

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462429

研究課題名(和文)PI3K/Akt経路からみた高用量インスリンの心筋プレコンディショニング効果

研究課題名(英文)Myocardial preconditioning effects of high-dose insulin and PI3K/Akt signaling pathway

研究代表者

小口 健史(OGUCHI, Takeshi)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：60201399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：心筋虚血プレコンディショニング効果についてはよく知られており、様々な薬物でも同様の心筋保護効果が報告され、吸入麻酔の心筋保護効果は麻酔科領域でも応用されている。インスリンは、心臓手術において心機能を改善することが示されている。今回の研究では、ラットの気絶心筋モデルにおいて、高用量インスリン投与による虚血再灌流後の心機能回復は正常血糖では良好だったが、高血糖では虚血再灌流後のインスリンによる心収縮力回復効果は減弱した。機序としては、高血糖によるAkt活性化の抑制が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Acute hyperglycemia diminishes the cardioprotection induced by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. The current study showed that acute hyperglycemia reduced the p-Akt level, in spite of insulin administration prior to the ischemic period. Inhibition of myocardial Akt phosphorylation is a possible mechanism by which hyperglycemia attenuates the cardioprotective effect of insulin. Normalizing blood glucose before ischemia is important to maximize insulin-induced cardioprotection in stunned rat heart.

研究分野：麻酔科学

キーワード：インスリン プレコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

(1) プレコンディショニング

心筋虚血プレコンディショニング効果についてはよく知られており、様々な薬物でも同様の心筋保護効果が報告され、吸入麻酔の心筋保護効果は麻酔科領域でも応用されている。インスリンは、心臓手術において、心機能を改善することが示されている。我々はラットの正常血糖の虚血再灌流モデルにおいて、高用量インスリンは PI3K/Akt 経路を介して心筋保護作用を示すことを報告した。

(2) 高血糖とプレコンディショニング

コントロール不良の糖尿病患者においては心臓手術後の予後が悪く、その一因として高血糖による心筋の虚血プレコンディショニング作用の減弱が指摘されている。さらに、心臓手術中の高血糖でも予後が悪化すると報告されている。その機序として、iNOS、NF- κ B、TNF- α の産生増加が知られている。しかし、気絶心筋におけるインスリンの心筋保護効果に対する急性高血糖の影響は未解明である。

2. 研究の目的

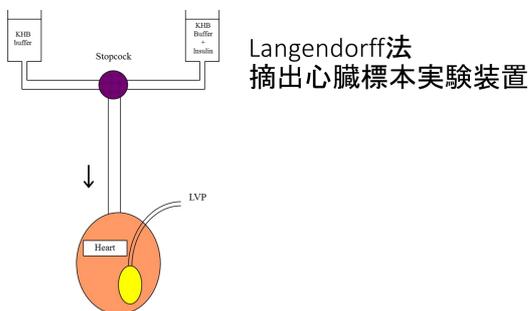
(1) 本研究では、「ラットの気絶心筋モデルにおいて高血糖はインスリンの心筋保護効果を減弱する」という仮説を立てて、高血糖においても高用量インスリンが心筋保護作用を示すかどうか、について検討した。

(2) Primary outcome は心収縮力とした。その機序を調べるために、心筋内 pAkt と TNF- α について測定を行った。

3. 研究の方法

(1) ラットからペントバルビタール腹腔内投与による麻酔下に心臓を摘出して大動脈にカニューレを挿入し、Langendorff 法により modified Krebs-Henseleit buffer で灌流を行った (Fig. 1)。

Fig. 1



(2) 心収縮力を測定するためにバルーンカテーテルを肺静脈から左室内に挿入し、冠灌流量を測定するため、肺動脈にもカテーテルを挿入した。

(3) 摘出心の心収縮が安定した後に、イン

スリンの先行投与 20 分間、虚血 15 分間、再灌流 20 分間のプロトコール (Fig. 2) で、3 群 (各群 n=10) に分けて比較検討した。虚血中は 222 回/分でペーシングを行った。

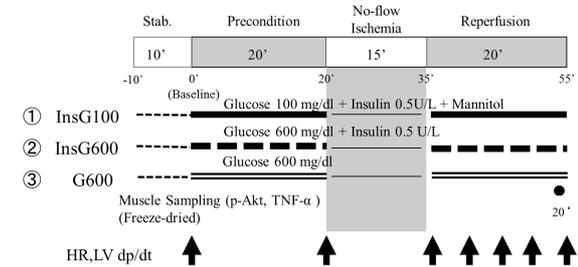
(4) InsG100 群では、インスリン (0.5 U/L) とグルコース (100 mg/dl) に、浸透圧を統一するためにマンニトール (27.5 mmol/L) を加えた灌流液を用いて灌流した。InsG600 群ではインスリン (0.5 U/L) とグルコース (600 mg/dl) の灌流液で灌流した。G600 群ではグルコース (600 mg/dl) の灌流液で灌流を行った。

(5) 測定項目として、心拍数、左室圧 dp/dt max、冠灌流量を先行投与前、先行投与 20 分、再灌流 1 分、5 分、10 分、20 分で測定した。

(6) 再灌流 20 分後の心臓を瞬間凍結・凍結乾燥して、ELISA 法で再灌流終了時の心筋内 pAkt、TNF- α を測定した。

(7) 統計は、分散分析後に Bonferroni post-hoc を行い p<0.05 を有意差有りとした。

Fig. 2



4. 研究成果

(1) 基準値は 3 群間で有意差はなかった (Table 1)。

(2) 冠灌流量は、再灌流後 InsG100 群は InsG600 群、G600 群と比較し高値であった (Fig. 3)。

(3) 心拍数は再灌流後 3 群ともに徐々に上昇したが、InsG100 群は InsG600 群・G600 群と比較して有意に高かった (Fig. 4)。

(4) インスリン前投与により、虚血直前の左室圧 dp/dt max は灌流開始時と比較して有意な上昇を認めた。虚血再灌流 20 分後の左室圧 dp/dt max は、InsG100 群は InsG600 群・G600 群に比較し高値であった (Fig. 5)。

(5) 心筋内 pAkt は InsG100 群で最も高く、次は InsG600 群であり、G600 群で最も低値であった。しかし、心筋内 TNF- α は 3 群間で有意差を認めなかった (Fig. 6)。

Table 1 Baseline Measurements

	InsG100	InsG600	G600
Number (n)	10	10	10
Dry heart weight (g)	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Heart rate (bpm)	251 ± 29	242 ± 23	245 ± 30
LV dP/dt max (mmHg/sec)	3840 ± 492	3420 ± 512	3440 ± 532
Coronary flow (ml/min)	11.9 ± 1.3	11.5 ± 3.1	12.1 ± 2.8

Fig. 3

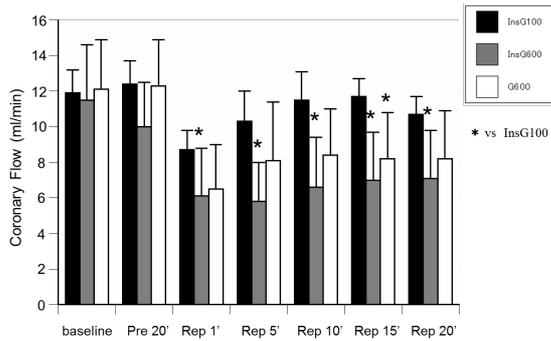


Fig. 4

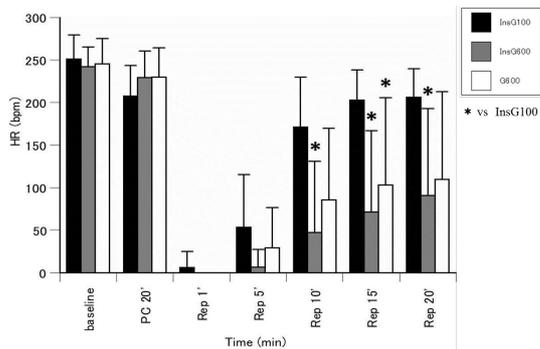


Fig. 5

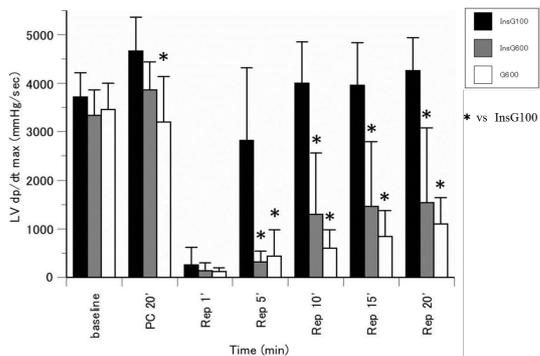
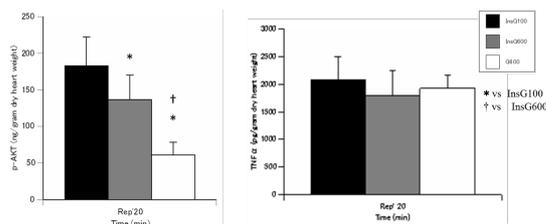


Fig. 6



(6) 今回の研究では、ラットの気絶心筋モデルにおいて高血糖は虚血再灌流後のインスリンによる心収縮力回復効果を減弱させた。

(7) 機序としては、Akt 活性化の抑制が考えられた。しかし、TNF には影響を与えなかった。

(8) プレコンディショニング効果には虚血によるものと薬剤によるものがあるが、インスリンはこのプレコンディショニング効果を示す薬剤の一つである。一方で急性高血糖は虚血プレコンディショニングやイソフルレンの心筋保護効果を減弱させると報告されている(引用文献 -)。

(9) Akt は虚血プレコンディショニング効果において重要な役割を果たしており、インスリンの心筋保護効果においても Akt シグナリングカスケードの活性化が作用機序の一つであると報告されている(引用文献)。

(10) 本研究により、高血糖は気絶心筋に対するインスリンの作用においても、Akt のリン酸化を抑制することにより心筋保護効果を減弱することが示唆された。

(11) TNF は、インスリンによって pAkt を介して抑制される事を我々は過去に示したが、今回の高血糖によるインスリンの心筋保護効果の減弱においては影響がなかった。

(12) 高用量インスリン投与による虚血再灌流後の心機能回復は、正常血糖では良好だったが、高血糖においては抑制された。本研究から、気絶心筋において高血糖は高用量インスリンによる心筋プレコンディショニング効果を減弱させ、これは Akt のリン酸化抑制作用によることが示唆された。

(13) 心臓外科手術において高用量インスリンを使用して心筋保護効果を期待する場合には、血糖を正常に保つ必要があることが本動物実験から示唆された。

<引用文献>

Kersten JR, Schmelting TJ, Orth KG, Pagel PS, Warltier DC: Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. The American journal of physiology 1998, 275(2 Pt 2):H721-725.

Yang Z, Tian Y, Liu Y, Hennessy S, Kron IL, French BA: Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning by inhibiting Akt phosphorylation: normalizing blood glucose before

ischemia restores ischemic preconditioning. Oxidative medicine and cellular longevity 2013, 2013:329183.

Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. Anesthesiology 2002, 96(1):183-188.

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 2 件)

Yosuke Nakadate, Hiroaki Sato, Takeshi Oguchi, Tamaki Sato, Kazuha Mitsui, Takashi Matsukawa.

Acute Hyperglycemia Diminishes Cardioprotective Effects of High Dose Insulin in the Ischemic Rat Heart
Anesthesiology 2014 Annual Meeting
2014 年 10 月 14 日
ニューオリンズ(米国)

中楯 陽介、佐藤 宏明、小口 健史、佐藤 環、鈴木 和博、松川 隆
高血糖は心臓虚血再灌流モデルにおける高用量インスリン投与の心機能回復を減弱する
日本麻酔科学会第 61 回学術集会
2014 年 5 月 15 日
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[その他]

ホームページ等

山梨大学医学部麻酔科学講座心筋代謝実験グループ

<http://y-anesth.jp/research/shinkin/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小口 健史(OGUCHI, Takeshi)
山梨大学・総合研究部・准教授
研究者番号: 60201399

(2)連携研究者

松川 隆 (MATSUKAWA, Takashi)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 80209519

石山 忠彦 (ISHIYAMA, Tadahiko)
山梨大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 90293448