

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791452

研究課題名（和文）：強心薬による薬理的ポストコンディショニング法の開発と分子機序の解明

研究課題名（英文）：Development of the pharmacological post conditioning via positive inotropics and elucidation of the intracellular mechanism

研究代表者

東島 潮（HIGASHIJIMA USHIO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20380909

研究成果の概要（和文）：

ラットの心筋虚血モデルを用いて、異なる機序で強心作用を発揮するミルリノンとレボシメンダンの心筋保護効果およびその細胞内メカニズムについて検討を行った。ミルリノン、レボシメンダン共に、心筋虚血後の心筋梗塞サイズを有意に縮小させた。またその細胞内メカニズムとして phosphatidylinositol-3-kinase、nitric oxide が共通する分子機序として、また protein kinase C、cyclooxygenase 2、mitochondrial ATP sensitive potassium channel がレボシメンダンの心筋保護効果において重要であった。

研究成果の概要（英文）：

The present study was carried out to determine whether two inotropics (milrinone and levosimendan), which have positive inotropic effects despite different mechanisms, exert cardioprotective effects and to elucidate their intracellular mechanisms. Both milrinone and levosimendan significantly decreased the myocardial infarct size after ischemic stimulus significantly. Phosphatidylinositol-3-kinase and nitric oxide were common mediators for the cardioprotection of these drugs. Protein kinase C, cyclooxygenase 2, and mitochondrial ATP sensitive potassium channels played crucial roles in levosimendan-induced cardioprotection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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：周術期管理学

1. 研究開始当初の背景

心筋虚血再灌流障害に対するプレコンディショニング作用やポストコンディショニン

グ作用は有効な心筋保護手段として臨床応用が期待されており、動物実験を中心に種々の研究、報告が行われてきた。プレコンディ

シヨニングは ischemic preconditioning (IPC)、anesthetic preconditioning (APC)、pharmacological preconditioning (PPC) に大別される。急性冠症候群の患者に対する経皮的冠動脈形成術 (PTCA) におけるバルーン中の冠動脈閉塞は in vivo における IPC の代表的な刺激であり、これにより治療中に患者が感じる胸痛が軽減したり、心電図変化や心筋逸脱酵素が低下する。また、冠動脈バイパス手術における人工心肺導入前の上行大動脈遮断なども IPC 刺激と言える。揮発性麻酔薬は プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化 と ミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネルの開口 により、心筋スタニングと心筋梗塞サイズの減少作用が生じることが知られている (APC)。また PTCA 前の ニトログリセリン や 硝酸イソソルビド 等の nitric oxide (NO) の投与や、NO と ミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネル開口作用 を併せ持つ ニコランジル の投与により、心筋梗塞巣の縮小効果や心機能の改善、心室性不整脈の抑制効果が得られている (PPC)。phosphodiesterase (PDE) III 阻害薬 も PPC を認めるが、その分子機序として IPC や APC の重要なメディエーターである PKC を介する経路とは独立した cAMP-プロテインキナーゼ A (PKA) を活性化 することでその下流にある p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) の活性化 と Rhoキナーゼの活性化抑制 により 心筋梗塞サイズの減少作用 を発揮する。これに対し、PDE III 阻害薬 よりも心機能保護効果があり、心筋酸素需要量の増加を抑制しつつ強心作用を発揮する薬剤として Ca sensitizer が注目されている。カテコラミンや PDE III 阻害薬 の細胞内 Ca 流入増加による強心作用とは異なり、心筋繊維の Ca 感受性を増大させる ことにより強心作用を発揮する。また ミトコンドリア ATP 感受性

カリウムチャネルを開口 することにより PPC 効果 を発揮する。そしてその分子機序として PKC の活性化 や extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化 が報告されている (EF du Toit, 他 British journal of Pharmacology 2008;1-10)。これら分子機序の異なる強心薬である PDE III 阻害薬 と Ca sensitizer の薬理的な ポストコンディショニング効果 (PpostC)、虚血再灌流障害の保護効果の分子機序 である reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway の関与、再灌流後の投与時期が PpostC に与える影響 についての報告は少ない。近年、心臓の IPC に再灌流早期の PI3-Akt の関与を示唆する報告もあり、再灌流早期に PDE III 阻害薬、Ca sensitizer を投与することにより血再灌流障害を軽減できる可能性 が考えられる。

2. 研究の目的

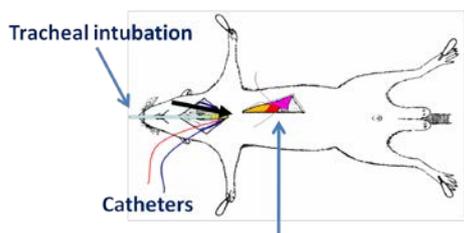
今回の研究では、ラット心虚血再灌流モデルを用いて PDE III 阻害薬、Ca sensitizer を再灌流早期に投与し、心筋梗塞サイズを対照群と比較することによりそれらの PpostC 効果 について検討する。PpostC 効果を認めた場合は、PPC の細胞内伝達経路である RISK 経路 の重要なメディエーターである ミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネル、PI3-K、PKC、NO や シクロオキシゲナーゼ 2 の関与についてそれぞれの選択的阻害薬を用いて検討し、分子細胞機構の解明を行う。

3. 研究の方法

- 1) 心筋虚血再灌流モデル: ウィスターラットにペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔後、右内頸静脈に薬剤投与用静脈ルートを確認、右内頸動脈に圧トランスドューサーカテーテルを留置する。

(Figure1)

Figure 1. MALE WISTAR RAT

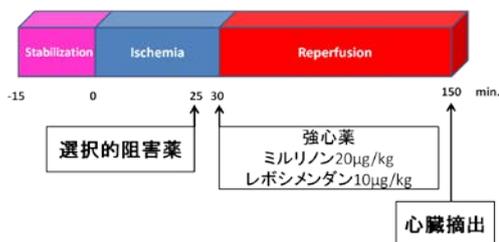


Left thoracotomy and a ligature around the LAD

2) 生体監視装置を用いて動脈圧、心拍数を経時的に測定する。

3) 気管切開の上人工呼吸管理とした後に左開胸し、心臓を露出した後に肉眼的に冠動脈左前下行枝を同定し、7-0 ナイロン糸をかけ 30 分間の冠動脈閉塞を行い、その後 120 分間再還流時間を設ける。選択的阻害薬は再灌流 5 分前に投与する。

実験方法



4) 心筋虚血モデルにおいて以下に示

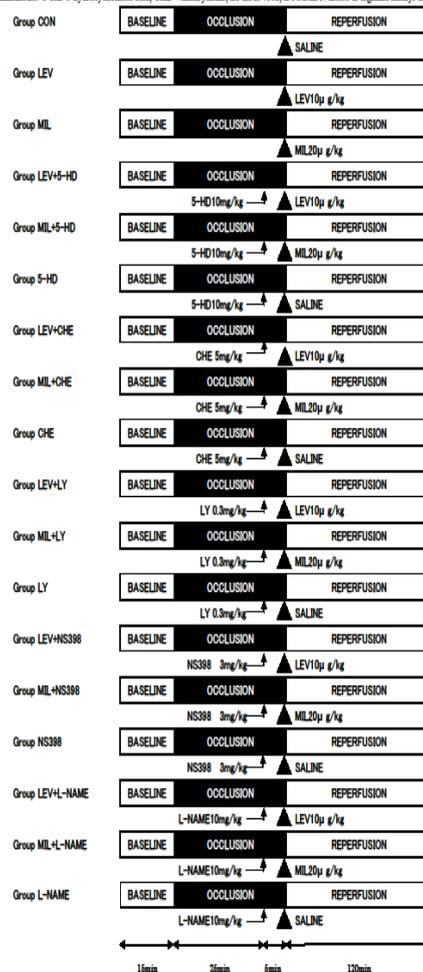
す群を設定する。

- ① コントロール群: 心筋虚血再還流のみ
- ② ミルリノン群: 虚血再灌流直前にミルリノン 20 μg/kg 投与
- ③ レボシメンダン群: 虚血再灌流直前にレボシメンダン 10 μg/kg 投与
- ④ 選択的阻害薬投与群 (計 15 群): 上記①②③群においてミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネル、PI3-K、

PKC、NO およびシクロオキシゲナーゼ 2 の選択的阻害薬 (5HD、LY294002、chelerythrine、L-NAME、NS398) を再灌流 5 分前に投与。

総計 18 群に分けて心筋梗塞サイズを比較検討する (Figure2)。

Figure2. A schematic illustration of the experimental protocols. CON: control; LEV: levosimendan; MIL: milrinone; 5-HD: 5-hydroxydecanoic acid; CHE: chelerythrine; LY: LY294002; L-NAME: N-nitro-L-arginine methyl ester;



5) 120 分間の再還流時間の後、冠動脈を再び閉塞した状態でパテントブルーダイを心腔内に投与し虚血危険領域を明らかにする。心筋が染色された後、心臓を摘出し凍結保存する。凍結後にスライスし、心筋切片を TTC 染

色にて染色し梗塞領域 (Figure3) を明らかにして、心筋梗塞サイズとそれが虚血危険領域に占める面積比を求め各群間において比較する。

Figure3: TTC-stained heart slices



white or pale are necrotic myocardial regions.

4. 研究成果

Table1. 虚血危険領域 (AAR; area at risk) に占める心筋梗塞サイズ (IS; Infarct Size) の割合 (IS/AAR)

Group	Number	AAR/LV (%)	IS/AAR (%)
Group CON	11	40±8	44±18
Group MIL	8	46±13	19±9*
Group LEV	14	45±9	18±11*
Group MIL+NS	12	42±8	23±8*
Group LEV+NS	8	45±8	44±16
Group NS	12	41±6	46±17
Group MIL+CHE	8	42±11	18±10*
Group LEV+CHE	9	45±4	42±18
Group CHE	11	42±7	44±21
Group MIL+5HD	10	49±5	24±8*
Group LEV+5HD	11	46±8	42±10
Group 5HD	12	45±10	38±10
Group MIL+LY	10	41±6	40±24
Group LEV+LY	9	40±9	41±13
Group LY	8	40±8	39±21
Group MIL+L-NAME	13	46±8	45±19
Group LEV+L-NAME	9	39±7	43±17
Group L-NAME	7	40±6	53±21

Data are expressed as mean ± SD. Groups CON, MIL, and LEV received saline, 20 µg/kg milrinone, and 10 µg/kg levosimendan, respectively, just before reperfusion. Groups NS, CHE, 5HD, LY, and L-NAME received 3 mg/kg NS398, 5 mg/kg chelerythrine, 10 mg/kg 5-hydroxydecanoic acid, 0.3 mg/kg LY294002, and 10 mg/kg N-nitro-L-arginine methyl ester i.v. bolus at 5 min before reperfusion, respectively. AAR, area at risk; LV, left ventricular, IS, infarct size. * Significantly (p<0.05) different from group CON.

Figure4. コントロール群と選択的阻害薬投与群における IS/AAR

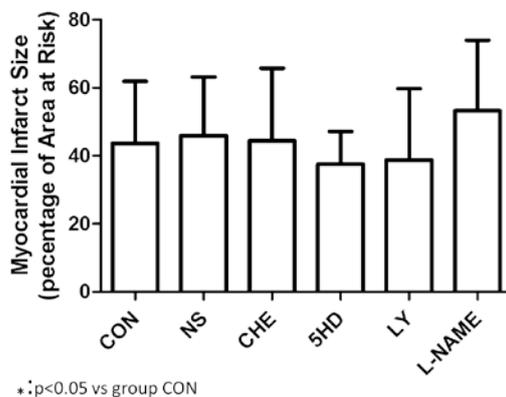


Figure5. コントロール群とミルリノン (MIL; milrinone) 群、MIL+選択的阻害薬投与群における IS/AAR

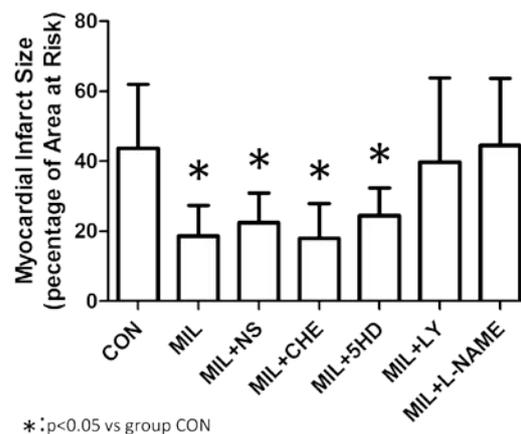
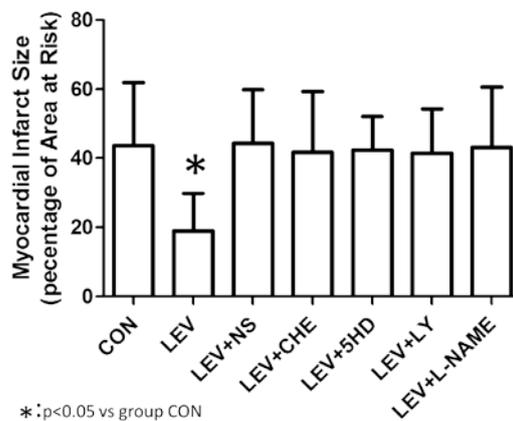


Figure6. コントロール群とレボシメンダン (LV; levosimendan) 群、LV+選択的阻害薬投与群における IS/AAR



1) 強心薬による PpoC 効果

ミルリノン (19±9%)、レボシメンダン (18±11%) の再灌流直前投与はコントロール群 (44±18%) と比較して有意に心筋梗塞サイズを減少させた。(table1、date:mean±SD)

2) ミルリノンの PpoC の分子機序

ミルリノンの PpoC (19±9%) は PI3-K 選択的阻害薬 (MIL+LY294002、40±24%) および NOS 阻害薬 (MIL+L-NAME、45±19%) により抑制された。(table1、Figure5)

2) レボシメンダンの PpoC の分子機序

レボシメンダンの PpoC (18±11%) は選択的シクロオキシゲナーゼ 2 阻害薬 (LV+NS398、44±16%)、選択的 PKC 阻害薬 (LV+chererythrine、42±18%) 選択的ミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャンネル阻害薬 (LV+5HD、42±10%)、選択的 PI3-K 阻害薬 (LV+LY294002、40±24%) および NOS 阻害薬 (LV+L-NAME、45±19%) により抑制された。(table1、Figure6)

4) 結語

ミルリノン、レボシメンダンは薬理的ポストコンディショニング効果を示した。

ミルリノンの薬理的ポストコンディショニング効果の細胞内メカニズムには NO および PI3-K が関与する。

レボシメンダンの薬理的ポストコンディショニング効果の細胞内メカニズムにはシクロオキシゲナーゼ 2、PKC、ミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャンネル、PI3-K、NO が関与した。

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)

[学会発表] (計 5 件)

①アメリカ麻酔学会 2009

演題名: A role for the mitochondrial KATP channel in postconditioning induced by milrinone or levosimendan in rat hearts

②アメリカ麻酔学会 2010

演題名: The role of protein kinase C in milrinone- and levosimendan-induced postconditioning rat hearts

③アメリカ麻酔学会 2011

演題名: Levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning is dependent on cyclooxygenase-2 in rat hearts

④第 31 回日本循環制御医学会総会

演題名: ミルリノンおよびレボシメンダンによる薬理的ポストコンディショニングの検討とその分子機序の解明

⑤第 32 回日本循環制御医学会総会

演題名: 強心薬(ミルリノン、レボシメンダン)による薬理的ポストコンディショニングの分子機序の解明~シクロオキシゲナーゼ 2 の役割~

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東島 潮 (HIGASHIJIMA USHIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 21791452