

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870623

研究課題名(和文) 遮断薬が及ぼす心臓手術周術期の心筋細胞内小胞体ストレス変化と遺伝子治療への応用

研究課題名(英文) The association between endoplasmic reticulum stress in myocardial cells and beta-blockers in the perioperative period of cardiac surgery

研究代表者

谷口 文香(Taniguchi, Fumika)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：40515285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究課題に基づき周術期心筋内のmiRNA発現量についてデータを収集した。平行して主成分分析・パスウェイ解析など多変量解析を用いて、細胞内情報伝達系への影響が大きいと考えられるmiRNAを探るべく検体数を増やしたものの、被験者の術前の心機能・合併症の影響など排除し得ないバイアスの存在により中々予想どおりの有意差を出せていない状況である。細胞内情報伝達系への影響がはっきりしない状況では臨床的な意義は低く、in vitroでの実験系も組みにくい状況である。今後患者の術前状況などを詳細に分類して前述のバイアスを可能な限り排除することで臨床的に意義のある結果へと昇華できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We collected data on the perioperative intra-myocardial microRNA expression level. At the same time, we accumulated patients to obtain data on microRNAs, which had marked effects on intracellular information transmission systems, and subjected the data to multivariable analysis. However, it was difficult to confirm the presence of significant differences, possibly because biases (e.g., preoperative cardiac functions and postoperative complications) were included in our results. Therefore, we are unable to conduct an in vitro study at the present time. As the next step, we will take such biases into account and re-analyze the data.

研究分野：心臓血管麻酔

キーワード：心臓血管麻酔 miRNA blocker

1. 研究開始当初の背景

急性冠症候群発症時及び心臓血管外科手術周術期において、心筋虚血再還流による心筋障害、心機能低下が起こる事が広く知られている。そして、そのメカニズムとして心筋細胞のアポトーシス(細胞死)が考えられている。(Webster KA. Trends Pharmacol Sci.2007;28:492-9. Review, Hausenloy DJ, Scorrano L. Clin Pharmacol Ther. 2007;82:370-3. Review)

細胞内のタンパク質本来の機能を獲得するには、分泌されたタンパク質が正常に折りたたまれることで高次構造を形成すること、また、異常な折りたたみ構造となったタンパク質を除去・分解する機構が必要である。これらの作業はともに小胞体内で行われ、そこにはタンパク質の恒常性を維持するための調節機構(細胞内情報伝達経路)が存在する。異常な折りたたみ構造のタンパク質が小胞体内に蓄積することを小胞体ストレス(ER stress)と呼び、タンパク質の恒常性を維持する調節機構は小胞体ストレスに対する細胞の生理応答と考えられる。この調節機構の活性化は、小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response: UPR)と呼ばれ小胞体内の異常な折りたたみ構造の(及び、折りたたまれていない)タンパク質の量に比例する。UPRは正確な量の分泌タンパク質の生成に必須であり、さらに細胞内外のタンパク質の恒常性を維持する点でも重要な働きを担っている。したがって、細胞が小胞体ストレスに暴露された場合においても、UPRの機転によって、細胞は小胞体ストレスによる障害を回避することができる。しかし、UPRが適応できない程度の過大な大きな侵襲に暴露され

た場合、不可逆的な過程である細胞死に至る。

周術期 β -blocker や吸入麻酔薬による心筋保護効果は周知の事実であるが(London MJ. β -blockers and alpha2 agonists for cardioprotection. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2008;22:95-110. Review)、心筋細胞の小胞体ストレスとアポトーシスの相互作用の観点で解明した報告はない。我々は、On-pump CABG と Off-pump CABG の症例に対し後ろ向き調査し、経口 β -blocker 内服群と非内服群(n=640)において、周術期のCK-MB値が経口 β -blocker 内服群で有意に低いことを明らかにし、学会報告を行った。

2. 研究の目的

虚血再灌流に伴う心筋細胞の小胞体ストレスを、薬剤・または遺伝子ノックダウンにより軽減し、心臓手術周術期の心機能低下に対する将来の創薬、遺伝子治療の可能性を臨床研究及び細胞培養実験により模索する。

3. 研究の方法

(in vivo系)

予定のOn-pump CABG, Off-pump CABG 及び手術患者より採血(手術前、冠動脈再建終了直後、2時間後、8時間後、24時間後)及び右心耳の一部(冠動脈再建前後の2回)の外科的採取を行い、 β -blocker 内服群、非内服群で以下の項目の周術期変化を比較検討する。

心筋細胞を用いた PCR アレイ及び、定量的 PCR による mRNA 発現変化の測定

- RNA の単離: ホモゲナイザーを用いて組織破碎後、RNA Isolation Kit 等の使用
- 逆転写酵素反応: RNA より cDNA への変

換

c. PCR アレイを用いて、小胞体ストレス、細胞死に関連する細胞内情報伝達物質において β -blocker 内服群、非内服群間で有意差のある物質にふるいをかける。

d. 有意差のあった細胞内伝達物質に関して、定量的 PCR 法により mRNA レベルでの発現を詳細に定量検討する。

タンパク質発現変化の測定：PCR アレイにより、 β -blocker 内服群・非内服群で有意差のあった細胞内伝達物質に関して、Western Blotting 法または、Medimachine (組織から細胞分離する装置：現有装置である) を用いて心筋細胞を単離後、Flow Cytometry 法によりタンパク質発現の評価を行う。

(in vitro 系)

ラット心筋細胞培養による虚血再灌流後心筋細胞障害の評価 (ラット幼若心筋細胞の単離) を過去の文献 (Sadoshima J, et al. JBC; 10551-60, 1992) に基づき行う。

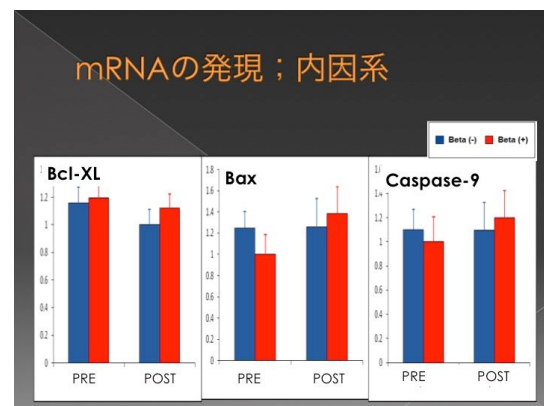
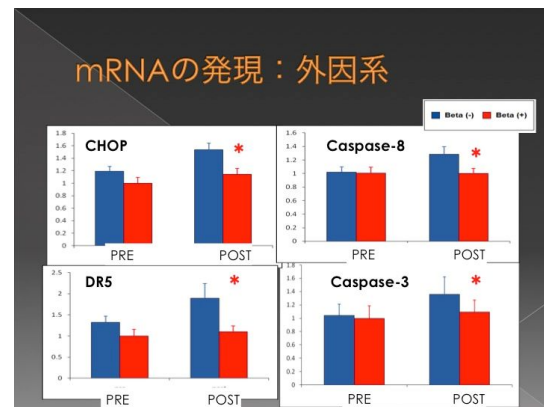
Anaeropack (三菱ガス化学) を用いて、1%O₂, 5%CO₂/95%N₂ 環境下に、6-12 時間心筋細胞を培養後、95%Air/5%CO₂ インキュベーターで 6 時間培養することで心筋虚血再灌流モデルを in vitro で模擬実験する。

4. 研究成果

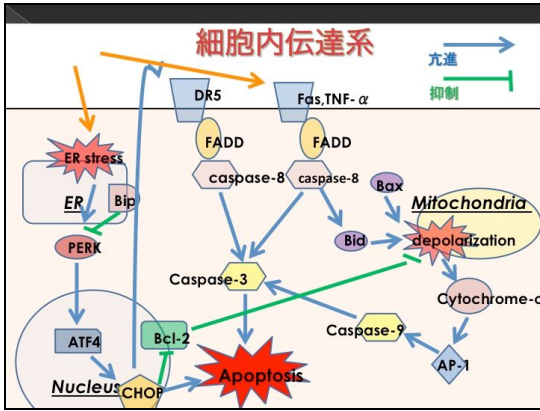
前述のとおり、in vivo 系での実験を行い、外科的に採取した右心耳の一部から、ターゲットとなっている可能性のある mRNA を同定することができた。次図に結果を示す。外因系における mRNA の発現量について 2 群を比

較し、4 つの mRNA で術後の上昇が抑えられていることが判明している。(*P < 0.05)

これに対し、内因系では、2 群間に有意差をもった変化は認められなかった。これらの過程は容易ではなく、かなりの研究時間を費やした。



次図の細胞内伝達系と照らし合わせて考えると、内服群では CHOP DR5 Caspase-8 Caspase-3 という一連の流れが抑制をうけており、アポトーシスが結果的に抑制されている可能性があり、現在、検討中である。



Flow Cytometry 法を用いた評価などは採取可能な検体サイズなどの制約により難渋しており想定通りには進められていないのが現状である。

In vitro 系におけるラットを使用した実験についても、実験系の確立に難渋しているものの、今後手技の向上とともに継続して結果を出してゆく予定である。

以上よりこれまでの研究期間では in vitro 系にて β -blocker が CHOP に始まるカスケードに作用して心筋のアポトーシスを抑制していることを明らかにできたが、それを Flow Cytometry や in vivo 系の実験を通して実証してゆく過程を引き続き粘り強く検証してゆく所存である。

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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

該当なし

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]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 文香 (Taniguchi Fumika)

京都府立医科大学 医学部付属病院 専攻医

研究者番号: 40515285