

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11909

研究課題名(和文)mTORを介した心筋保護作用—虚血再灌流障害に対する新しい治療法の提案—

研究課題名(英文)Myocardial protection via mTOR - Proposal of novel therapy for ischemia-reperfusion injury

研究代表者

北畑 洋(KITAHATA, Hiroshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：60161486

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):遊離心室筋細胞およびマウス虚血再還流モデルを用いて、アミノ酸であるロイシンの心筋保護作用の作用機序を検討した。

ロイシンの心筋保護作用にタンパク合成系であるmammalian target of rapamycin (mTOR) -S6Kinase経路が関与することが明らかになった。この心筋保護作用は、インスリンシグナル系(PI3Kinase-Akt経路)とは別経路での作用機序を有し、糖尿病モデルマウスでも有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は非糖尿病患者に比べて虚血性心疾患の発症率が高いことが知られている。一方、短時間の虚血再灌流がその後の長時間の虚血に対する心筋梗塞サイズを減少させる現象、プレコンディショニング作用や吸入麻酔薬、オピオイドの投与による心筋保護作用のメカニズムは、インスリンシグナルと多くを共有しているため、高血糖モデルでは心筋保護効果が減弱してしまう。ロイシンによる心筋保護作用が、これらと異なるmTORを介した作用機序であり、糖尿病モデルでも有効であることが明らかになった。この結果は、糖尿病患者における心筋虚血予防の新しい治療法の確立および治療薬の開発の観点からも非常に重要であると思われる。

研究成果の概要(英文):Using isolated ventricular myocytes and ischemia-reperfusion in-vivo model of mouse, we investigated the mechanism of leucine's myocardial protection.

It was revealed that the myocardial protection of leucine is involved in the mammalian target of rapamycin (mTOR) -S6 Kinase pathway. This myocardial protection has a mechanism different from that of the insulin signal system and was also effective in diabetic model mice.

研究分野：周術期循環管理

キーワード：心筋保護 虚血再還流 mTOR rapamycin ロイシン プレコンディショニング 糖尿病モデル

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化の急速な進行および食生活の変化にともなう生活習慣病の増加は、本邦における心血管疾患患者を急増させている。虚血性心疾患やリスクを有する患者の心合併症発生予防とその治療は患者予後を左右する重要な因子となる。プレコンディショニング作用による心筋保護作用とは、短時間の虚血再灌流がその後の長時間の虚血に対する心筋梗塞サイズを減少させる現象である (Murry et al. *Circulation* 74: 1124-36, 1986)。この現象は他のどの治療薬よりも有効的な手段であり、30 年を経た現在においてもその重要性が研究されている。現在までに、申請者らも吸入麻酔薬やオピオイドなどの先行投与によって同様の心筋保護作用を示すこと、この作用がカベオリンを介した作用であることを多く報告してきた (*Anesth Analg* 111: 1117-21, 2010, *Anesthesiology* 115: 955-62, 2011, *J Anesth* 28: 733-9, 2014)。

これら心筋保護作用のメカニズムの全容はいまだ明らかにされていないが、高血糖によってこの作用が抑制されることが知られている。心筋保護のメカニズムとして、インスリンシグナルである経路 (PI3Kinase-Akt 経路) やタンパク合成系である経路 (mammalian target of rapamycin -S6Kinase 経路) などの関与がこれまでに報告されている。このようにインスリンシグナルと心筋保護のメカニズムは多くを共有しているため、高血糖モデルでは心筋保護効果が認められず、実際の臨床現場でも糖尿病罹患者は非罹患者に比べて 2 倍以上心疾患の発症率が高いことが知られている。

## 2. 研究の目的

本研究では、アミノ酸、特にロイシンに応答する mammalian target of rapamycin (mTOR) に注目し、ロイシンの心筋保護経路に mTOR がどのように影響するかを検討する。

また、一般的に心筋保護作用が抑制される高血糖状態においても、ロイシンの心筋保護作用は、シグナル経路の違いからその効果が期待できると考え、それらの作用機序について明らかにする。さらに、心筋保護作用のエンドエフェクターとして考えられているミトコンドリアダイナミクスにロイシンが与える影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(実験 1) in vitro 遊離単一心筋細胞を用い、低酸素モデルにて心筋細胞死亡率がロイシン刺激により低下することを明らかにする。イムノプロット等を用いてこれらのシグナルメカニズムについて明らかにする。

(実験 2) 低酸素時にミトコンドリアダイナミクスを含むミトコンドリア機能についてロイシンが与える影響について調べる。特に、ミトコンドリア融合に関与する Opa-1 の影響を明らかにするため、Opa-1 をノックダウンした細胞を用いて上記実験を行う。

(実験 3) マウスの in vivo 虚血再灌流モデルを用いて対照群、ロイシン群において心筋梗塞サイズを測定比較する。また、mTOR ノックアウトマウスを用いたモデルにてロイシンの影響を明らかにする。さらに同様の実験を糖尿病モデルマウスにて行う。

## 4. 研究成果

(1) 摘出心をランゲンドルフ酵素法にて灌流し、得られた遊離心室筋細胞をディッシュに接着させた。通常培養液を「グルコースなし」のものに置き換え、特殊チャンバーを用い、1 時間低酸素状況 (95%N<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>) に曝露することで心室筋細胞に虚血状態をつくりだした。その後 1 時間通常の培養状態に戻すことで再灌流状態とした。続いて細胞をトリパンブルー染色することで死亡細胞と正常細胞を区別し、生存率を割り出した。ロイシン 40mM であらかじめ 2 時間刺激を与えたロイシン群では、心筋細胞保護効果が認められた。mTOR inhibitor である rapamycin, PI3K inhibitor である wortmannin を用いて同様の実験を行うと、rapamycin では心筋保護作用が棄却されたが、wortmannin を加えてもロイシンの心筋保護作用は有意に変化することはなかった。これらのことより、ロイシンの心筋保護作用に mTOR の経路が影響していることが示唆された。

次に、ロイシン刺激の細胞に対しイムノプロットを用いてシグナル経路の活性化を調べた結果、ロイシンはインスリン受容体シグナルの下流シグナルには影響を与えることはなかったが、mTOR や S6K などのシグナル活性を誘発することが明らかとなった。

(2) ミトコンドリア融合に関与する Opa-1 の影響を明らかにするため、Opa-1 siRNA を電気穿孔法にて細胞に注入、トランスフェクションさせた細胞を用い、ロイシンの心筋保護作用がどのように変化するかを検討した。その結果、Opa-1 をノックダウンさせることでロイシンの心筋保護作用が棄却されることが明らかとなった。

(3) マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定しながら、心臓冠動脈を 30 分間閉塞し、2 時間の再灌流を行った (コントロール群)。再び冠動脈を閉塞、Evans Blue を注入し心臓を摘出した。心臓をスライスし、再染色後心筋梗塞サイズを測定した。ロイシン群は、虚血再灌流前にロイシン (200 mg/kg i.v.) によるプレコンディショニングを行った。これらの結果、ロイシン群はコントロール群に比較して、心筋梗塞サイズを有意に減少し心筋保護作用を認められた。この心筋保護作用は mTOR inhibitor である rapamycin を前投与することで棄却された。

また、同様の実験を mTOR ノックアウトマウスを用いて行うと、ロイシン群の心筋保護作用が

棄却されたことから、ロイシンの mTOR を介するシグナルへの影響が明らかとなった。さらに、糖尿病モデルマウス (HFD-obese マウス) を用いて虚血再灌流実験を行った。インスリンシグナル系の心筋保護作用が棄却されているこのモデルにおいてもロイシン群の心筋保護作用が保持されたことから、ロイシンの心筋保護作用はインスリンシグナル系とは別経路での作用機序を有することが明らかとなった (図 1)。

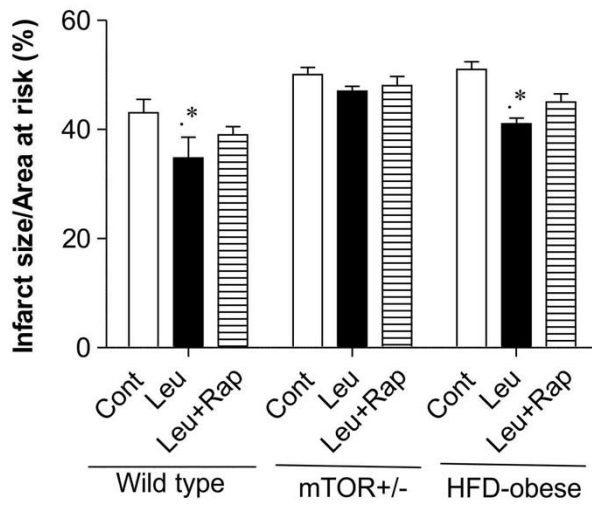


図 1

Cont: control group

Leu: leucine group

Leu+Rap: leucine + rapamycin group

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Satomi Shiho, Morio Atsushi, Miyoshi Hirotsugu, Nakamura Ryuji, Tsutsumi Rie, Sakaue Hiroshi, Yasuda Toshimichi, Saeki Noboru, Tsutsumi Yasuo M.	4. 巻 245
2. 論文標題 Branched-chain amino acids-induced cardiac protection against ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2020.117368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takaishi Kazumi, Kitahata Hiroshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Electrons released from both flavins of NADPH-P450 reductase contribute to the reductive mobilization of iron from ferritin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 230 ~ 232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.66.230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kakuta N, Kawahito S, Mita N, Soga T, Yagi S, Satomi S, Tada F, Kinoshita H, Takaishi K, Kitahata H	4. 巻 25
2. 論文標題 Continuous blood glucose monitoring during pediatric cardiopulmonary bypass.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Pediatric Anesthesia	6. 最初と最後の頁 3~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawahito S, Mita N, Soga T, Yagi S, Kakuta N, Satomi S, Kinoshita H, Takaishi K, Kitagawa T, Kitahata H	4. 巻 22
2. 論文標題 Accuracy and reliability of continuous blood glucose monitoring during pediatric cardiopulmonary bypass.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 353 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10047-019-01111-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mita Naoji, Kawahito Shinji, Soga Tomohiro, Takaishi Kazumi, Kitahata Hiroshi, Matsuhisa Munehide, Shimada Mitsuo, Kinoshita Hiroyuki, Tsutsumi Yasuo M., Tanaka Katsuya	4. 巻 20
2. 論文標題 Strict blood glucose control by an artificial endocrine pancreas during hepatectomy may prevent postoperative acute kidney injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Artif Organs	6. 最初と最後の頁 76 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-016-0925-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Hiroyuki, Akahori Takahiko, Nakamura Emi, Okawa Hazuki, Kawahito Shinji, Kitahata Hiroshi, Fujiwara Yoshihiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Tissue oxygenation index reflects changes in forearm blood flow after brief ischemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 228 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.64.228	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsutsumi Yasuo M., Oyama Takuro, Kakuta Nami, Horikawa Yousuke T., Kume Katsuyoshi, Sakai Yoko, Tsutsumi Rie, Tanaka Katsuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Effect of oral carbohydrate with amino acid solution on serum oxidative/anti-oxidative status in healthy volunteers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Anesth	6. 最初と最後の頁 472 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00540-017-2355-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 15件)

1. 発表者名 Mita N, Kawahito S, Soga T, Yagi H, Takaishi K, Kitahata H
2. 発表標題 Can strict blood glucose control by an artificial pancreas during hepatectomy improve patient outcomes?
3. 学会等名 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaishi K, Aoyama T, Fujiwara S, Otsuka R, Eguchi S, Tsutsumi Y, Kawahito S, Kinoshita H, Kitahata H
2. 発表標題 Pleth Variability Index Predicts Hemodynamic Derangements In Patients Undergoing Oral Surgery.
3. 学会等名 The Anesthesiology 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazumi Takaishi, Shiho Satomi, Naoji Mita, Takeshi Yamamoto, Ryo Otsuka, Satoru Eguchi, Shigeki Joseph Luke Fujiwara, Shinji Kawahito, Hiroyuki Kinoshita, Hiroshi Kitahata
2. 発表標題 Rapamycin becomes the sevoflurane vasodilator effect apparent in the rat artery.
3. 学会等名 The 15th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation and Pain Control (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satomi S, Takaishi K, Kawahito S, Kitahata H, Tanaka K, Kinoshita H
2. 発表標題 The role of F-actin constitution in oxidative stress caused by high glucose in the human artery.
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists Annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuro Oyama, Yuta Uemura, Nami Kakuta, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuya Tanaka
2. 発表標題 Glucose transporter-4 mediates acute isoflurane-induced preconditioning in vivo rabbits.
3. 学会等名 The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shiho Satomi, Kazumi Takaishi, Shinji Kawahito, Hiroshi Kitahata, Katsuya Tanaka, Hiroyuki Kinoshita
2. 発表標題 Roles of clinical sevoflurane doses as both the protein kinase C activator and NADPH oxidase inhibitor upon thromboxane A2 application in the rat Arteries.
3. 学会等名 The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuro Oyama, Nami Kakuta, Asuka Kasai, Naoji Mita, Katsuyoshi Kume, Katsuya Tanaka, and Yasuo M. Tsutsumi
2. 発表標題 Effect of jelly type carbohydrate on metabolism and evaluation of its excretion in healthy subjects.
3. 学会等名 The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高石 和美  (TAKAISHI Kazumi)  (20325286)	徳島大学・病院・講師   (16101)	
研究分担者	川人 伸次  (KAWAHITO Shinji)  (60284296)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任教授   (16101)	
研究分担者	堤 保夫  (TSUTSUMI Yasuo)  (90523499)	広島大学・大学院医系科学研究科・教授   (15401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	藤原 茂樹  (FUJIWARA Shigeki)  (90434505)	徳島大学・病院・助教     (16101)	