

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791079

研究課題名（和文） 心筋の虚血再灌流障害における Rho キナーゼの役割解明と制御

研究課題名（英文） Administration of the Rho-kinase inhibitor Fasudil before ischemia or just after reperfusion, but not 30 min after reperfusion, protects the stunned myocardium in swine.

研究代表者

柴田 伊津子 (SHIBATA ITSUKO)

長崎大学・病院・助教

研究者番号：10404245

研究成果の概要（和文）：

Rho-kinase 阻害薬ファスジルが虚血再灌流障害の一つである心筋スタニングに対する心筋保護効果について検討した。ファスジルの虚血前投与、及び虚血再灌流直後の投与は心筋スタニングからの回復を改善したが虚血再灌流 30 分後からの投与では改善しなかった。ファスジルは心筋スタニングに対して保護作用があり、その保護作用は心筋への直接作用ではなく、薬理的プレもしくはポストコンディショニング効果であることが証明された。

研究成果の概要（英文）：

We assessed the effect of administration time for fasudil treatment of the stunned myocardium in 40 anesthetized open chest swine. Administration of the Rho-kinase inhibitor fasudil before ischemia or just after reperfusion, but not 30 min after reperfusion, protects the stunned myocardium in anesthetized open-chest swine. This cardioprotective effect of fasudil against myocardial stunning was probably not related to systemic or coronary hemodynamic changes. Rho-kinase inhibition during early reperfusion could therefore protect against myocardial stunning.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：心筋虚血再灌流障害、心筋スタニング、Rho-kinase 阻害薬、薬理的プレコンディショニング、ポストコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

心筋虚血は周術期合併症の重大な危険因子である。短時間虚血に暴露することにより、

その後の虚血心筋障害が抑制される現象を虚血プレコンディショニング (ischemic preconditioning; IPC) といい、発生機序とし

ては、protein kinase C (PKC) や ATP 感受性カリウム (KATP) チャネルの関与が強く示唆されている。プロテインキナーゼ C (PKC) を介する経路とは独立して、プロテインキナーゼ A (PKA) を介する経路の存在が明らかになってきた。更に reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway における PI3K-Akt の活性化が保護作用に関与することが報告されている。また薬理的処置を行うことにより生じる薬理的プレコンディショニング効果 (pharmacological preconditioning) についても多くの研究がなされているが、心筋における薬理的プレコンディショニング効果と RISK pathway の関与についての研究はまだ少ない。更に最近では薬理的ポストコンディショニング効果 (pharmacological postconditioning) に関する研究も進められている。プレコンディショニングが予定冠動脈バイパス術 (CABG) や予定冠動脈形成術 (PCI) などの限られた状況でしか使用できないのに対し、ポストコンディショニングは虚血が起こってから使用できるため、臨床的に非常に有用である。PKA の活性化により Rho キナーゼが抑制され心筋保護効果を惹起することが報告されている。また虚血前投与における Rho キナーゼ阻害薬の心筋梗塞サイズ縮小効果や再灌流性不整脈の抑制効果も、動物実験において報告されているが心筋虚血再灌流障害のひとつである心筋スタニングに対する保護効果はまだ明らかではない。薬理的ポストコンディショニングにおける Rho キナーゼの役割を解明し、RISK pathway が関与しているかどうかを解明し、Rho キナーゼを制御することにより心筋保護において重要な役割を担っている RISK pathway を活性化し心筋保護効果を得ることが可能となれば、周術期の虚血に対する安全な治療法の選択肢が広がる。

2. 研究の目的

心筋虚血に対する薬理的ポストコンディショニングにおける Rho キナーゼの役割を解明し、RISK pathway の関与を解明する。Rho キナーゼを制御することにより心筋保護において重要な役割を担っている RISK pathway を活性化し心筋保護効果を得ることが可能となれば、周術期の虚血に対する安全な治療法の選択肢が広がる。今回使用する Rho キナーゼ阻害薬である fasudil は、くも膜下出血後の脳血管攣縮に伴う脳虚血症状の改善を目的として日本国内で臨床使用されている薬剤であり、最近では冠血管攣縮に対する効果も臨床および動物実験において報告されている薬剤である

3. 研究の方法

(1) 豚の心筋虚血再灌流モデル

- ①. 豚をケタミンの筋肉注射で鎮静し、耳の皮静脈より末梢ルートを確認する。
- ②. 豚をアルファクロラロース、フェンタニルで基礎麻酔後、気管切開を行い、人工呼吸器を装着し、臭化ベクロニウムを投与し筋弛緩を得る。同じ皮切部より、右内頸静脈に中心静脈ラインを確認、右頸動脈に動脈カテーテルを挿入し観血的血圧をモニターする。
- ③. 胸骨を切開し、心臓を露出し、上行大動脈に心拍出量測定用超音波血流プローブ、心尖部より左心室腔内へ左室圧 (LVP) 測定用トランスドューサーカテーテルを留置する。
- ④. 左頸動脈と左冠動脈前下行枝 (LAD) を露出し、ヘパリン化の後に、冠灌流圧 (CPP) 測定用ポートと冠血流量 (CBF) 測定用超音波血流計付き回路を用いて、頸動脈-LAD バイパスを作製する。LAD 灌流領域に局所心筋短縮率 (%SS) 測定用の一対の超音波クリスタルを植え込む。
- ⑤. 虚血再灌流: 頸動脈-LAD バイパス回路を遮断し、LAD 灌流領域を 12 分間虚血にした後に 90 分間再灌流を行う。
- ⑥. 血行動態: 心拍数、心拍出量、左室圧、左室内圧上昇速度、冠灌流圧、冠血流量。
心収縮力: 局所心筋短縮率。

上記項目について、baseline、30 分間の投薬後、投薬 15 分後 (LAD バイパス回路を遮断直前)、虚血再灌流直前、虚血再灌流 5、30、60、90 分後に測定する。再灌流性不整脈: 再灌流後の心室頻拍、心室細動の出現率。以上の項目を各群間で比較検討する。

(2) Rho キナーゼ阻害薬 fasudil による薬理的プレ及びポストコンディショニング効果

- ①. Rho-kinase 阻害薬 Fasudil を虚血前または虚血後に投与し、各血行動態、再灌流後の心収縮力の回復率、再灌流性不整脈の出現率をコントロール群と比較検討する。
- ②. 虚血再灌流後の LAD 灌流領域の心筋を摘出し、細胞からライシスバッファーを用いて蛋白を抽出し、Akt 活性をウエスタンブロット法により確認する。

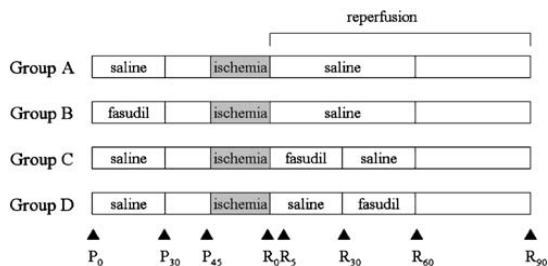
(3) Rho キナーゼ阻害薬 fasudil による薬理的プレ及びポストコンディショニング効果の機序の解明

- ①. Rho キナーゼ阻害薬 fasudil を虚血再灌流 30 分後に投与し、コントロール群および虚血後投与群と比較し、fasudil の直接作用であるか何らかの pathway を介する効果であるのか確認する。
- ②. Rho キナーゼ阻害薬 fasudil の虚血前、虚血後及び虚血再灌流 30 分後投与各群において、それぞれ投与前に PI3K 拮抗薬あるいは KATP チャネル拮抗薬を投与し、心収縮率の回復率、再灌流性不整脈の出現率に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

(1) プロトコール

40 匹のブタをコントロール群 (A 群、虚血前にファスジルを $13 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で 30 分間を静脈から投与し 15 分後冠動脈をクランプした群 (B 群)。再灌流直後より、B 群と同量のファスジルを投与した群 (C 群)、再灌流 30 分後から 30 分間、同量のファスジルを投与した群 (D 群) にランダムに分けた。各ポイントで血行動態と心収縮力の計測をおこない比較検討した。ベースラインの P_0 、ファスジルもしくは生理食塩水投与後の P_{30} 、虚血直前の P_{45} 、再灌流直前の R_0 、再灌流 5, 30, 60, 90 分後を $R_5, R_{30}, R_{60}, R_{90}$ の 8 ポイントで計測した。



(2) 統計

群間・群内比較には分散分析と Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc test を行い、VF と VT の発生率に関しては χ^2 検定を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(3) VT/VF の発生率

4 群間で再灌流 10 分以内の心室細動および心室頻拍の発生率とリドカインの使用量には有意差を認めなかった。

| | Group A | Group B | Group C | Group D |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Total Number | 11 | 10 | 10 | 9 |
| Exclusions (Intractable VT/VF) | 3 | 2 | 2 | 1 |
| Lidocaine (mg/kg) | 2.4 ± 0.8 | 2.3 ± 0.1 | 2.0 ± 0.2 | 2.2 ± 0.9 |

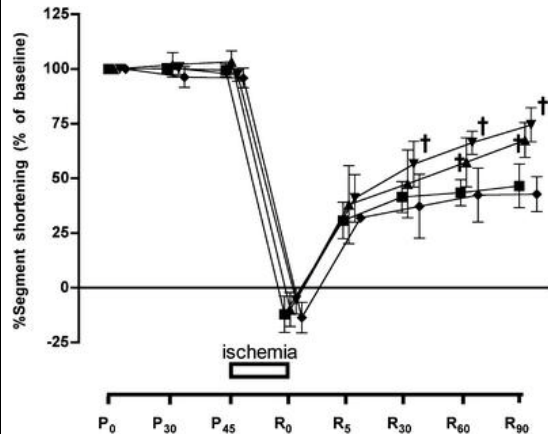
Values are mean \pm SD.

(4) 血行動態

心拍数、平均動脈圧、左室拡張終期圧 (LVEDP)、最大左室内圧上昇速度 (LVdp/dt) は、A 群との間に有意差を認めなかった。

(5) 局所心筋短縮率 (%SS)

$\%SS = (\text{拡張末期心筋長} - \text{収縮期末期心筋長}) / \text{拡張末期心筋長}$ で求めた。 P_0 を 100% として各ポイントでの %SS の改善率を比較した。 R_{30}, R_{60}, R_9 の %SS の改善率は A 群で $42 \pm 7\%$ 、 $44 \pm 6\%$ 、 $47 \pm 10\%$ 。これに対し、B 群では、 R_{60}, R_9 が $57 \pm 11\%$ 、 $68 \pm 8\%$ 、C 群では R_{30}, R_{60}, R_9 が $57 \pm 10\%$ 、 $66 \pm 5\%$ 、 $75 \pm 8\%$ と有意の改善を認めた。一方 D 群ではどの測定ポイントでも A 群と有意差を認めなかった。



<図> 局所心筋短縮率 (%SS)。

Values are expressed as mean \pm SD.

† $p < 0.05$ vs group A.

Group A (■)、group B (▲)、group C (▼)、and diamond group D (◆)。

(6) ファスジルは心筋スタニングに対して保護作用があるこれは体循環や冠循環によるものではなく、また心筋への直接作用ではないことが証明された。ファスジルは心筋スタニングに対して薬理的プレコンディショニング効果もしくは薬理的ポストコンディショニング効果を有することが示唆された。

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 1 件)

(1) Itsuko Shibata, Osamu Yoshitomi, Tadasuke Use, Hiroyuki Ureshino, Sungsam Cho, Takuji Maekawa, Tetsuya Hara, Koji Sumikawa. Administration of the Rho-kinase inhibitor Fasudil before ischemia or just after reperfusion, but not 30 min after reperfusion, protects the stunned myocardium in swine. Cardiovascular drugs and therapy. 査読有 22. 2008, 293-298

[学会発表] (計 2 件)

(1) 柴田伊津子、ホスホジエステラーゼ III 阻害薬ミルリノンの投与時間がブタのスタン心筋の回復に与える影響、日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2009 年 8 月 16-18 日、神戸市

(2) Itsuko Shibata, Milrinone Administered just after but not 20 min after reperfusion protects against myocardial stunning in swine. 16th Asean Congress of

Anaesthesiologists, July 2-5, 2009, Kota
Kinabalu (Malaysia)

〔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〕

長崎大学各術研究成果リポジトリ

<http://hdl.handle.net/10069/22594>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 伊津子 (SHIBATA ITSUKO)

長崎大学・病院・助教

研究者番号 : 10404245

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :