

平成 21 年 3 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2005 年度～2008 年度
 課題番号：17390432
 研究課題名 (和文) ライブセルイメージングによる遺伝子操作ブタ冠動脈攣縮機構の解明と
 麻酔薬作用の研究
 研究課題名 (英文) The analysis of coronary arterial vasospasm using the live-cell
 imaging in genetically modified pigs and effects of anesthetics
 研究代表者
 畑埜 義雄 (HATANO YOSHIO)
 和歌山県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：70115913

研究成果の概要：内皮除去摘出ブタ冠動脈を用い、ライブイメージング法による Rho-A 活性化シグナルの細胞内移動の解析を可能にした。冠動脈平滑筋細胞内の Rho-A 活性化シグナルの細胞内移動を明らかにするために、green fluorescent protein でコードした Rho-A-DNA をくみこんだ融合タンパク質発現プラスミドベクターを作製し、単離したブタ冠動脈平滑筋細胞への導入を行った。これらのベクターを導入した冠動脈平滑筋細胞で、活性化時の Rho-A の血管平滑筋細胞内の挙動を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17 年度	11,300,000	0	11,300,000
18 年度	800,000	0	800,000
19 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	15,100,000	900,000	16,000,000

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：冠動脈、Rho-キナーゼ、セボフルラン

1. 研究開始当初の背景

瞬時に心筋血流を途絶する冠動脈攣縮は、麻酔、集中治療においてしばしば問題となる致命的疾患であるが、決定的な予防法、治療法はないのが現状である。これら冠動脈攣縮の主因は Rho-キナーゼ活性化であることが示唆され、細胞膜から生成されるスフィンゴリピドの一種 sphingosylphosphorylcholine (SPC) は、Rho-キナーゼ活性化を介し冠動脈を強力に収縮させる。しかし、細胞内情報伝達因子である各種キナーゼが、活性化シグナルに応じて異なる細胞内部位に移動し、特異

的な標的にシグナル伝達を行う仕組み、いわゆるターゲティング機構からみた冠動脈攣縮分子メカニズムに関しては知見がないのが現状であった。また、キナーゼ活性を介する冠動脈血流制御に対する麻酔薬の作用やその機序、麻酔薬の種類による作用の違いは不明であった。さらに、当時、免疫原性を減弱させた GnT-III トランスジェニックブタの心臓を異種心臓移植に用いる試みが実用化されつつあり、GnT-III トランスジェニックブタ心臓の冠動脈の病態生理的検討が必要となってきたと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬理学的手法のほか、活性化シグナルの細胞内移動をリアルタイムでとらえるライブイメージング法や遺伝工学的手法で、以下の3つの仮説を証明し、冠血管攣縮やそれに対する麻酔薬作用の機序を明らかにし、将来の異種心臓移植後の麻酔、集中治療管理の基礎的知見を構築するものであった。すなわちその仮説とは、(1)冠動脈攣縮にはSPCが大きく関与しており、この活性化シグナルによりRho-キナーゼが特定の平滑筋細胞内部位にターゲティングする、(2)麻酔薬による冠血管攣縮改善作用には麻酔薬間で相違があり、これはRho-キナーゼのターゲティング機構に及ぼす麻酔薬作用の違いを反映している、(3)冠血管攣縮の機序や麻酔薬の攣縮改善効果は、GnT-IIIトランスジェニックブタ心臓の冠動脈でも同様で、異種心臓移植後の麻酔、集中治療管理における麻酔薬の使用は冠血管攣縮治療や予防に有用である、というものであった。

3. 研究の方法

ケタミンで麻酔したブタの頸動脈を露出、切開し、脱血死させた。開胸後、心臓を摘出し、4°Cに冷却したクレブス液に入れた。ついで、摘出した心臓より冠動脈(左冠動脈[前下降枝、回旋枝]、右冠動脈、内径約1.5 mm)を分離し、周囲の脂肪および結合組織を十分に除去した。血管内皮細胞は、ピンセットなどを血管内腔に通過させて器械的に除去し、以下の実験に用いた。

(1)等尺性張力変化

冠動脈を約2 mmの長さのリング状標本とし、酸素95%+炭酸ガス5%を通気した37°Cのクレブス液中で等尺性張力変化を測定した。スフィンゴリピドの一種

sphingosylphosphorylcholine (SPC, 0.01-10 μ M)の累積適用による収縮反応を観察した。SPCによる収縮の15分前より、揮発性麻酔薬セボフルラン(0.5-2MAC)または選択的Rho-キナーゼ拮抗薬Y27632(2 μ M)を冠動脈標本に付加し、これらの麻酔薬あるいは薬剤の存在下でSPCによる収縮反応を比較検討した。この際、SPCによる収縮反応観察中は、麻酔薬やRho-キナーゼ拮抗薬は付加したままとした。

(2)細胞内RhoA, Rho-キナーゼ活性の測定

冠動脈標本をSPCで処置し、この時に平滑筋内のRhoA, Rho-キナーゼ活性が増大するかどうかをウエスタンブロット法で測定した。われわれのpreliminary studyにより、冠動脈平滑筋のRhoA, Rho-キナーゼ活性はSPC暴露後およそ20分後にピークに達することが明らかになっており、これら活性は、SPCに20分処置した冠動脈標本で測定された。冠動脈を約2 mmの長さのリング状標本とし、酸素

95%+炭酸ガス5%を通気した37°Cのクレブス液中でインキュベートした。SPC(10 μ M)を投与20分後に血管を取り出し、直ちに液体窒素を用いて急速冷凍した。これらの標本は、氷冷した緩衝液中でホモジェナイズ後、遠心分離を行い膜分画と細胞質分画に分けて、それぞれの分画中のRhoA, Rho-キナーゼ活性を市販の抗体を用いて測定した。細胞質分画中の活性に対する膜分画中の活性を比で示し、RhoA, Rho-キナーゼ活性の増大の程度を検討した。別の標本で、セボフルラン(2MAC)またはRho-キナーゼ拮抗薬Y27632(2 μ M)を付加した状態で同様の検討を行った。この際、SPCによる反応中は、麻酔薬やRho-キナーゼ拮抗薬は付加したままとした。

(3)ライブイメージング法を用いたRho-A活性化シグナルの細胞内移動の解析

SPC処置に伴う冠動脈平滑筋細胞内のRho-A活性化シグナルの細胞内移動を明らかにするために、green fluorescent protein(GFP)でコードしたRho-A-DNAをくみこんだ融合タンパク質発現プラスミドベクターを作製し、単離したブタ冠動脈平滑筋細胞に導入した。これらのベクターを導入した冠動脈平滑筋細胞をSPCで処置し、活性化時のRho-Aの血管平滑筋細胞内の挙動を、リアルタイムでオリンパス社製共焦点レーザー走査型顕微鏡一式(IX71BG)を用いて観察した。界面活性物質等で単離したブタ冠動脈平滑筋細胞を炭酸ガスインキュベータで培養し、カバーガラス上に培養した血管平滑筋細胞にpEGFP-C1ベクターに組み込まれたRho-A-DNAを約24時間かけて導入した。このRho-A-DNA導入培養細胞を28°CのHEPES緩衝液に浸し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。蛍光を確認して観察対象細胞を選択し、SPC(10 μ M)を付加してRho-A活性化シグナルの細胞内移動をリアルタイムで観察した。別の標本中の平滑筋細胞で、セボフルラン(2MAC)またはRho-キナーゼ拮抗薬Y27632(2 μ M)を付加した状態で同様の検討を行った。この際、SPCによる反応中は、麻酔薬やRho-キナーゼ拮抗薬は付加したままとした。

(4)トランスジェニックブタの作成

α -Galエпитープはヒトの持つ自然抗体と補体による超急性拒絶反応に対応する主要抗原である。したがって、これを抑制することにより、ブタ心臓の抗原性が低下する。その手法の一つとして、 β -D-mannoside 4-epimerase(III)(GnT-III)を過剰発現させる方法がある。トランスジェニックブタでのGnT-IIIの発現は、多くの組織や細胞でその表面の糖鎖、特に α -Galエпитープを明らかに変化させ、ヒトの自然抗体に対する抵抗性を与えると報告されている。このGnT-IIIトランスジェニックブタを、オリエンタル酵母株式会社から

託契約し作製する予定であった。

4. 研究成果

冠動脈を約2 mmの長さのリング状標本とし、酸素95%+炭酸ガス5%を通気した37°Cのクレブス液中で等尺性張力変化を測定した。SPC (0.01 - 10 μ M) の累積適用で冠動脈は強い収縮反応を示した。SPCによる収縮の15分前より、揮発性麻酔薬セボフルラン (0.5-2MAC) または選択的Rho-キナーゼ拮抗薬Y27632 (2 μ M) を冠動脈標本に付加した。セボフルラン、Y27632ともに、SPCによる収縮反応を有意に抑制した。

ついで、冠動脈標本をSPCで処置し、この時に平滑筋内のRhoA、Rho-キナーゼ活性が増大するか否か、またセボフルランあるいはY27632処置がこれらのキナーゼ活性に影響を及ぼすか否かをウエスタンブロット法で測定した。この際、膜分画と細胞質分画に分けて、それぞれの分画中のRhoA、Rho-キナーゼ活性を測定した。セボフルラン

(2MAC) またはY27632 (2 μ M) は、SPC処置で増強した平滑筋内のRhoA、Rho-キナーゼ活性をほぼ同程度に抑制した。

さらに、内皮除去摘出ブタ冠動脈を用い、ライブイメージング法によるRho-A活性化シグナルの細胞内移動を解析した。SPC処置に伴う冠動脈平滑筋細胞内のRho-A活性化シグナルの細胞内移動を明らかにするために、green fluorescent protein (GFP) でコードしたRho A DNA をくみこんだ融合タンパク質発現プラスミドベクターを作製し、単離したブタ冠動脈平滑筋細胞への導入を試みた。これらのベクターを導入した冠動脈平滑筋細胞にSPCを付加し、活性化時のRho-Aの血管平滑筋細胞内の挙動を、リアルタイムで共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。しかし、本ベクターによるGFPコードRho A-DNAの発現が依然不安定で、現在も再施行を繰り返している。この発現が安定後に、セボフルランによる修飾効果を検討する予定である。その次のプロジェクトとして、SPCによるRhoキナーゼを介する冠動脈収縮反応へ及ぼす麻酔薬の抑制作用やその機序が麻酔薬間で異なるか否かが明らかにする予定である。現在、GnT-111 トランスジェニックブタの作製開始を鋭意努力中である。作製は、当初、オリエンタル酵母株式会社に依頼する予定であったが、その施行が困難とのことで、現在、新たな企業を模索中である。可能であれば、来年度にはラットあるいはマウスを用いて検討する計画としている。

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6件)

① Nakahata K, Kinoshita H, Hama-Tomioka K,

Ishida Y, Matsuda N, Hatakeyama N, Haba M, Kondo T, Hatano Y, Cholinesterase inhibitor donepezil dilates cerebral parenchymal arterioles via the activation of neuronal nitric oxide synthase, *Anesthesiology*, 109, 124-129, 2008, 査読あり

② Nakahata K, Kinoshita H, Azma T, Matsuda N, Hama-Tomioka K, Haba M, Hatano Y, Propofol restores brain microvascular function impaired by high glucose via the decrease in oxidative stress, *Anesthesiology*, 108, 269-275, 2008, 査読あり

③ Kinoshita H, Matsuda N, Kimoto Y, Tohyama S, Hama K, Nakahata K, Hatano Y, Sevoflurane, but not propofol, prevents Rho kinase-dependent contraction induced by sphingosylphosphorylcholine in the porcine coronary artery, *Anesth Analg*, 105, 325-329, 2007, 査読あり

④ Kinoshita H, Azma T, Iranami H, Nakahata K, Kimoto Y, Dojo M, Yuge O, Hatano Y, Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists restore impaired vasorelaxation via ATP-sensitive K⁺ channels by high glucose, *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 312-318, 2006, 査読あり

⑤ Nakahata K, Kinoshita H, Tokinaga Y, Ishida Y, Kimoto Y, Dojo M, Mizumoto K, Ogawa K, Hatano Y, Vasodilation mediated by inward rectifier K⁺ channels in cerebral microvessels of hypertensive and normotensive rats, *Anesth Analg*, 102, 571-576, 2006, 査読あり

⑥ Kinoshita H, Dojo M, Nakahata K, Kimoto Y, Kakutani T, Mizumoto K, Hatano Y, Augmented activity of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels induced by droperidol in the rat aorta, *Anesth Analg*, 102, 786-791, 2006, 査読あり

[学会発表] (計28件)

①羽場政法、木下浩之、畠山登、根来孝明、畑埜義雄、血管平滑筋ATP感受性カリウムチャンネル機能に及ぼすホスファチジルイノシトール3キナーゼ活性の影響、第29回日本循環制御医学会総会、2008年5月11日、神奈川県横浜市

②富岡恵子、木下浩之、畑埜義雄、電気刺激で引き起こされるラット脳実質内細動脈の収縮及び拡張反応、第29回日本循環制御医学会総会、2008年5月11日、神奈川県横浜市

③木下浩之、松田直之、中畑克俊、丹下和晃、富岡恵子、畑埜義雄、高濃度ブドウ糖はホスファチジルイノシトール3キナーゼを介し

ヒト大網動脈ATP感受性カリウムチャネルを抑制する、日本麻酔科学会第55回学術集会、2008年6月12-14日、神奈川県横浜市

④富岡恵子、木下浩之、中畑克俊、中田亮子、畑埜義雄、電気刺激で引き起こされるラット脳実質内細動脈の収縮及び拡張反応、日本麻酔科学会第55回学術集会、2008年6月12-14日、神奈川県横浜市

⑤羽場政法、濱恵子、中畑克俊、高山登、木下浩之、畑埜義雄、血管平滑筋ATP感受性カリウムチャネル機能に及ぼすホスファチジルイノシトール3キナーゼ活性の影響。日本麻酔科学会第55回学術集会、2008年6月12-14日、神奈川県横浜市

⑥中畑克俊、羽場政法、濱恵子、堂城真友子、木下浩之、畑埜義雄、コリンエステラーゼ阻害薬ドネペジルによる神経型一酸化窒素合成酵素を介したラット脳細動脈拡張反応。日本麻酔科学会第55回学術集会、2008年6月12-14日、神奈川県横浜市

⑦松田直之、蒲ひかり、内御堂亮、木下浩之、畑埜義雄、ヒト血管平滑筋における高血糖のNADPH oxidaseの活性調節作用、日本麻酔科学会第55回学術集会、2008年6月12-14日、神奈川県横浜市

⑧木下浩之、東俊晴、伊良波浩、中畑克俊、堂城真友子、畑埜義雄、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体作用薬の抗酸化作用とヒト大網動脈のATP感受性カリウムチャネル活性、日本麻酔科学会第54回大会、2007年5月31-6月2日、北海道札幌市

⑨中畑克俊、木下浩之、長谷川愛、濱恵子、畑埜義雄、プロポフォールは高濃度ブドウ糖で抑制されたラット脳微小動脈拡張反応を回復させる、日本麻酔科学会第54回大会、2007年5月31-6月2日、北海道札幌市

⑩濱恵子、木下浩之、吉村聖子、阪中容、畑埜義雄、電気刺激で引き起こされるラット脳実質内細動脈の収縮及び拡張反応、日本麻酔科学会第54回大会、2007年5月31-6月2日、北海道札幌市

⑪Katsutoshi Nakahata, Hiroyuki Kinoshita, Ai Ishikawa, You Sakanaka, Yoshio Hatano, Donepezil Dilates Cerebral Parenchymal Arterioles Via Activation of Neuronal Nitric Oxide Synthase. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 13-17, 2007, San Francisco, CA, USA

⑫Katsutoshi Nakahata, Hiroyuki Kinoshita, Yoko Setou, Tetsuya Kakutani, Yoshio Hatano, Propofol Ameliorates Brain Microvascular Function Impaired by High Glucose Via Anti Oxidative Effect, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 13-17, 2007, San Francisco, CA, USA

⑬Hiroyuki Kinoshita, Naoyuki Matsuda, Hikari Kaba, Katsutoshi Nakahata, Yoshio Hatano, PI3K-Dependent Reduction of ATP-Sensitive K⁺ Channel Function by High Glucose in the Human Artery, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 13-17, 2007, San Francisco, CA, USA

⑭Keiko Hama-Tomioka, Hiroyuki Kinoshita, Katsutoshi Nakahata, Ryoko Nakata, Yoshio Hatano, Constriction Followed by Dilation of Cerebral Microvessels as Consequences of Neurovascular Coupling, Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist, October 13-17, 2007, San Francisco, CA, USA

⑮木下浩之、中畑克俊、畑埜義雄、高濃度ブドウ糖がATP感受性カリウムチャネルを介するヒト動脈弛緩に及ぼす作用とスーパーオキシドの関与、第33回日本集中治療医学会学術集会、2006年3月2-4日、大阪府大阪市

⑯木下浩之、中畑克俊、堂城真友子、木本吉紀、畑埜義雄、高濃度ブドウ糖で抑制されたヒト大網動脈のATP感受性カリウムチャネル活性に及ぼすペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体リガンドの効果、第27回日本循環制御医学会総会、2006年5月19-20日、東京都港区

⑰堂城真友子、木下浩之、木本吉紀、中畑克俊、畑埜義雄、温度変化がATP感受性カリウムチャネルを介するラット大動脈の弛緩反応に及ぼす影響、第27回日本循環制御医学会総会、2006年5月19-20日、東京都港区

⑱中畑克俊、木下浩之、堂城真友子、木本吉紀、畑埜義雄、プロポフォールは高濃度グルコースによるラット脳微小血管拡張の抑制作用を改善する、第27回日本循環制御医学会総会、2006年5月19-20日、東京都港区

⑲木下浩之、中畑克俊、木本吉紀、堂城真友子、伊良波浩、畑埜義雄、高濃度ブドウ糖で抑制されたヒト大網動脈のATP感受性カリウムチャネル活性に及ぼすペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体リガンドの効果、日本麻酔科学会第53回大会、2006年6月1-3日、兵庫県神戸市

⑳堂城真友子、木下浩之、平野勇生、濱恵子、畑埜義雄、温度変化がATP感受性カリウムチャネルを介するラット大動脈の弛緩反応に及ぼす影響、日本麻酔科学会第53回大会、2006年6月1-3日、兵庫県神戸市

㉑木本吉紀、木下浩之、堂城真友子、中畑克俊、畑埜義雄、セボフルランはRhoキナーゼ活性化を介するブタ冠動脈収縮を抑制するがプロポフォールは抑制しない、日本麻酔科学会第53回大会、2006年6月1-3日、兵庫県神戸市

㉒中畑克俊、木下浩之、堂城真友子、丹下和晃、畑埜義雄、プロポフォールは高濃度ブドウ糖で抑制されたラット脳微小血管拡張反

応を回復させる日本麻酔科学会第53回大会、
2006年6月1-3日、兵庫県神戸市

㉓木下浩之、中畑克俊、畑埜義雄、アミオダ
ロンがATP感受性カリウムチャンネルを介する
ヒト大網動脈の弛緩反応に及ぼす作用、第32
回日本集中治療医学会学術集会、2005年2
月24-26日、東京都新宿区

㉔木下浩之、中畑克俊、畑埜義雄、高濃度ブ
ドウ糖がATP感受性カリウムチャンネルを介す
るヒト大網動脈弛緩反応に及ぼす作用とPKC
の関与、第32回日本集中治療医学会学術集
会、2005年2月24-26日、東京都新宿区

㉕木本吉紀、木下浩之、堂城真友子、箕西利
之、畑埜義雄、Rho-キナーゼ活性化薬によるブ
タ冠動脈収縮反応に対するセボフルランの抑
制効果、日本麻酔科学会第52回学術集会、
2005年6月2-4日、兵庫県神戸市

㉖堂城真友子、木下浩之、木本吉紀、岩橋静
江、畑埜義雄、ドロペリドールがATP感受性
カリウムチャンネルを介するラット大動脈弛緩
反応に及ぼす作用、日本麻酔科学会第52回学
術集会、兵庫県神戸市、2005年6月2-4日

㉗木下浩之、木本吉紀、畑埜義雄、東俊晴、
伊良波浩、弓削孟文、高濃度ブドウ糖がATP
感受性カリウムチャンネルを介するヒト動脈弛
緩反応に及ぼす作用とスーパーオキシドの関
与、日本麻酔科学会第52回学術集会、2005
年6月2-4日、兵庫県神戸市

㉘中畑克俊、大森亜紀、伊良波浩、木下浩之、
畑埜義雄、前田浩、アルツハイマー治療薬ド
ネペジルによる一酸化窒素合成酵素を介した
ラット脳実質内細動脈拡張反応、日本麻酔科
学会第52回学術集会、2005年6月2-4日、
兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑埜 義雄

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70115913

(2) 研究分担者

木下 浩之

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70291490

水本 一弘

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50239258