

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890037

研究課題名（和文） ポストコンディショニングの細胞内シグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文） Role of mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in postconditioning

研究代表者

西田 洋文 (NISHIDA HIROFUMI)

千葉大学・大学院医学研究院・薬理学・助教

研究者番号：80513043

研究成果の概要（和文）：虚血心筋保護においてミトコンドリア内膜に存在する ATP 感受性 K<sup>+</sup>(mitoK<sub>ATP</sub>) チャンネルと再灌流障害 salvage kinase と呼ばれる PI3-kinase (PI3K) が重要な役割を担っている。本研究では、PI3K を活性化する食欲増進ペプチド、グレリンを用いて薬理的なポストコンディショニングにおける mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル開口と PI3K 活性化がクロストークではなく独立して生じ、dual mode で心筋保護のメカニズムとして働いていることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> (mitoK<sub>ATP</sub>) channel in cardiac myocytes and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) which is one of the pro-survival kinases play key roles in cardioprotection. This study clarified that PI3K is not linked to mitoK<sub>ATP</sub> channels although ghrelin treatment at reperfusion reduces infarct size via both mitoK<sub>ATP</sub> channel activation and a PI3K-mediated pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 薬理学一般

キーワード：ミトコンドリア、ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャンネル、ポストコンディショニング、PI3 キナーゼ、グレリン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血プレコンディショニングとは、短時間の虚血負荷や薬物投与によって、引き続き長時間の虚血・再灌流に伴う心筋傷害が軽減する現象である。我々の研究室では心筋プ

レコンディショニング成立において、心筋細胞のミトコンドリア内膜に存在する ATP 感受性 K<sup>+</sup> (mitoK<sub>ATP</sub>) チャンネルが中心的な役割を果たしていることを報告してきた。加えて、これらのミトコンドリア K<sup>+</sup>チャンネルを介して心

筋保護作用を発揮する、薬理的プレコンディショニング効果をもつ薬物をいくつか同定してきた (Cardiovasc Res, 2008; J Pharmacol Exp Ther, 2008; Diabetes Metab Res Rev, 2006)。

(2) しかしながらプレコンディショニングは心臓手術など待機的に治療を行える際には有用ではあるが、通常の急性心筋梗塞ではその発症の時期があらかじめ予測できないため、その臨床的応用が限られることが問題となる。

(3) Vinten-Johansen らのグループより致死的心筋虚血の再灌流初期にプレコンディショニングと同様の短時間虚血を繰り返すことで心筋傷害の軽減が認められたとの報告がなされ (Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003)、この治療戦略をポストコンディショニングと呼んでいる。本邦では急性心筋梗塞に対する血栓溶解療法や経皮的冠動脈形成術といった再灌流療法が広く臨床的に実施されていることから、再灌流の時間が明確化すると共に臨床医のコントロール下におくこともでき、その意味ではポストコンディショニングはより臨床的に応用可能な重要な治療戦略といえる。

(4) ポストコンディショニングの成立機構に関して研究が進められ、再灌流障害 salvage kinase とも呼ばれる phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) (Circ Res, 2004) や  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャネルの関与が提唱されている (Anesth Analg, 2005)。しかし、PI3K/Akt 系や  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャネルとの関連性など、その細胞内シグナル伝達機構の詳細は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャネルと PI3K のクロストークに着目して、ポストコンディショニングから心筋保護へいたる細胞内シグナル伝達機構を解明することを目的とした。

(2) そこでその受容体が Gq 蛋白共役型であり、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャネルの活性化に関与するプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化する内因性ペプチド ghrelin を用いて、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャネル開口が薬理的ポストコンディショニングに与える影響と実際の心筋保護効果について、それぞれフラボプロテイン自家蛍光測定、ウサギ Langendorff 灌流心を用いた虚血・再灌流モデルでの心筋梗塞サイズ測定によって検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) フラボプロテイン自家蛍光反応

①ウサギの心室筋細胞をコラゲナーゼ処理により単離した後、培養液に保存して実験に供した。ミトコンドリアの酸化還元状態を安定させるため、単離した心室筋細胞を培養液 (5%ウシ血清を含む DMEM) に少なくとも 3 時間以上保存した。

② $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$  チャネル活性化の指標としてフラボプロテイン自家発光を測定した。チャネルの開口により  $\text{K}^+$  が細胞質からマトリックスへ流入すると、呼吸鎖における  $\text{H}^+$  の排出が促進されるためフラボプロテインの酸化反応が亢進して蛍光が増強する。このときのフラボプロテイン自家蛍光を励起波長 480 nm、測光波長 530 nm にて測定した。

③心室筋細胞を蛍光顕微鏡ステージに置いたチャンバーに載せ、glucose を含まない HEPES Tyrode 液にて灌流し、ghrelin の蛍光反応を観察した。

④蛍光強度はミトコンドリア内を完全に酸化する脱共役剤である 2,4-dinitrophenol (DNP、100  $\mu\text{M}$ ) を実験終了時に添加して、最大酸化反応を起こした時のフラボプロテイン自家蛍光を 100% とした相対値で表示した。

⑤ $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$  チャネルの開口薬として diazoxide (100  $\mu\text{M}$ )、遮断薬として 5-hydroxydecanoate (5HD、500  $\mu\text{M}$ )、PI3K 阻害薬として LY294002 (5  $\mu\text{M}$ )、ghrelin 受容体アンタゴニストとして [D-Lys-3]-GHRP-6 (GHRP6、10  $\mu\text{M}$ ) を使用した。

### (2) ウサギ Langendorff 心における虚血・再灌流モデル

①ウサギに耳介静脈より pentobarbital 30mg/kg 投与し、心臓を摘出した。

②摘出心を Langendorff 装置に懸架し、大動脈に挿入したカニューレより冠動脈へ Krebs-Henseleit 液を 25-30ml/min の流量で灌流した。灌流圧は 40mmHg 以上に設定した。

③心機能評価のため、左房経路でカテーテル付きバルーンを左室内に挿入し左室内圧を測定し、得られた左室内圧波形より心拍数・左室駆出圧 (LVDP)・最大収縮力 ( $+dP/dt_{\text{max}}$ ) を算出した。

④図 1 のようなプロトコルで、30 分虚血 120 分再灌流を行なった。薬剤を投与しない Control 群、虚血後の再灌流早期に 10 分間 ghrelin (0.3、1、3 nM) を投与した群、ghrelin と同時に  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャネル遮断薬 5HD を投与した群、同様に PKC 阻害薬 cherythrine (CHE、1  $\mu\text{M}$ ) 投与群、PI3K 阻害薬 LY294002 を投与した群に分けて検討した。

⑤再灌流後の心臓を 6-7 切片に横断面で切断し、1%の 2,3,5-Triphenyl tetrazolium

chloride 溶液で染色した。染色後各切片の赤く染色しなかった部分の面積を梗塞面積とし、総面積との割合を算出した。この梗塞面積比に各切片の重量を掛けて梗塞重量とし、心臓全体の重量に対する梗塞重量の割合 (%) を算出した。

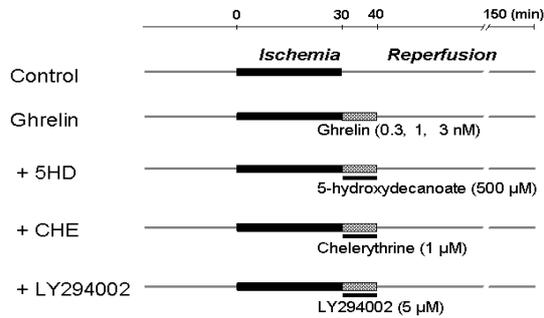


図1 実験プロトコール

### (3) 統計処理

データは平均値±標準誤差で表示してある。有意差の検定はANOVA (Fisher's post hoc test) を用いて、 $P < 0.05$  を有意差ありとみなした。

## 4. 研究成果

### (1) フラボプロテイン自家蛍光測定

図 2A, B に示すように ghrelin 単独では 10 nM まで自家蛍光反応の増強を認めることはなかった (1 nM;  $2.8 \pm 1.2\%$ , 10 nM;  $3.5 \pm 1.2\%$ , それぞれ  $n = 5$ )。しかし図 2C, D に示すように  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャンネル開口薬である diazoxide ( $100 \mu\text{M}$ ) を作用させるとフラボプロテイン蛍光が増強し ( $28.5 \pm 3.4\%$ ,  $n = 6$ )、この diazoxide 存在下に ghrelin (1 nM) を作用させると、さらに有意な蛍光増強を認めた ( $40.6 \pm 3.2\%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ )。この ghrelin による diazoxide のフラボプロテイン酸化反応の増強効果は、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャンネル遮断薬である 5HD によって完全に阻害された ( $5.3 \pm 1.1\%$ ,  $n = 6$ , 図 2D)。

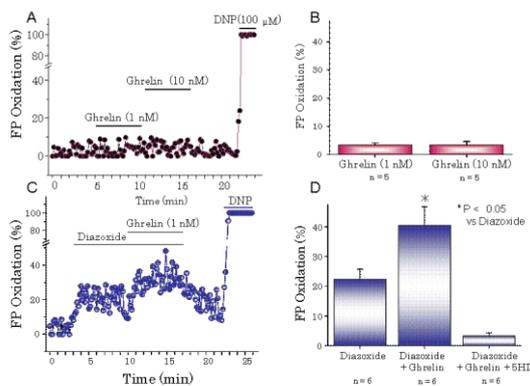


図2 Ghrelinのフラボプロテイン自家蛍光反応に対する影響

これらの結果より ghrelin が受容体を介して  $\text{PKC}$  を活性化し  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャンネル開口を増強したと示唆されたので、つづいて ghrelin 受容体アンタゴニスト GHRP6 存在下で同様の実験を行った。Ghrelin の diazoxide によるフラボプロテイン酸化を増強する反応は GHRP6 存在下では認められなかった ( $25.3 \pm 3.1\%$ ,  $n = 6$ , 図 3A, B)。また  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャンネルと  $\text{PI3K}$  のクロストークを確認するため  $\text{PI3K}$  阻害剤である LY29402 存在下で同様の実験を行ったところ、ghrelin の増強反応は妨げられなかった ( $36.2 \pm 4.7\%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ , 図 3C, D)。

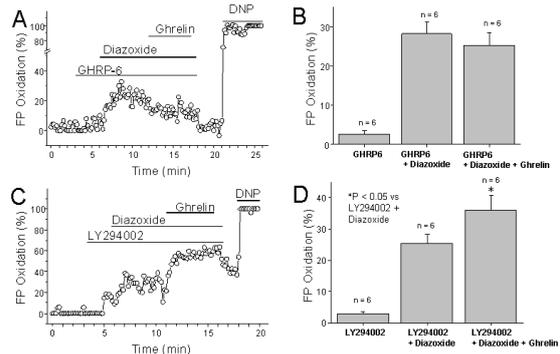


図3 受容体アンタゴニスト及びPI3K阻害剤存在下でのGhrelinの影響

以上より、ghrelin は受容体- $\text{PKC}$  システムにより  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  チャンネルの開口を増強し、 $\text{PI3K}$  とはリンクしていないことが確認された。

### (2) 虚血・再灌流心モデル

#### ①梗塞サイズ

図 4 に示すように、ghrelin の虚血後 10 分間適用により梗塞サイズは濃度依存性に減少し (0.3 nM;  $60.7 \pm 3.9\%$ , 1 nM;  $52.9 \pm 3.3\%$ , 3 nM;  $44.2 \pm 2.7\%$ , それぞれ  $n = 6$ ) となり、1 nM 以上の濃度で control 群の  $68.7 \pm 1.8\%$  ( $n = 6$ ) に比して有意に減少した。そしてその梗塞サイズ減少効果は、 $\text{MitoK}_{\text{ATP}}$  チャンネル遮断薬である 5HD ( $69.3 \pm 4.0\%$ ,  $n = 6$ ) や、 $\text{PKC}$  阻害薬である chelerythrine ( $66.3 \pm 3.1\%$ ,  $n = 6$ ) また、 $\text{PKC}$  阻害剤 LY294002 でも完全に抑制された ( $66.6 \pm 3.3\%$ ,  $n = 6$ )。

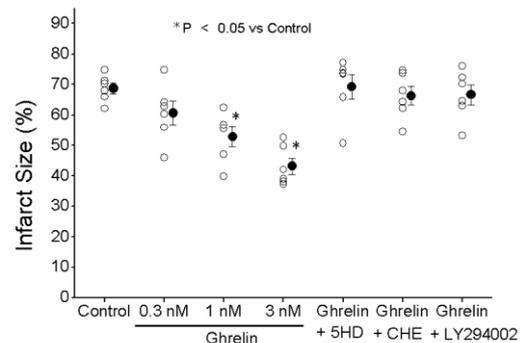


図4 心筋梗塞サイズ縮小効果

以上のことから、ghrelin の心筋梗塞サイズ減少効果に、PKC 経路を介した mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの開口と PI3K 経路の両方が関与していることが示唆された。

## ② 左室内圧機能解析

薬剤適用前の左室駆出圧 (LVDP) および心拍数、最大収縮力 (+dP/dt<sub>max</sub>) は各群で有意差はなかった (表 1 参照)。再灌流 2 時間後の各パラメーターでは control 群に比して ghrelin 群では有意に LVDP および+dP/dt<sub>max</sub> の改善を認めた。この ghrelin による機能改善効果は 5HD、chelerythrine、LY294002 投与により完全に打ち消された (表 1)。

以上のことから、機能面においても ghrelin は虚血再灌流障害に対して保護的に働くことが示唆された。

表1 虚血再灌流時の左室機能変化

Study Groups	n	Before Ischemia			After Reperfusion		
		Heart Rate beats/min	LVDP mmHg	+dP/dt <sub>max</sub> mmHg/s	Heart Rate beats/min	LVDP mmHg	+dP/dt <sub>max</sub> mmHg/s
Control	6	167 ± 3	95 ± 4	1764 ± 97	175 ± 17	31 ± 3	709 ± 65
Ghrelin (0.3 nM)	6	159 ± 4	99 ± 5	1805 ± 113	149 ± 8	39 ± 4	874 ± 99
Ghrelin (1 nM)	6	170 ± 9	94 ± 4	1803 ± 95	179 ± 9	47 ± 7*	972 ± 197
Ghrelin (3 nM)	6	179 ± 8	84 ± 3	1831 ± 111	175 ± 17	48 ± 3*	1144 ± 91*
Ghrelin + 5HD	6	182 ± 8	96 ± 4	1988 ± 73	186 ± 11	36 ± 6	805 ± 141
Ghrelin + CHE	6	177 ± 7	93 ± 2	1936 ± 105	186 ± 9	36 ± 8	904 ± 127
Ghrelin + LY294002	6	183 ± 6	95 ± 4	1975 ± 126	225 ± 16	33 ± 6	763 ± 133

Values are mean ± S.E.M. \*P < 0.05 vs Control  
5HD: 5-hydroxydecanoate, CHE: chelerythrine,  
LVDP: left ventricular developed pressure, +dP/dt<sub>max</sub>: rate of contraction.

## (3) 考察

今回フラボプロテイン自家蛍光反応の検討において ghrelin は diazoxide によるフラボプロテイン酸化反応を増強した。さらに ghrelin の効果は mitoK<sub>ATP</sub> 遮断薬である 5HD によって抑制された。またウサギ Langendorff 灌流心における虚血・再灌流モデルにおいては ghrelin が心筋梗塞サイズを減少させ、その効果が 5HD と PKC 阻害薬である chelerythrine によって抑制された。これらの結果は ghrelin が受容体を介した PKC 活性化と、それによる mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル活性化により薬理的ポストコンディショニングを発揮していることを示唆している。しかしながら、LY294002 により ghrelin の mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル活性化増強は抑制されないにもかかわらず、虚血再灌流モデルで ghrelin の心筋梗塞縮小効果を LY294002 は抑制した。このことは mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル開口と PI3K 活性化がクロストークではなく独立して生じ、dual mode で心筋保護のメカニズムとして働いていることを示唆している。

MitoK<sub>ATP</sub> チャンネルはミトコンドリア内膜電位を脱分極させ、Ca<sup>2+</sup> の driving force を減少させるのでミトコンドリア内 Ca<sup>2+</sup> 過負荷を抑制して心筋保護作用を発揮すると考えら

れている。今回の実験で ghrelin によって mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルが活性化され心筋保護作用をもたらす、しかも再灌流早期の投与で虚血ポストコンディショニングと同様の効果を発揮することが示された。これらの事実はポストコンディショニングの細胞内シグナルにミトコンドリア K<sup>+</sup> チャンネルが関与していることを示唆し非常に興味深い。残念ながら、もう一つの K<sup>+</sup> チャンネルである Ca<sup>2+</sup> 活性化 K<sup>+</sup> チャンネルに対する評価を今回は行わなかったが、同様の心筋保護機序であることからさらなる検討の必要を感じる。

最近 mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルや PI3K の下流にある共通の end effector として、アポトーシスに関与するミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP) の存在も注目されており (Cardiovasc Res, 2007)、今回は検討できなかったがポストコンディショニングの成立機構としての可能性が示唆されている。それゆえ今回の結果と合わせると ghrelin の心筋保護機構は図 5 のように考えられる。

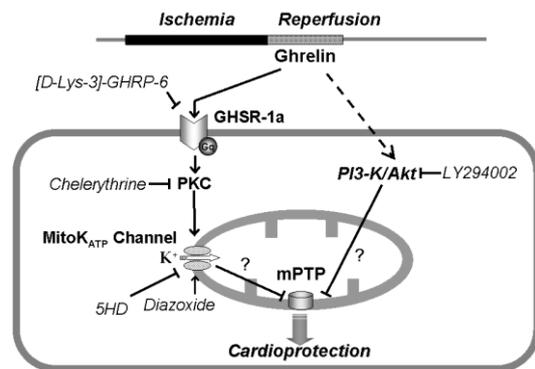


図5 Ghrelinの心筋保護機構(ポストコンディショニング)

虚血性心疾患に対して経皮的冠動脈形成による再灌流療法が主流になっており、その後の虚血性心筋症による慢性心不全が問題となっている本邦では特に、ポストコンディショニングという治療戦略は重要なオプションとなりうる。また今回の実験で用いた ghrelin は再灌流早期の投与でも梗塞サイズを減少させる効果があることが判明したので虚血性心筋症を減らせる可能性を秘めている。それゆえ、今回の実験結果を踏まえ、ポストコンディショニングの成立機構に対して臨床的な立場からもさらなる検討が必要になるであろう。

## 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 3 件)

- ① Nishida H., Sato T, Nomura M, Miyazaki M, Nakaya H. Glimepiride treatment upon reperfusion limits infarct size via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rabbit hearts. J Pharmacol Sci 査読有、2009 Feb; 109(2): 251-6.
- ② Nishida H., Sato T, Ogura T, Nakaya H. New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: mitochondrial ion channels and cardioprotection. J Pharmacol Sci. 査読有、2009 Mar; 109(3): 341-7.
- ③ Nishida H., Matsumoto A, Tomono N, Hanakai T, Harada S, Nakaya H. Biochemistry and physiology of mitochondrial ion channels involved in cardioprotection. FEBS Lett. 査読有、2010; 584(10): 2161-2166.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 野村桃子、西田洋文、佐藤俊明、宮崎 勝、中谷晴昭 心筋ミトコンドリア  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル開口によるアナンダミドの梗塞縮小効果 第 118 回日本薬理学会関東部会、第 10 回応用薬理シンポジウム 2008 年 6 月 7 日～8 日
- ② 西田洋文、野村桃子、小倉武彦、中谷晴昭 内因性カンナビノイドの心筋ミトコンドリア  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネルを介する心筋保護作用 第 25 回日本心電学会学術集会 2008 年 11 月 1 日～2 日
- ③ 西田洋文、稲村直樹、小倉武彦、中谷晴昭 オキシトシンのミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネルを介する心筋保護作用 第 18 回日本循環薬理学会 2008 年 11 月 21 日
- ④ 稲村直樹、西田洋文、壺園良恵、小倉武彦、中谷晴昭 ミトコンドリア ATP 感受性  $K^+$  チャネルの活性化を介したグレリンの心筋保護作用 第 82 回日本薬理学会年会 2009 年 3 月 16 日～18 日
- ⑤ 花開孝宏、西田洋文、友野尚弘、原田新太郎、松本明郎、中谷晴昭 内因性カンナビノイドのミトコンドリア  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル開口による心筋保護効果 第 121 回日本薬理学会関東部会 2009 年 10 月 10 日
- ⑥ 稲村直樹、西田洋文、原田新太郎、友野

尚弘、花開孝宏、松本明郎、中谷晴昭 グレリンのミトコンドリア ATP 感受性カリウムチャネルとホスファチジルイノシトール 3 キナーゼを介する心筋保護作用 第 19 回日本循環薬理学会 2009 年 11 月 27 日

- ⑦ Hanakai T., Nishida H., Nakaya H. Anandamide opens mitochondrial  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels and confers cardioprotection in rabbit heart. 第 26 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 2009 年 12 月 4 日～5 日
- ⑧ Tomono N., Nishida H., Matsumoto A., Nakaya H. Oxytocin produces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through activation of mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels. 第 26 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 2009 年 12 月 4 日～5 日
- ⑨ Harada S., Inamura N., Nishida H., Matsumoto A., Nakaya H. Mechanism of pharmacological postconditioning by ghrelin after ischemia/reperfusion in rabbit hearts. 第 26 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 2009 年 12 月 4 日～5 日
- ⑩ 原田新太郎、稲村直樹、西田洋文、友野尚弘、花開孝宏、松本明郎、中谷晴昭 グレリンのミトコンドリア ATP 感受性  $K^+$  チャネル活性化を介した薬理的ポストコンディショニング 第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月 16 日～18 日
- ⑪ 鈴木一正、西田洋文、松本明郎、中谷晴昭 アコニチン誘発心房細動におけるアセチルコリン感受性  $K^+$  チャネルの役割 第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月 16 日～18 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西田 洋文 (NISHIDA HIROFUMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：80513043