

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591800

研究課題名（和文） 高血糖が吸入麻酔薬による心筋保護効果を抑制するメカニズム

研究課題名（英文） The mechanisms for hyperglycemia-induced inhibition of cardioprotection by volatile anesthetics

研究代表者

田中 克哉（TANAKA KATSUYA）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：30263841

研究成果の概要：

吸入麻酔薬は心筋虚血再灌流傷害に対して保護効果を有するが、同時に高血糖状態ではその効果が減弱することを報告してきた。吸入麻酔薬による心筋保護効果の作用機序は Akt の活性化が関与する。インスリンは Akt を活性化するので吸入麻酔薬とインスリンを併用すると高血糖でも心筋保護効果が得られるか実験した。インスリン単独またはインスリンと吸入麻酔薬の併用は高血糖でも心筋梗塞サイズが有意に低下し保護効果を有することがわかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：麻酔学、吸入麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

近年の人口の高齢化及び高血圧症や糖尿病などの生活習慣病の増加は、周術期の虚血性心疾患の発生の危険を急速に増加している。麻酔管理上、周術期の虚血性心疾患の発生の予防と治療は患者の生命予後を大きく左右し、心筋虚血再灌流傷害から心臓を保護する対策は重要である。しかし、糖尿病患者は周術期の虚血性心疾患の発生率が高く、そのメカニズムの詳細は不明である。

1986年Murryらはイヌの心筋虚血再灌流モデルを用いて長時間の心筋虚血再灌流傷害

を与える前に短時間の心筋虚血再灌流を施すと心筋梗塞サイズが明らかに縮小することを報告し、その現象は Ischemic preconditioning (IPC) と呼ばれている。(Murry et al. Circulation 1986;74: 1124-36) 1997年kerstenらは吸入麻酔薬イソフルランを心筋虚血再灌流傷害の前に吸入させると IPC 様の心筋保護効果が認められることを報告した。(kersten JR et al. Anesthesiology 1997;87: 361-70) この好ましい現象は Anesthetic preconditioning (APC) と呼ばれ、その機序は先行虚血による心筋保護作用のそれと類似することが研究

されてきた。

申請者は2001年から2003年にかけて Warltier および kersten 等らと共にイソフルランの心筋保護作用の機序について研究した。

- (1) APCには reactive oxygen species (ROS) 産生と心筋のATP感受性Kチャンネル(KATP)開口が関与する。(Tanaka K, et al. Anesthesiology 2002;97: 1485-90, Tanaka, et al. Anesthesiology 2003;98:935-43, Ludwig LM, et al. Anesth Analg 2004;99:1308-15)
- (2) イソフルランは delayed preconditioning 効果を有する。(Tanaka K, et al. Anesthesiology 2004;100:525-31)
- (3) 吸入麻酔薬をエマルジョン化して静脈内投与すると preconditioning 効果を発揮する。(Chiari PC, et al. Anesthesiology 2004;101:1160-6)
- (4) APCに関する英文総説(Tanaka K, et al. Anesthesiology 2004;100:700-21)

また、APCの作用機序については他の施設からも多くの研究がされていて、さらに近年臨床研究でも冠動脈バイパス術患者に静脈麻酔よりも吸入麻酔で行った方が良好な結果が得られたという報告がでている。(De Hert SG, et al. Anesthesiology 2004;101:299-310)このように吸入麻酔薬による心筋保護効果は基礎実験、動物実験、臨床実験で認められ臨床応用が期待されている。

しかし、ここに大きな問題点が存在する。それは糖尿病や高血糖ではIPCやAPCの効果が得られにくいことである。申請者らはイヌの心筋虚血再灌流モデルを用いて糖尿病イヌやブドウ糖負荷で高血糖にしたイヌはIPCやAPCによる心筋梗塞サイズ減少効果が認められにくいことを報告している。(Tanaka K, et al. Am J physiol Heart Circ Physiol 2002;282:H2018-23)これは、心筋虚血のリスクの高い糖尿病、高血糖患者に、よりAPCの心筋保護効果を期待したいのに実際にはその逆という残念な結果になっている。もし、糖尿病、高血糖状態でAPCが作用しにくい理由が判明し、その原因を取り除くことができればAPCの心筋保護効果を糖尿病患者でも得られる可能性が出てくる。

2. 研究の目的

申請者らは以下の2つの仮説をたてた。

- (1) 高血糖状態ではイソフルランによるKATPチャンネル活性化が阻害され、生理的状态でもPI3K阻害薬ワートマニンの投与でイソフルランによるKATPチャンネル活性化が阻害される。
- (2) 高血糖ウサギではイソフルランの先

行投与による心筋保護作用を棄却するが、再灌流早期にインスリン投与すればAktが活性化し心筋保護効果が認められる。

これらの仮説を検証するため以下の2点に焦点をあてて研究を行った。

- (1) パッチクランプ法を用いてイソフルランが心筋および血管平滑筋のKATPチャンネルに及ぼす影響について高血糖状態、ワートマニン投与でどのように変化するか測定し評価する。
- (2) ウサギの心筋虚血再灌流モデルを用いて対照群、イソフルラン群、イソフルラン+インスリン群、インスリン群で心筋梗塞サイズを生理的状态、高血糖状態で測定する。またそれぞれの群で心筋組織でのリン酸化したAktをウエスタンブロット法を用いて測定し、再灌流早期のインスリン投与で誘発されるAkt活性化と心筋保護効果の関連について評価する。

3. 研究の方法

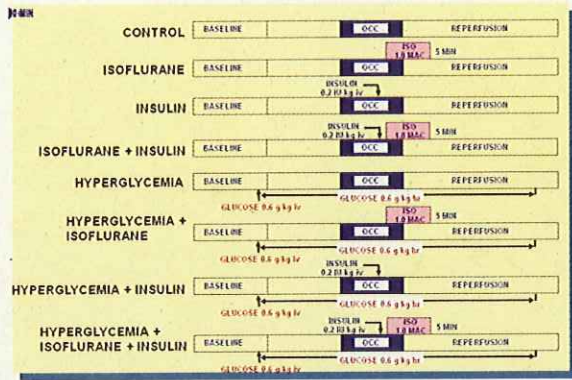
(1) 高血糖がイソフルランによるKATPチャンネル活性化を障害する作用機序について

ラットの大動脈の血管平滑筋細胞を採取し、正常D-グルコース(NG)、高血糖D-グルコース(HG)、高血糖L-グルコース(LG)の3種類の培養液で24時間培養した。その後、パッチクランプ法で血管平滑筋細胞のKATP電流を測定した。0.5mMイソフルランを投与し3群間でのチャンネル開口を測定した。次にProtein kinase C (PKC)の拮抗薬であるcalphostin CおよびPKC inhibitor 20-28を前処置しておくことでチャンネル開口がどのように変化するか確認した。さらにPKCを活性化するPMAを投与しチャンネル開口の変化を記録した。活性酸素を定量化して活性酸素除去酵素を投与しておくことでチャンネル開口に影響があるか観察した。

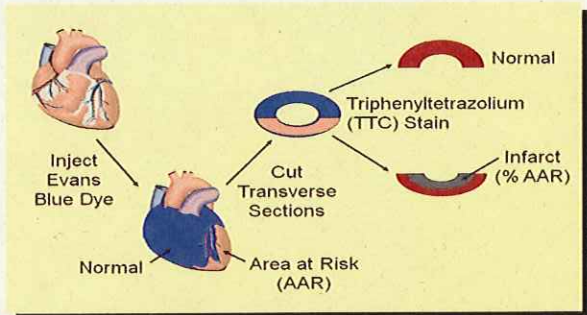
(2) インスリンとイソフルランによるポストコンディショニングは高血糖状態でも心筋保護効果を有するか?

ウサギの心筋虚血再灌流モデルで対照群、イソフルラン群、インスリン群、イソフルラン+インスリン群の4つの群を正常血糖状態、高血糖状態で心筋梗塞サイズを測定した。プロトコールを図1に示す。図1

すべての実験で30分の心筋虚血と3時間の再灌流を行い、TTC染色法で心筋梗塞サイズを測定した。(図2)



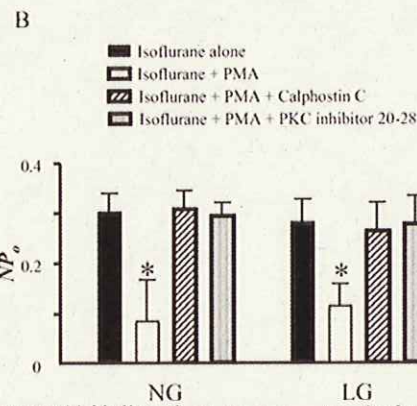
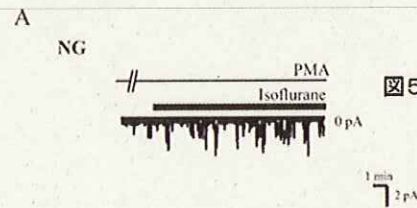
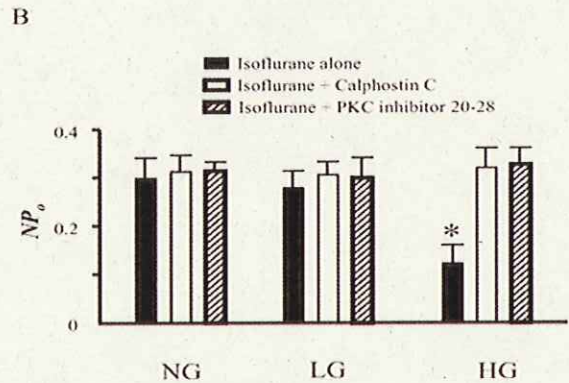
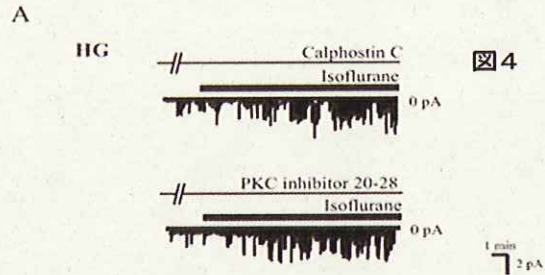
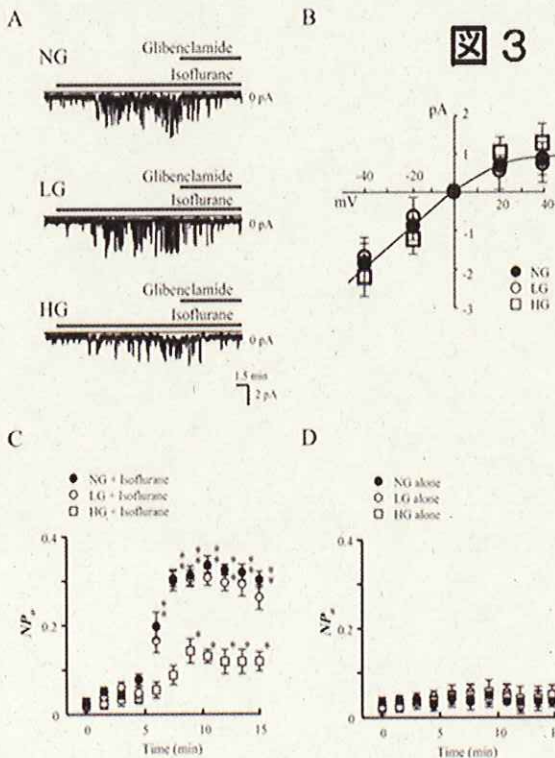
DETERMINATION OF MYOCARDIAL INFARCT SIZE



同様の実験プロトコルで再灌流5分後に心臓を取り出し冷凍保存し、後日リン酸化Aktを測定した。

4. 研究成果

(1) 高血糖がイソフルランによる KATP チャンネル活性化を障害する作用機序について
0.5mM イソフルランによって NG 群、LG 群では KATP チャンネルは開口したが、HG 群では開口が有意に抑制された。(図3)

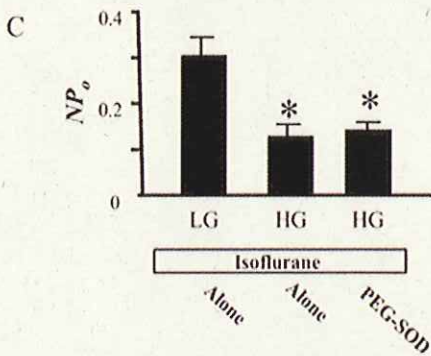
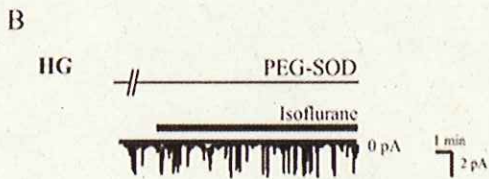
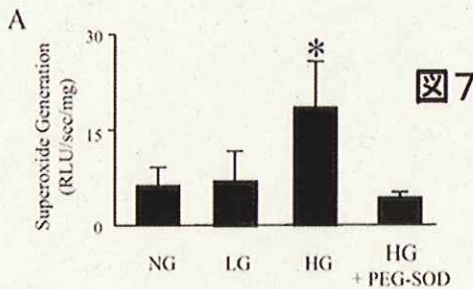
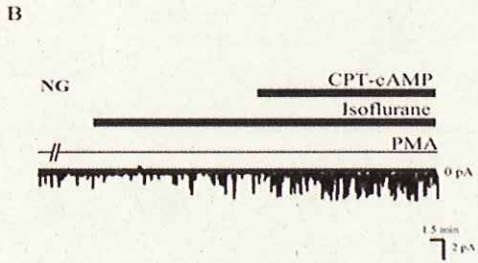
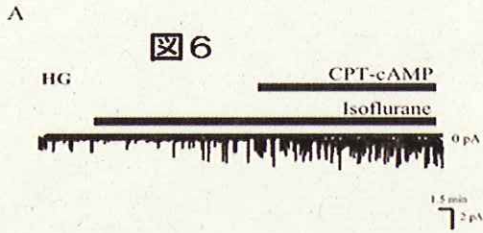


PKC 拮抗薬である Calphostin および PKC inhibitor 20-28 の前処置によって HG で抑制されるイソフルラン誘発性 KATP チャンネル活性化が減少し、チャンネルは開口した。(図4)

PKC を活性化する PMA は NG および LG 群で HG と同様の作用を示した。(図5)

HG または NG+PMA で抑制された KATP チャンネル活性は PKA 活性化薬 CPT-cAMP の投与で開口する。(図6)

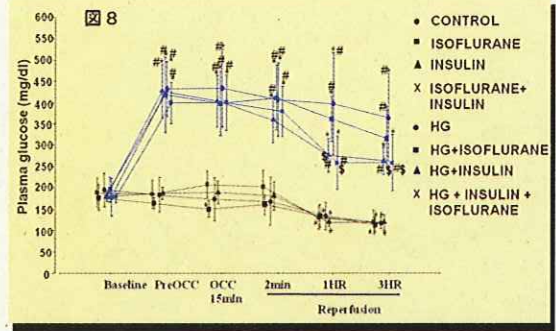
HG は有意に ROS を産生したが、ROS スカベンジャーで HG による KATP チャンネル活性の抑制は変化しなかった。(図7)



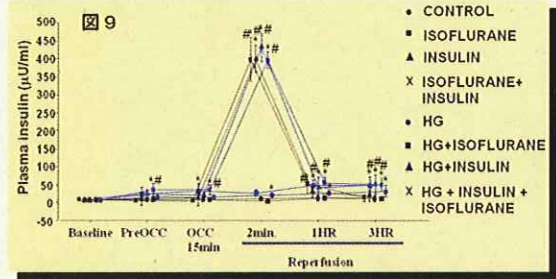
まとめ：高血糖では PKC の過剰活性化を介してイソフルランによる血管の KATP チャネル活性化を抑制する。

(2) インスリンとイソフルランによるポストコンディショニングは高血糖状態でも心筋保護効果を有するか？

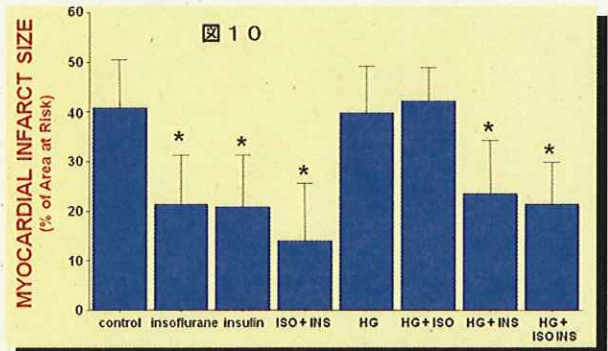
ウサギの心筋梗塞サイズの実験で血行動態は心筋虚血後に血圧、心拍数は減少したが、各群に有意な差はなかった。血糖値は高血糖群ではおおよそ 300mg/dl 以上を保っていた。



Changes in plasma glucose concentration during experiments. *p<0.05 versus baseline, #p<0.05 versus CONTROL, \$p<0.05 versus HG. HG = hyperglycemia.



Changes in plasma insulin concentration during experiments. *p<0.05 versus baseline, #p<0.05 versus CONTROL. HG = hyperglycemia. OCC = occlusion.



Myocardial infarct size expressed as a percentage of left ventricular area at risk. ISO = isoflurane; INS = insulin; HG = hyperglycemia. *p<0.05 versus CONTROL.

(図 8)

インスリン値は高血糖群では徐々に増加した。インスリン群では再灌流 2 分後に極端に高い値を示し、急速に低下した。(図 9)

心筋梗塞サイズは正常血糖状態ではイソフルラン、インスリン、イソフルラン+インスリンによるポストコンディショニングで減少したが、高血糖状態ではインスリン、イソフルラン+インスリン群で心筋保護効果が認められた。(図 10)

Akt のリン酸化は現在のところ各群に有意差を認めていない。(n=3) 実験を継続中である。

まとめ：高血糖状態ではイソフルランのポストコンディショニングによる心筋保護効果は認められなかった。インスリン単独およびイソフルランとインスリンによるポストコンディショニングは高血糖状態でも心筋保

護効果を有した。高血糖状態でも Akt シグナルの活性化を行えば臨床的にも心筋保護効果を得られる可能性があることが示唆された。

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 1 件)

Kawano T, Tanaka K, Mawatari K, Oshita S, Takahashi A, Nakaya Y: Hyperglycemia impairs isoflurane-induced adenosine triphosphate sensitive potassium channel activation in vascular smooth muscle cells. Anesth Analg 2008;106:858-64 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

Okada T, Tanaka K, Tomino T, Kawano H, Oshita S: Hyperglycemia blocks isoflurane-induced, but not insulin-induced, postconditioning in vivo rabbits. 2009 American Society of Anesthesiologists 2008/10/19 (Oral session) Orlando FL, USA

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 克哉 (TANAKA KATSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：30263841

(2) 研究分担者

大下 修造 (OSHITA SHUZO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研

究部・教授

研究者番号：60144945

河野 崇 (KAWANO TAKASHI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：40380076

(3) 連携研究者

なし