

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462338

研究課題名(和文) 高血糖における心保護戦略の開発：PDE3阻害薬の効果

研究課題名(英文) Cardioprotective effects of phosphodiesterase-3 inhibitor in hyperglycemic swine

研究代表者

原 哲也 (HARA, Tetsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：50304952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ブタを用いて左前下行枝の12分間閉塞と再灌流による気絶心筋モデルを作製し、気絶心筋における心筋収縮能の回復に与える急性高血糖の影響とホスホジエステラーゼ3阻害薬の心筋保護効果を、オルプリノンの虚血前投与および再灌流時投与に分けて検討した。オルプリノンの虚血前投与および再灌流時投与によりブタの気絶心筋における心筋収縮能の回復が有意に促進された。この心保護作用にはPI3K/AktおよびPKAの活性化が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Olprinone, phosphodiesterase-3 inhibitor, improves the contractile functional recovery against stunned myocardium in hyperglycemic swine. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and protein kinase A would be involved in this cardioprotective mechanism.

研究分野：麻酔科学

キーワード：虚血再灌流傷害 気絶心筋 オルプリノン 高血糖 コンディショニング

## 1. 研究開始当初の背景

冠動脈の完全閉塞などにより生じた短時間虚血の後に、途絶していた冠血流が再開したにもかかわらず、心収縮能の低下が遷延する現象を気絶心筋と呼び、1982年にBraunwaldとKlonerによって報告された(Braunwald E, Kloner RA: *Circulation* 1982; 66: 1146-1149)。その病態の重要な特徴は「flow-function mismatch」であり、冠血流が正常に回復した後も心収縮の異常は数時間から数日続き、組織学的に明らかな心筋細胞障害は認められない。臨床的には経皮的冠動脈インターベンション、冠動脈バイパス手術あるいは急性冠症候群などにおける発症の報告がある。カテコラミンを始めとする陽性変力作用を有する薬剤は気絶心筋における心収縮能の低下を改善するが、その収縮力増強作用が発揮されるのは薬剤投与中に限られ、投与中止後の心収縮能の回復を促進することはできない。気絶心筋の発症には、再灌流直後の数分間に増加する活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)の産生が関与しており、気絶心筋における重要なメディエーターとして注目されている。一方、収縮不全の機序としてCa<sup>2+</sup>利用の障害あるいはCa<sup>2+</sup>感受性の低下さらにはトロポニン-Iの変性が示唆されるが、いまだ完全には解明されていない(Hara T, Masui 2006; 55: 552-9)。われわれは犬およびブタを用い、左前下行枝の15あるいは12分間閉塞による気絶心筋モデルを作製し、吸入麻酔薬、オピオイド、Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構阻害薬、PDE3阻害薬などの心筋保護作用を検討しその心筋保護作用を報告してきた(Hara T, et al.: *Anesth Analg* 2001; 92: 1139-45, Yoshitomi O, Hara T, et al.: *J Anesth* 2005; 19: 124-30, Use T, Yoshitomi O, Hara T, et al.: *Cardiovasc Drugs Ther.* 2006; 20: 327-34, Akiyama D, Yoshitomi O, Hara T, et al.: *J Anesth* 2010; 24: 575-81, Yoshitomi O, Hara T, et al.:

*Shock* 2012; 38: 92-7, Shibata I, Yoshitomi O, Hara T, et al.: *Scand Cardiovasc J* 2013; 47: 50-7)。

近年、手術症例における糖尿病患者の割合は増加傾向にある。しかし、糖尿病においてはプレコンディショニングおよびポストコンディショニング効果が減弱するため、心筋梗塞サイズの縮小効果が減弱することが報告され(Kersten JR, et al.: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1218-24)。吸入麻酔薬のプレコンディショニング効果も糖尿病あるいは高血糖状態では十分に発揮されないため(Tanaka K, et al.: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H2018-23, Canfield SG, et al.: *Anesthesiology.* 2012; 117: 735-44)、糖尿病患者における周術期心筋保護では新たな戦略が求められている。われわれはラットを用い、糖尿病および高血糖状態におけるPDE3阻害薬の心筋梗塞サイズ縮小効果を検討し、その保護効果が正常血糖状態と同様に発揮されることを明らかにしてきた(Matsumoto S, Hara T, et al.: *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; 23: 263-70, Matsumoto S, Hara T, et al.: *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11: 4)。しかし、気絶心筋と高血糖状態との関連はいまだ明らかにされておらず、糖尿病において気絶心筋の回復を促進させるような薬剤は存在しない。

## 2. 研究の目的

ブタを用いて左前下行枝の12分間閉塞と再灌流による気絶心筋モデルを作製し(Akiyama D, Hara T, et al.: *J Anesth* 2010; 24: 575-81)、気絶心筋の回復に与える急性高血糖の影響とPDE3阻害薬の心筋保護効果を、PDE3阻害薬の虚血前投与および再灌流時投与に分けて検討したい。気絶心筋の回復は心筋に埋め込んだ超音波クリスタルを用いた局所心筋短縮率で評価する。心筋保護作用

の機序として現在、特に注目されているホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ/Akt (PI3K/Akt) およびプロテインキナーゼ A (PKA) の関与の有無についてもそれぞれの阻害薬を用いて明らかにする。

### 3. 研究の方法

ブタを用いて左前下行枝の 15 分間閉塞および 90 分間の再灌流による気絶心筋を作製し、PDE3 阻害薬が高血糖状態の気絶心筋の回復に与える影響とその細胞内機序を検討する。左室収縮機能の指標として心筋に埋め込んだ超音波クリスタルを用いた局所心筋短縮率を用いる。血糖値 400mg/dL の高血糖状態を作成し、虚血前および再灌流時に PDE3 阻害薬であるオルプリノン投与する。PI3K/Akt 阻害薬および PKA 阻害薬の前投与の有無により、高血糖状態での PDE3 阻害薬の心筋保護効果における PI3K/Akt および PKA の関与を検討する。

実験群を 高血糖虚血前オルプリノン群、高血糖虚血前オルプリノン + PI3K/Akt 阻害薬群、高血糖虚血前オルプリノン + PKA 阻害薬群、高血糖再灌流時オルプリノン群、高血糖再灌流時オルプリノン + PI3K/Akt 阻害薬群、高血糖再灌流時オルプリノン + PKA 阻害薬群、高血糖対照群、虚血前オルプリノン群、再灌流時オルプリノン群、対照群の 10 群に分け、それぞれ 10 頭ずつのブタを用いて検討する。

(1) 実験 1: オルプリノン虚血前投与が高血糖状態の気絶心筋に与える影響と PI3K/Akt の関与 (実験群 、 、 )

ブタをベントバルビタール、フェンタニルで麻酔し、気管切開した後、調節呼吸とし、開胸、心膜切開を行う。超音波血流計を上行大動脈に装着する。左前下行枝の第一対角枝より末梢を剥離し、左内頸動脈よりのバイパス回路を挿入する。超音波クリスタルおよび微量透析用カテーテルを左前下

行枝灌流領域の心筋に埋め込む。心尖部より左室腔内へ圧トランスデューサーカテーテルを留置する。

血糖値 400mg/dL となるようにブドウ糖液を持続静脈内投与し、循環動態の安定後にベースライン値を測定する。

実験群 ではオルプリノン 10 μg/kg を静脈内投与し、15 分後に内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し、12 分間の心筋虚血を作製する。

実験群 では PI3K/Akt 阻害薬である LY294002 の 0.3mg/kg を静脈内投与し、その 5 分後にオルプリノン 10 μg/kg を静脈内投与する。15 分後に内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し、12 分間の心筋虚血を作製する。

実験群 では PKA 阻害薬である H89 の 0.2mg/kg を静脈内投与し、その 5 分後にオルプリノン 10 μg/kg を静脈内投与する。15 分後に内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し、12 分間の心筋虚血を作製する。

実験群 ではオルプリノン投与を行わず、内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し、12 分間の心筋虚血を作製する。再灌流後 90 分間観察する。

動脈圧、心拍数、心拍出量、左前下行枝血流量、左室拡張終期圧、左室内圧上昇速度、体血管抵抗および冠血管抵抗を経時的に測定する。

超音波クリスタルで心筋局所短縮率を測定し心収縮力回復の指標とする。

カラーマイクロソフウェア法で局所心筋灌流量を測定する。

(2) 実験 2: オルプリノン再灌流時投与が高血糖状態の気絶心筋に与える影響と PI3K/Akt の関与 (実験群 、 、 )

実験 1 と同様な手技で実験モデルを作製する。

血糖値 400mg/dL となるようにブドウ糖液

を持続静脈内投与し、循環動態の安定後にベースライン値を測定する。

実験群 では内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し 12 分間の心筋虚血を作製する。再灌流と同時にオルプリノン 10  $\mu$ g/kg を静脈内投与する。

実験群 では内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し 12 分間の心筋虚血を作製する。再灌流の 5 分前に LY294002 の 0.3mg/kg を静脈内投与し、再灌流と同時にオルプリノン 10  $\mu$ g/kg を静脈内投与する。

実験群 では内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し 12 分間の心筋虚血を作製する。再灌流の 5 分前に H89 の 0.2mg/kg を静脈内投与し、再灌流と同時にオルプリノン 10  $\mu$ g/kg を静脈内投与する。

再灌流後 90 分間観察する。

動脈圧、心拍数、心拍出量、左前下行枝血流量、左室拡張終期圧、左室内圧上昇速度、体血管抵抗および冠血管抵抗を経時的に測定する。

超音波クリスタルで心筋局所短縮率を測定し心収縮力回復の指標とする。

カラーマイクロソフエア法で局所心筋灌流量を測定する。

(3) 実験 3: オルプリノン投与が正常血糖状態の気絶心筋に与える影響 (実験群 、 、 )

実験 1 と同様な手技で実験モデルを作製する。

循環動態の安定後にベースライン値を測定する。

実験群 ではオルプリノン 10  $\mu$ g/kg を静脈内投与し、15 分後に内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し、12 分間の心筋虚血を作製する。

実験群 では内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し 12 分間の心筋虚血を

作製する。再灌流と同時にオルプリノン 10  $\mu$ g/kg を静脈内投与する。

実験群 ではオルプリノン投与を行わず、内頸動脈から冠動脈へのバイパス回路を遮断し、12 分間の心筋虚血を作製する。再灌流後 90 分間観察する。

動脈圧、心拍数、心拍出量、左前下行枝血流量、左室拡張終期圧、左室内圧上昇速度、体血管抵抗および冠血管抵抗を経時的に測定する。

超音波クリスタルで心筋局所短縮率を測定し心収縮力回復の指標とする。

カラーマイクロソフエア法で局所心筋灌流量を測定する。

#### 4. 研究成果

(1) オルプリノン虚血前投与が高血糖状態の気絶心筋に与える影響と PI3K/Akt の関与 (匹数は各群 8 匹)

オルプリノンの虚血前投与により気絶心筋の回復が有意に促進された。この心保護作用は PI3K/Akt 阻害薬および PKA 阻害薬の前処置により消失し、オルプリノンのプレコンディショニング作用における PI3K/Akt および PKA の関与が示唆された。

(2) オルプリノン再灌流時投与が高血糖状態の気絶心筋に与える影響と PI3K/Akt の関与 (匹数は各群 7 匹)

オルプリノンの再灌流時投与により気絶心筋の回復が有意に促進された。この心保護作用は PI3K/Akt 阻害薬および PKA 阻害薬の前処置により消失し、オルプリノンのポストコンディショニング作用における PI3K/Akt および PKA の関与が示唆された。

(3) オルプリノン投与が正常血糖状態の気絶心筋に与える影響 (匹数は各群 4 匹)

オルプリノンの虚血前投与および再灌流時投与により気絶心筋の回復が促進される傾向にあったが、有意差を得るためには匹数が不足している。

(4) まとめ

オルブリンの虚血前投与および再灌流時投与により気絶心筋の回復が有意に促進された。この心保護作用には PI3K/Akt および PKA の活性化が関与していることが示唆された。今後は不足する匹数で追加実験を行い、統計学的に意味のあるデータとした後に、国内外の学会や学術雑誌で発表する。

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)

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]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原 哲也 (HARA, Tetsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・  
教授

研究者番号: 5 0 3 0 4 9 2 5