

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10534

研究課題名(和文) 麻酔薬の一過性受容器電位(TRPC)チャンネル抑制効果と心保護について

研究課題名(英文) Effects of Anesthetics on TRPC channel mediated myocardial protection

研究代表者

北川 裕利 (Hirotohi, KITAGAWA)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50252391

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)：ラット心臓にマイクロダイアリシス法を用い、虚血再灌流時における心筋間質ミオグロビン濃度を心筋細胞傷害の指標としてモニターした。虚血再灌流時の濃度上昇は2-APBおよびSKF96365、sevoflurane前処置により抑制された。一方、nifedipineで抑制されなかったことから虚血再灌流傷害にTRPC channelが関与していることが示唆された。さらに、この効果はTAC手術後(TRPC channel活性化)ラットにおいて野生型ラットと比して増強した。TRPC channelは虚血再灌流傷害に関与し、sevofluraneによる虚血再灌流傷害抑制効果の一因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using microdialysis technique, we monitored myocardial interstitial myoglobin in the ischemic region of anesthetized rat during ischemia and after reperfusion. In the vehicle, myoglobin levels increased during ischemia and after reperfusion. 2-APB, SKF96365, a TRPC channel blocker, suppressed the increase in dialysate myoglobin levels during ischemia and reperfusion. Sevoflurane also reduced dialysate myoglobin levels during ischemia and reperfusion. In transverse aortic constriction (TAC) model rats with TRPC channel activation, myoglobin levels also increased during ischemia and after reperfusion. These were further suppressed than those in wild type rats with pretreatment of 2-APB, SKF96365 and sevoflurane. These results suggested that TRPC channels plays a significant role in cardiomyocyte injury during ischemia and after reperfusion. Furthermore, sevoflurane might exert an in vivo myocardial protective effect during ischemia and after reperfusion via TRPC channels.

研究分野：周術期管理学

キーワード：吸入麻酔薬 TRPCチャンネル 心筋保護 虚血再灌流傷害 マイクロダイアリシス

1. 研究開始当初の背景

我々は吸入麻酔薬が心保護効果を有することを 1997 年に Judy R. Kersten が発表して以来、虚血プレコンディショニング類似のメカニズムとして、多くの研究者が心筋細胞膜表面にある G 蛋白受容体への刺激による細胞内シグナルパスウェイの関与と心筋細胞膜表面およびミトコンドリアの K channel に注目し、精力的に解析されてきた。一方、我々は細胞傷害の重要な因子の一つである Ca^{2+} 動態に着目し、虚血時に生じる小胞体 Ca^{2+} の低下をトリガーとして生じる電位依存ではない Ca^{2+} channel である Transient receptor potential canonical (TRPC) が、虚血再灌流時に心筋細胞膜表面に発現し、そのチャネルを介して細胞内 Ca^{2+} 流入を引き起こすことを世界で初めて証明した (Brit J Pharma, 2010)。また、その TRPC channel を sevoflurane が抑制することを証明し、虚血再灌流傷害を制御できる可能性が示唆された (Anesthesiology, 2011)。この結果は吸入麻酔薬による心保護効果がプレコンディショニングによる間接効果だけでなく、細胞膜上の TRPC channel への直接効果をも有することを示しているが、よくわかっていない。

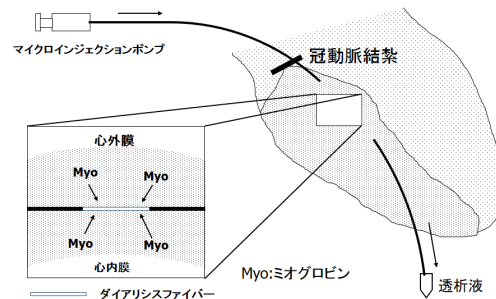
我々は今までに心臓マイクロダイアリス法により心筋虚血再灌流障害を心筋逸脱蛋白、酵素を鋭敏に検知できるよう改良した。その手法を用いることで、上記内容を解明することが可能であると考えた。

2. 研究の目的

今回の研究では in vivo 心臓マイクロダイアリス法を用いて麻酔薬投与中の心保護効果を調べ、なかでも直接効果について検討する。さらに TRPC チャネル過剰発現ラットの再灌流障害増強効果についても検証したい。

3. 研究の方法

心臓マイクロダイアリス法を用いて検討した。(下図)



ネブタール麻酔下ラットの左室心筋にマイクロダイアリスファイバーを植え込み、一方よりリンゲル液で灌流し、他方より透析液を回収して各種マーカー濃度を測定し、心筋間質濃度応答の指標とする。

ミオグロビンの測定

モノクローナル抗体による抗原抗体反応 (サンドイッチ法) と毛細管現象を利用した免疫クロマトグラフィー法を併用使用したロッシュ社製ミオグロビン測定キット (カルディアックリーダー®、ロッシュ・ダイアグノスティック社製、スイス) にて測定。

TRPC 活性化ラットの作成 (TAC 手術後ラット)

TAC (transverse aortic constriction) 大動脈弓を結紮することで大動脈における左室内を高圧にする。重度な心肥大が認められた術 4 週以後のラットを選択、抽出して検討する。

(1) TRPC channel blocker の虚血再灌流傷害に及ぼす影響 (SKF96365, 2-APB)

(2) 細胞内 Ca 動態に影響する L type Ca^{2+} channel blocker (nifedipine)、TRPC channel blocker/L type Ca^{2+} channel blocker (Lanthanum) の虚血再灌流障害に及ぼす影響

(3) 野生型ラットおよび TAC 手術後ラットに対する TRPC channel blocker(2-APB)と吸入麻酔薬(sevoflurane)の影響

4. 研究成果

(1 - 3) TRPC channel blocker (2-APB, SKF)、TRPC/ Ca²⁺ channel blocker (Lanthanum) 前処置、吸入麻酔薬 (sevoflurane) 暴露下の冠動脈閉塞開放時の透析液ミオグロビン濃度応答を測定し、いずれも vehicle 群に比して抑制された。一方、L type Ca²⁺ channel blocker 前処置による抑制効果は認められなかった。

(4) TRPC channel blocker (2-APB)による冠動脈閉塞開放時の透析液ミオグロビン濃度上昇は野生型ラットに比して TRPC channel 活性化ラットの方が抑制された。また、sevoflurane 暴露下においても同様の抑制効果が認められた。

麻酔下ラット冠動脈閉塞開放による虚血再灌流傷害は 2-APB および SKF で抑制された。また、Lanthanum は抑制されたが、nifedipine で抑制されなかったことから、本実験における虚血再灌流傷害抑制効果として主に TRPC channel が関与していることが示唆された。また、in vitro で同様の拮抗作用を示す吸入麻酔薬によっても本研究で同様の抑制効果が認められた。さらに、この効果は TRPC チャネル活性化(TAC 術後)ラットにおいて TRPC channel および吸入麻酔薬の前処置により、いずれもその効果が増強された。こうした結果は in vivo においても吸入麻酔薬に TRPC channel を介した虚血再灌流傷害抑制が関与していることが強く示唆された。

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 2 件)

A Kojima, Y Fukushima, Ito Y, Ding WG, Kitagawa H, Matsuura H, TRPC channel blockers improve ventricular contractile functions after ischemia/reperfusion in a Langendorff - perfused mouse heart model. J Cardiovasc Pharma. 2018, 71, 225-248
DOI: 10.1097/FJC.0000000000000566

Kojima A, Fukushima Y, Y Ito, Ding WG, Rika U, Seto T, Kitagawa H, Matsuura H, Interaction of Propofol with human voltage-gated Kv1.5 channel determined by Docking simulation and mutagenesis analysis. J Cardiovasc Pharma. 2018, 71, 10-18

DOI: 10.1097/FJC.0000000000000538

[学会発表](計 5 件)

小嶋亜希子、湯浅真由美、石川ゆうこ、伊藤有紀、高橋完、北川裕利 マウス肥大心筋細胞における酸化ストレスによる細胞傷害の発生とセボフルランによる保護効果、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、2015 年 5 月 28 日、神戸

石川ゆうこ、澤田規、石原真理子、湯浅真由美、小嶋亜希子、北川裕利 心筋虚血再灌流傷害に対する TRPC チャネルの影響 日本麻酔科学会第 63 回学術集会、2016 年 5 月 26 日、福岡

小嶋亜希子、伊藤有紀、湯浅真由美、石川ゆうこ、高橋完、北川裕利 マウス正常心筋細胞、肥大心筋細胞における酸化ストレスによる細胞傷害は筋小胞体 Ca²⁺ 制御機能異常が関与する 日本麻酔科学会第 63 回学術集

会、2016年5月26日、福岡

小嶋亜希子、瀬戸倫義、伊藤有紀、福島豊、高橋完、北川裕利 プロポフォールと膜電位依存性 hKv1.5 チャンネルの相互作用に関わる分子基盤 日本麻酔科学会第63回学術集会、2016年5月26日、福岡

小嶋亜希子、福島豊、伊藤有紀、瀬戸倫義、高橋完、北川裕利 血清アルブミンはプロポフォールの hKv1.5 チャンネルに対する open-channel block 作用を維持したまま抑制作用を減弱させる 日本麻酔科学会第63回学術集会、2016年5月26日、福岡

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

北川裕利 (KITAGAWA HIROTOSHI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：50252391

(2) 連携研究者

山崎登自 (YAMAZAKI TOJI)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：20116122

小嶋 亜希子 (KOJIMA AKIKO)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：50447877

松浦 博 (MATSUURA HIROSHI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：60238962

高橋 完 (TAKAHASHI KAN)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80346014