

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09417

研究課題名(和文) 3受容体作動薬の心筋虚血再灌流に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of beta3 adrenergic receptor agonist on Myocardial Ischemia and Reperfusion

研究代表者

黒子 洋介 (Kuroko, Yosuke)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20459184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：3アドレナリン受容体作動薬にNO系を介した心筋保護作用があると報告されており、そのメカニズムの解明を心臓マイクロダイアリス法を用いて行った。ラット心筋にマイクロダイアリスプローブを埋め込み、冠動脈をスネアして心筋の虚血再灌流を行い透析液中のミオグロビン濃度を測定した。透析液中のミオグロビン濃度は虚血時に軽度上昇、再灌流時に著明に上昇した。次に3アドレナリン受容体作動薬であるミラベグロンを局所投与しミオグロビンの反応を確認した。主に社会的事情(COVID-19感染の影響)からまだ十分なデータが集まっておらず実験は継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、3アドレナリン受容体の役割や心筋保護効果のメカニズムを解き明かすことができれば、3アドレナリン受容体を介した心筋虚血・再灌流障害に対する新たな薬物治療法の開発に繋がり、急性心筋梗塞患者の生命予後の改善や心筋梗塞後の心不全による再入院を減らすことが期待出来ると考えている。

研究成果の概要(英文)：Beta3 adrenergic receptor agonist has been documented to exert cardioprotective effects via endothelial NO synthase. We investigated these effects employing the cardiac microdialysis technique. We quantified dialysate myoglobin levels in anesthetized rats during myocardial ischemia and reperfusion. The dialysate myoglobin levels exhibited a slight increase during myocardial ischemia and a significant surge during myocardial reperfusion. Subsequently, we measured dialysate myoglobin levels with local administration of Mirabegron (a beta3 adrenergic receptor agonist) via a microdialysis probe. Due to societal issues (the coronavirus pandemic), data are not yet fully available. This study is ongoing.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心臓マイクロダイアリス 3受容体作動薬 心筋虚血再灌流障害

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は我が国の三大死因の一つであり、その患者数は80万人を超えている。虚血心筋に対して速やかに再灌流を行うことは予後の改善に必須であるが、再灌流を行うこと自体も心筋に障害を引き起こす。近年、アドレナリン受容体の一つである $\beta_3$ アドレナリン受容体への刺激が心筋虚血・再灌流障害に対して保護的に作用するという報告がある。 $\beta_3$ アドレナリン受容体刺激は、NOを介して心筋保護作用を発揮すると報告されているが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。我々は心臓マイクロダイアリシス法を用いて、*in vivo*で虚血・再灌流領域における心筋間質のカテコラミンやミオグロビンなどの動態を明らかにすることで、心筋虚血・再灌流障害のメカニズムを解明してきた。そこで本研究においては、 $\beta_3$ アドレナリン受容体が心筋虚血・再灌流障害においてどのような役割を担うのかを、心臓マイクロダイアリシス法を用いて解明する。

## 2. 研究の目的

心臓においては、 $\beta_1$ アドレナリン受容体が広く分布しており、心筋収縮力の増大に関与していることが古くから知られている。一方で、 $\beta_3$ アドレナリン受容体は、消化管、脂肪細胞、骨格筋などに存在することが知られていたが、近年、心臓（およびシナプス後膜）にも $\beta_3$ アドレナリン受容体が存在することが知られるようになった。 $\beta_3$ アドレナリン受容体は、高濃度のカテコラミンにより活性化することが分かっており、虚血時の非開口性カテコラミン放出は、 $\beta_3$ アドレナリン受容体を刺激し、虚血・再灌流時の心筋障害に影響を及ぼすことが予想される。そこで、本研究においては、心臓マイクロダイアリシス法を用いて、心筋虚血・再灌流時の虚血（再灌流）心筋においてカテコラミンやミオグロビンをモニターすることにより、心筋虚血・再灌流障害における $\beta_3$ アドレナリン受容体の役割を検証する。

## 3. 研究の方法

### 心臓マイクロダイアリシス法概要

本研究の基盤となる技術は、マイクロダイアリシス法（微小透析法）であり、我々は、世界に先駆けて本法を心臓に導入し、研究を進めてきた（Akiyama et al. Am J Physiol. 1991; 261: H1643-7.）。マイクロダイアリシス法は、中空糸膜ファイバーを用いて作製されたマイクロダイアリシス・プローブを組織中に埋め込んで、灌流液で灌流することにより、灌流液と組織間質の物質の濃度勾配を用いて、透析液中に物質を単純拡散にて回収してくる方法である（図1）。また本法では、灌流液を介して薬物を局所に投与することが可能であり、血流のない虚血心筋へ直接、薬剤を投与する唯一の方法である。

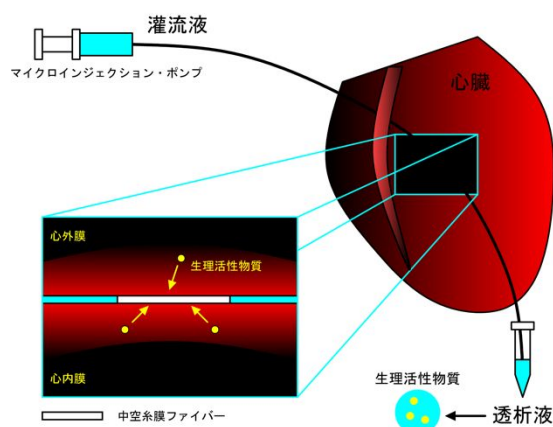


図1 マイクロダイアリシス法

### (1) 心筋虚血・再灌流障害における $\beta_3$ アドレナリン受容体の役割の解明

心筋虚血・再灌流時の心筋障害の指標となる心筋間質へのカテコラミンおよびミオグロビン放

出に対する  $\beta_3$  アドレナリン受容体の役割を、マイクロダイアリス法を用いて検討する。

ラットをイソフルランによる麻酔下にて開胸し、心臓を露出させて冠動脈(左前下行枝)を確認する。冠動脈にスネアをかけた後、虚血範囲を確認し、虚血領域心筋にダイアリス・プローブを埋め込む。プローブを  $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬であるミラベグロンを含む灌流液で灌流し、冠動脈をスネアして30分間虚血を誘発し、その後、冠動脈のスネアを解除し、30分間再灌流を行い、虚血・再灌流中15分間隔で透析液をサンプリングする。透析液中のカテコラミン濃度を、高速液体クロマトグラフィ(エイコム社製 HETC-500)を用いて、透析液中のミオグロビン濃度をコバス h 232(ロシュ社製)にて測定し、 $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬の局所投与により心筋虚血・再灌流障害を抑制できるかを検討する。

また、 $\beta_3$  アドレナリン受容体阻害薬を前投与することにより、 $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬による心筋保護作用が減弱・消失するかを確認する。

## (2) $\beta_3$ アドレナリン受容体を介した心筋保護メカニズムの解明

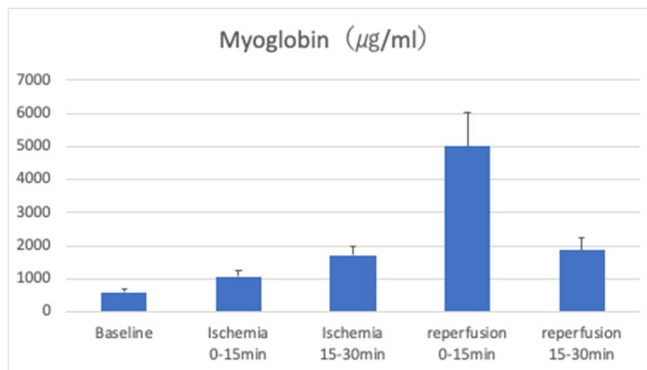
$\beta_3$  アドレナリン受容体を介した心臓保護作用には、NOが関与していることが報告されていることから、 $\beta_3$  アドレナリン受容体とNOとの関連を検証する。麻酔下のラットにおいて、冠動脈左前下行枝領域の30分虚血、30分再灌流を行う。虚血領域心筋に植え込んだマイクロダイアリス・プローブを、 $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬(ミラベグロン)に加えて、L-NAMEなどのNO合成阻害薬を含む灌流液で灌流し、心筋虚血・再灌流中の透析液をサンプリングする。透析液中のカテコラミン(エピネフリン、ノルエピネフリン)およびミオグロビン濃度を計測し、NO合成阻害により $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬による心筋保護効果が減弱・消失するかを検討する。

$\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬がチラミンによる神経終末からのノルエピネフリン分泌を抑制させることが示唆されていることから、同様にマイクロダイアリス法を用いて検証する。麻酔下のラットにおいて、左室心筋に植え込んだマイクロダイアリス・プローブを、チラミンを含む灌流液で灌流することで、プローブを介して心筋局所にチラミンを投与する。透析液をサンプリングして、透析液中のノルエピネフリン濃度を計測する。 $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬(ミラベグロン)をチラミンと共投与することで、ノルエピネフリン分泌が抑制されるかを検証する。

$\beta_3$  アドレナリン受容体が、神経終末におけるノルエピネフリンの再取り込みに及ぼす影響を検討する。麻酔下のラットにおいて、左室心筋に植え込んだマイクロダイアリス・プローブを、デシプラミンを含む灌流液で灌流することで、プローブを介して心筋局所にデシプラミンを投与する。透析液をサンプリングして、透析液中のノルエピネフリン濃度を計測する。 $\beta_3$  アドレナリン受容体作動薬(ミラベグロン)をデシプラミンと共投与することで、ノルエピネフリン再取り込みに影響を及ぼすかを検証する。

## 4. 研究成果

ラット9匹の透析液中のミオグロビン測定結果を提示する。透析液中のミオグロビン濃度はベースラインでは $587 \pm 87 \mu\text{g/ml}$ であるが、虚血により軽度上昇し、虚血15-30分で $1717 \pm 244 \mu\text{g/ml}$ となった。その後の再還流では0-15分で $5003 \pm 1011 \mu\text{g/ml}$ とベースラインから有意差を持って著明に上昇が見られた。再還流15-30分では $1865 \pm 391 \mu\text{g/ml}$ と速やかに低下した。グラフを下図に示す。



虚血再灌流時のカテコラミンの役割を調べるために、透析液中のエピネフリン・ノルエピネフリンを高速液体クロマトグラフィーで測定したが、想定した数値が得られず、実験は一旦中断した。次に $\beta_3$ アドレナリン受容体作動薬としてミラベグロンの局所投与を行い、心筋の虚血・再灌流中の透析液中のミオグロビン濃度の測定を行った。しかし主に社会的背景（COVID-19感染の流行）から実験がなかなか進められずデータが集められなかった。同じ理由によりその後予定していた実験もまだデータ取得できていない。

近年になって、心筋虚血・再灌流障害において $\beta_3$ アドレナリン受容体刺激が、NOを介して心保護作用をもたらすとの報告がなされている。Aragónらは、 $\beta_3$ アドレナリン受容体を刺激することにより、血管内皮由来（eNOS）および神経由来（nNOS）NO生成が促進され、梗塞サイズを縮小すると報告している（J Am Coll Cardiol. 2011;58:2683-91.）

また、Bergらは、 $\beta_3$ アドレナリン受容体作動薬が、チラミン投与による血中ノルエピネフリン濃度の上昇を抑制することを報告している（Front Physiol. 2015;5:499.）このことから、 $\beta_3$ アドレナリン受容体作動薬は、心筋虚血時の非開口性ノルエピネフリン放出を抑制できる可能性があることが示唆されている。

一方で、これらの研究は、虚血・再灌流領域心筋の障害（またはその指標）を直接評価したわけではないため、 $\beta_3$ アドレナリン受容体刺激がどのようなメカニズムで虚血心筋に対して心筋保護効果を発揮するかについては十分には明らかでない。

我々の持っている心臓マイクロダイアリスの技術は、虚血・再灌流領域の心筋間質でのカテコラミンやミオグロビンなどの生理活性物質の動態をin vivoでモニターできる唯一の方法であり、心筋虚血・再灌流障害における $\beta_3$ アドレナリン受容体の役割と心筋保護のメカニズムを解き明かす上で、非常に有用な手段である。

本研究において、 $\beta_3$ アドレナリン受容体の役割や心筋保護効果のメカニズムを解き明かすことができれば、 $\beta_3$ アドレナリン受容体を介した心筋虚血・再灌流障害に対する新たな薬物治療法の開発に繋がり、急性心筋梗塞患者の生命予後の改善や心筋梗塞後の心不全による再入院を減らすことが期待出来ると考えている。

## まとめ

$\beta_3$ アドレナリン受容体作動薬の心筋の虚血再灌流障害における心筋保護作用への効果とそのメカニズムの解明を、心臓マイクロダイアリス法を用いて行った。まだ実験は途中であり、今後引き続いてデータの収集を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 秀二  (Shimizu Shuji)  (80443498)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長   (84404)	
研究分担者	笠原 真悟  (Kasahara Shingo)  (90233692)	岡山大学学術研究院医歯薬学域・心臓血管外科・教授   (15301)	
研究分担者	小谷 恭弘  (Kotani Yasuhiro)  (90534678)	岡山大学学術研究院医歯薬学域・心臓血管外科・准教授   (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関