HIGASHIJIMA, Ushio)

長崎大学・大学病院(医学系)・助教

研究者番号：20380909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：強心薬(ミルリノン；MIL、レボシメンダン；LEV)による心筋保護効果について検討した。MIL、LEVの心筋虚血後投与は心筋梗塞サイズを有意に縮小させ、LEVによる保護効果は選択的シクロオキシゲナーゼ2阻害薬により抑制された。現在、ウエスタンブロッティング法を用いてシクロオキシゲナーゼ2の発現または活性化を評価するべく実験を継続している。また、MIL、LEVの心筋虚血前投与は心筋梗塞サイズを縮小させる傾向を認めたが有意差は認めなかった。また、プロポフォールはこれらの縮小傾向を抑制する傾向を認めたが有意差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of cardioprotection associated with two inotropics, milrinone(MIL, a phosphodiesterase type 3 inhibitor, and levosimendan(LEV, a calcium sensitizer. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor abolished LEV-induced cardioprotection(postconditioning). Now we try to clarify the activation of cyclooxygenase-2 protein in the cardioprotection with Western blotting. Preischemic administration of MIL or LEV have showed tendency to decrease the myocardial infarct size, but not significant. Propofol(the Group of propofol+MIL or propofol+LEV) also have showed tendency to increase the myocardial infarct size compared with the Group of MIL or LEV(preischemic administration: i.e. preconditioning), but not significant.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：強心薬 心筋梗塞サイズ縮小 ポストコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

長時間の心筋虚血に先行して短時間の虚血ストレスを負荷することにより、虚血後の心筋保護効果（心収縮力の維持、心筋梗塞サイズの縮小効果等）が得られる現象を**虚血プレコンディショニング（虚血プレコン）**といい、心筋虚血に先行して薬理的処置を行い虚血プレコンと同様の心筋保護効果が得られる現象を**薬理的プレコン**という。近年、長時間の心筋虚血後の再灌流早期に短時間の虚血と再灌流刺激を負荷することで心筋保護効果が得られる**虚血ボストコンディショニング（虚血ボスコン）**と再灌流早期に薬理的処置を行うことにより心筋保護効果を得る**薬理的ボスコン**が報告され、予期せぬ虚血に対しても応用可能なため、虚血性心疾患の合併患者の周術期管理や救急・集中治療領域においても臨床応用が期待されている。私の所属する研究室ではこれまでに、動物の生体モデルを用い、揮発性麻酔薬、オピオイド、 $\alpha 2$ アゴニスト、Rho キナーゼ阻害薬、強心薬（ミルリノン、レボシメンダン）の心筋虚血再灌流障害に対する薬理的プレ・ボスコンについて検討し、その成果はアメリカ麻酔学会で数多くの発表を行い、Cardiovasc Drugs Ther、Anesth Analg、J Anesthなどに論文が掲載された。これらの研究成果を踏まえ、今後は各種病態や治療薬による相互作用も含めた有効な薬理的プレ・ボスコン法の検討を行い、それらの薬剤のスクリーニングを行うことで臨床応用に貢献し、オーダーメイドの心筋保護法を開発することが本研究における目的である。

2. 研究の目的

心筋虚血再灌流障害の分子機序の解明が進み、虚血刺激や薬理的処置による心筋保護法に関する研究が動物実験を中心に多角的視点から多数報告されてきた。しかし糖

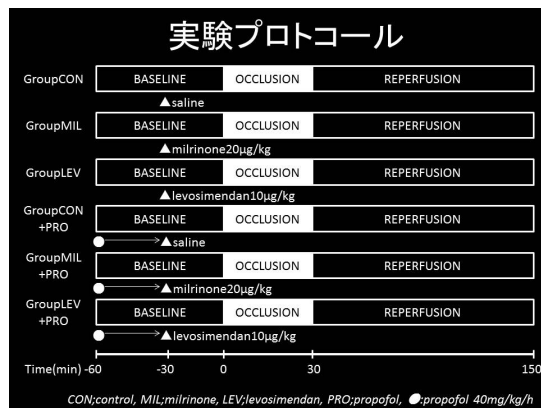
尿病、高脂血症等の虚血性心疾患のリスク因子により、多様な機序で心筋保護が阻害されることが解明されてきた。そこで本研究は、心筋保護効果が報告されている循環作動薬（ミルリノン、レボシメンダン）を中心に各病態の動物実験モデルを用いこれらの阻害因子の分子機序解明と各種病態に影響されない心筋保護法の開発についての検討を行い、虚血性心疾患患者の多様な周術期管理に有効な薬理的な心筋保護法の確立を目的として行う。ミルリノンはphosphodiesterase3 阻害薬であり、サイクリック AMP の分解酵素であるphosphodiesterase3 の分解を阻害して、細胞内へのカルシウムの流入を増加させ、強心作用を発揮する。またレボシメンダンは主にカルシウムと心筋の感受性を改善させることにより強心作用を発揮する強心薬である。いずれの薬剤も、それぞれのボスコンによる心筋保護効果については以前に学会発表を行っている。今回はさらに細胞内の分子機序について解明を進めていく。また、心筋保護の重要なメディエーターとして報告されているミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネルを抑制するプロポフォルを使用し、上記強心薬のプレコンに対する影響について検討を行う。

3. 研究の方法

1) 心筋プレコン阻害因子（プロポフォル）の分子機序とその制御

- ラットにペントバルビタール基礎麻酔後挿管の上人工呼吸管理とし、頸動静脈よりカテーテルを挿入し動脈圧連続測定を開始する。
- 左開胸の後心膜切開し肺動脈基部を露出、7-0 ナイロン糸を冠動脈前下行枝にかけ冠動脈閉塞が可能な状態とし30 分間の冠動脈閉塞、120 分間の再灌流時間を設ける。
- 虚血プレ・ボスコンまたは各種薬剤投

とによる薬理的プレ・ポストコンを行う。
プレコン：



コントロール群：30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 120 分間再灌流

ミルリノン群：冠動脈虚血 30 分前にミルリノン 20 μg/kg 投与 + 30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 120 分間再灌流

レボシメンダン群：冠動脈虚血 30 分前にレボシメンダン 10 μg/kg 投与 + 30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 120 分間再灌流

プロポフォール単独群：冠動脈虚血 1 時間前より 40 mg/kg/h でプロポフォール持続静脈内投与開始 + 30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 120 分間再灌流

プロポフォール + ミルリノン群：冠動脈虚血 1 時間前より 40 mg/kg/h でプロポフォール持続静脈内投与開始 + 冠動脈虚血 30 分前にミルリノン 20 μg/kg 投与 + 30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 120 分間再灌流

プロポフォール + レボシメンダン群：冠動脈虚血 1 時間前より 40 mg/kg/h でプロポフォール持続静脈内投与開始 + 冠動脈虚血 30 分前にレボシメンダン 10 μg/kg 投与 + 30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 120 分間再灌流

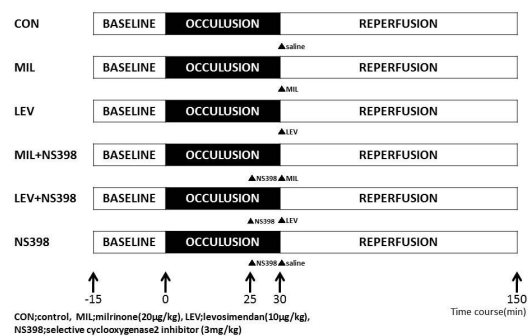
d)再灌流後に染色にて虚血危険領域を同定した状態で心臓を取り出し、トリフェニルテトラゾリウム (TTC) 染色にて梗塞

領域を同定し梗塞面積 / 虚血危険領域の面積比を求め保護効果を比較する。

2) ポストコン阻害因子 (シクロオキシゲナーゼ 2 阻害薬) の分子機序解明

同様の心筋虚血再灌流モデルを用いてウェスタンブロッティング法により分子機序を検討する。

実験プロトコル



コントロール群：：30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 120 分間再灌流

ミルリノン群：30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 再灌流直前にミルリノン 20 μg/kg 投与 + 120 分間再灌流

レボシメンダン群：30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 再灌流直前にレボシメンダン 10 μg/kg 投与 + 120 分間再灌流

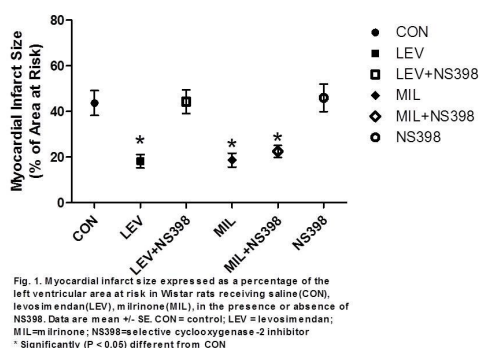
NS398 (シクロオキシゲナーゼ 2 阻害薬) 群：30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 再灌流 5 分前に NS398 投与 + 120 分間再灌流

NS398 + ミルリノン群：30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 再灌流 5 分前に NS398 投与 + 再灌流直前にミルリノン 20 μg/kg 投与 + 120 分間再灌流

NS398 + レボシメンダン群：30 分左冠動脈前下行枝虚血 + 再灌流 5 分前に NS398 投与 + 再灌流直前にレボシメンダン 10 μg/kg 投与 + 120 分間再灌流

上記実験内容に関しては、既に前回の科研費報告書作成時 (平成 24 年) に結果が出て

いる。(下図参照)



レボシメンダン、ミルリノンとはポスコン作用を認めた。レボシメンダンのポスコン作用はNS398により阻害された。

結語：レボシメンダンのポスコン作用にはシクロオキシゲナーゼ2が関与する。

今回は上記の結果を受けて、実際のシクロオキシゲナーゼの発現および活性をウエスタンブロッティングにより測定することを試みた。

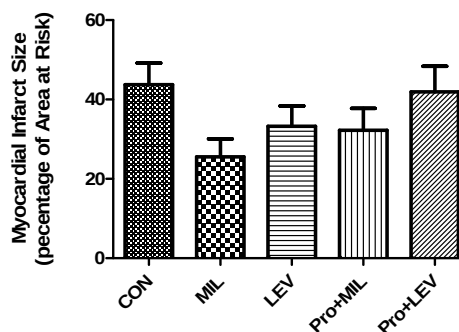
虚血終了後再灌流とした後で、心臓を取り出し速やかに冷水で灌流し染色にて虚血危険領域を同定しその組織を切り出して液体窒素で凍結する。

凍結切片はホモジナイズしたのち遠心分離にて各細胞成分に分け細胞質の蛋白濃度を測定し、抽出した蛋白試料を用いてウエスタンブロッティングシステムを用いてCOX2活性を示すバンドを得る。発光撮影装置にて画像を記録解析し各キナーゼ活性を測定する。

4. 研究成果

1) 心筋プレコン阻害因子(プロポフォル)の分子機序とその制御

Figure1. Myocardial infarct size expressed as a percentage of the left ventricular area at risk



ミルリノンおよびレボシメンダンはコントロール群と比較して心筋梗塞サイズを縮小する傾向を示したが、有意差は認めなかった。また、プロポフォル+ミルリノン群およびプロポフォル+レボシメンダン群はそれぞれミルリノン群、レボシメンダン群と比較して心筋梗塞サイズは拡大する傾向にあったが、有意差は認めなかった。

2) ポスコン阻害因子(シクロオキシゲナーゼ2阻害薬)の分子機序解明

現在心筋の傷害をより客観的に評価するため、それに適した実験系の作製に取り組んでいる。具体的には上記心筋梗塞モデルの心筋を虚血部分と非虚血部分に分け、それぞれのライセートを用いて傷害度を評価する予定である。評価は、(i)各カスパーゼ特異的蛍光基質の分解を指標にしたカスパーゼ活性測定、(ii)ウエスタンブロッティング法並びに活性測定キットを用いたCOX-11の発現量・活性測定により行う。

これまでに各種心筋サンプルの回収と液体窒素への保存を終え、現在、使用するバッファーや組織破砕の方法など心筋ライセートの作製方法について検討を行っているところである。

5．主な発表論文等

[雑誌論文]（計 0 件）

[学会発表]（計 0 件）

6．研究組織

(1)研究代表者

東島 潮 (HIGASHIJIMA Ushio)
長崎大学・大学病院（医学系）・助教

研究者番号：20380909