

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21689042

研究課題名（和文）

細胞膜特殊構造の新しい役割—心筋保護作用に与える影響とそのメカニズムの解明—

研究課題名（英文） Role of caveolae and caveolin in postconditioning-induced cardiac protection

研究代表者

堤 保夫 (TSUTSUMI YASUO)

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：90523499

研究成果の概要（和文）：虚血再灌流障害に対する心筋保護作用メカニズムの全貌は明らかになっていない。申請者は細胞膜特殊構造であるカベオラに注目し、その構成要素であるカベオリンがプレコンディショニング作用に関与していることを明らかにした。最近注目されているポストコンディショニングはプレコンディショニングに比べより臨床的なスタンスの処置方法であり、申請者はカベオラ、カベオリンがポストコンディショニングに及ぼす影響を同定し、心筋保護経路を明らかにすることを目的とする。

研究成果の概要（英文）：Caveolae are small, flask-like invaginations of the plasma membrane. Caveolins are structural proteins found in caveolae that have scaffolding properties to allow organization of signaling. The authors tested the hypothesis that cardiac protection induced by postconditioning is caveolae or caveolin dependent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2012年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	20,800,000	6,240,000	27,040,000

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、心筋虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の欧米化、人口の高齢化および生活習慣病の増加は、本邦における心血管リスクを急激に増加させている。虚血性心疾患やリスクを有する患者の心合併症発生予防とその治療は患者予後にとって重要な因子となっている。

短時間の先行虚血（Ischemic Preconditioning；IPC）により、その後に生じる虚血性心筋障害が抑制される現象は

他のどの治療薬よりも有効的な手段であり、20年以上を経た現在においてもその重要性が研究されている。さらに、オピオイドや吸入麻酔薬イソフルランの先行投与においても同様の保護作用が確認され、そのメカニズムがIPCと非常に類似することも報告されている。

最近、短期虚血・麻酔薬による刺激を長期間虚血の後に加えた場合においても心保護作用が引き起こされることが報告され、ポス

トコンディショニングとして注目を浴びている。このポストコンディショニングによる心筋保護作用は、虚血後に行なわれる手技に起因するため、プレコンディショニングに比較してより臨床的であるとされている。すなわち、心筋梗塞発症を予測し、プレコンディショニングを行なうことは難しいが、心筋梗塞発症直後の患者に対し心筋保護効果を期待し、ポストコンディショニングを行ない心筋梗塞サイズを減少させることが期待されている。しかしながら、プレコンディショニング同様、ポストコンディショニングにおいてもそのメカニズムは未だに全て明らかになってはいない。

カベオラは細胞膜に存在する直径 50-100 nm 前後の陥凹であり、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメインと称され、細胞膜のシグナル伝達、エンドサイトーシスなどの断片的な性質は明らかにされてきた。カベオリンはカベオラを構成する構成タンパクであり、異なる遺伝子でコードされるカベオリン-1, 2, 3 が同定されているカベオリンは両末端が細胞質側に露出し脂質分子と結合しシグナル伝達に関与すると考えられる。特に、カベオリン骨格ドメインと呼ばれる部分は多くのシグナル伝達関連分子に結合するだけでなくそれらの機能制御にも関与すると考えられている。

吸入麻酔薬は古くから臨床において使用されており、そのハロゲン化炭酸水素やエーテル構造は直接的もしくは間接的に細胞膜脂質や膜タンパクに作用することが知られている。そのため、吸入麻酔薬がカベオラのような膜脂質ドメインに影響を与えることが予想され、プレコンディショニングによる心筋保護作用の起点となっている可能性がある。さらに、オピオイド受容体はカベオリン骨格ドメインに存在することが明らかになっている。

2. 研究の目的

申請者はイソフルラン先行投与（プレコンディショニング）によって細胞膜カベオラ数が増加し、カベオリンを介した心筋保護作用が活性化されることを突き止め、カベオリン-3 過剰発現マウスにおいては虚血再灌流障害に対し内因的心筋保護作用が存在することを明らかにした。さらに、共同研究者らはオピオイド・プレコンディショニングがカベオラに与える影響を報告している。これらの結果からカベオラ及びカベオリン-3 が心筋保護作用に重要な役割を担っていることが明らかとなった。しかし、これらの因子が、ポストコンディショニングにどのように作用し、心筋保護効果にどのように関与しているのかは明らかではない。

そこで申請者は以下の仮説を立てた。
(短期虚血・オピオイド・吸入麻酔薬による) ポストコンディショニング作用によりカベオラが増加、カベオリン-3 が活性化され心筋保護効果が発現する。

ポストコンディショニングによる心筋保護作用カはカベオラ・マイクロドメインに存在するトリガー・メディエーター・エンドエフェクター等を介し発現している。

上記の仮説を検証するため以下の実験を行なう。

実験 1. ポストコンディショニング刺激後のカベオラ数、及びカベオリン-3 の活性化を形態学的方法、イムノプロットング法にて確認する。

実験 2. マウス *in vitro* 遊離心筋細胞を用い、低酸素モデルにて心筋細胞死亡率がポストコンディショニング刺激により低下することを明らかにする。さらに、同様のモデルを使用しカベオラ阻害剤、siRNA を使用したカベオリン-3 ノックダウン細胞によりカベオラ、カベオリン-3 のポストコンディショニング作用への関与を明らかにする。

実験 3. マウスの *in vivo* 虚血再灌流モデルを用いて対照群、ポストコンディショニング群において心筋梗塞サイズを測定比較する。同様に、カベオリン-3 ノックアウトマウスを用いたモデルにてカベオリン-3 の影響を明らかにする。

実験 4. カベオラに局在するトリガー（、メディエーター、エンドエフェクターがポストコンディショニング作用によってどのように影響を受けるかを検討する。

これらによって本研究期間内に、ポストコンディショニングのカベオラ、カベオリン-3 に及ぼす影響が明らかとなる。また、心筋保護作用経路におけるカベオラ、カベオリンの果たす役割が解明される。

3. 研究の方法

実験 1. マウスの摘出心を酵素法にて灌流、得られた遊離心室筋細胞をディッシュに接着させ、ポストコンディショニング刺激（短期低酸素、モルヒネ、吸入麻酔薬イソフルラン）を加えた後、組織固定。これらの細胞を電子顕微鏡を使用してその細胞表面を観察、単位表面積あたりのカベオラの数を対照群と比較評価する。さらに、ポストコンディショニング後のカベオリン-3 の活性をイムノプロットング法にて確認する。

実験 2. 遊離心室筋細胞をディッシュに接着させ、特殊チャンバーを用い 2 時間低酸素状況 (95%N₂, 5%CO₂) に暴露する。実験 1. で決定した濃度を用い、ポストコンディショニング刺激を加えた後、トリパンブルー染色し細

胞数を数える。生きた細胞の割合を計算し、対照群と比較検討する。

Methyl- β -cyclodextrin (MBCD) はコレステロール枯渇剤であり、カベオラの崩壊をもたらす。MBCD (1mM) をポストコンディショニング刺激の前投与し、同様の実験を行なうことでカベオラの心筋細胞保護作用が明らかになる。カベオリン-3 の siRNA を電気穿孔法にて細胞に注入、同様の実験を行なう。これによりカベオリン-3 の心保護作用に及ぼす影響が明らかになる。

実験 3. マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定しながら、心臓冠動脈左前下行枝を 30 分間閉塞した後ポストコンディショニング刺激を行なう。その後、2 時間再灌流し、再び冠動脈を閉塞、Evans Blue を注入し心臓を取り出す。心臓をスライスし、TTC にて再染色を行い心筋梗塞サイズを測定する。さらに血漿トロポニン-I 濃度を測定し梗塞サイズを確証する。

同様の虚血再灌流実験をカベオリン-3 ノックアウトマウスで行ない、カベオリン-3 のポストコンディショニング作用に対する影響を明らかにする。

実験 4. 遊離心室筋細胞をポストコンディショニング刺激後、ホモジナイズし、密度勾配遠心法にて分画を得る。ポストコンディショニング作用のトリガー (オピオイド受容体、K_{ATP} チャネル) 及びメディエーター (PKC、NOS、Src、PI3K) と考えられているこれらタンパクがカベオラ分画に増加しているかどうかをイムノブロッティング法にて検討する。さらに、心室筋細胞をカベオリン-3 とトリガー、メディエーター、エンドエフェクターと共に蛍光抗体を反応させ、共焦点顕微鏡を使用しタンパクの局在を同定する。また、ポストコンディショニング刺激後 (1, 5, 10, 30, 60, 120 分) のサンプルから mRNA 抽出し、リアルタイム PCR にて遺伝子定量・発現時間を解析し、時間軸を踏まえた細胞内分子輸送経路モデルを確立する。さらに、これらを実験 2. で使用したカベオリン-3 ノックダウン細胞においても検討を行い、通常細胞と比較することでカベオリン-3 のポストコンディショニング作用における意義を明確にする。

4. 研究成果

実験 1. 単位面積当たりのカベオラの個数を電子顕微鏡にて観察し比較した結果、ポストコンディショニングを行った軍において有意に個数が増加していることが分かった。この作用は、短期低酸素、オピオイド、吸入麻酔薬すべての群において有意に認めることができた。

また、イムノブロッティングによりカベオリン-3 の活性を定量すると、ポストコンディショニング刺激によってコントロール群と比較して有意にカベオリン-3 の活性化が発現していることが明らかとなった。

実験 2. マウスの心臓を摘出後、ランゲンドルフ法にて灌流、コラゲナーゼにより細胞間結合を解き、マウスの単一心筋細胞を取得した。この単一心筋細胞を用いて、siRNA を使用しカベオリン-3 のノックダウン細胞を作成した。この細胞を PCR 法およびイムノブロット法を用いノックダウンされていることを確認した後、低酸素 *in vitro* 実験を行った。通常の遊離心室筋細胞を用いた低酸素 *in vitro* 実験においてはポストコンディショニング作用 (オピオイドならびに吸入麻酔薬によるポストコンディショニング) によって心室筋細胞の生存率が上昇したが、ノックダウン細胞においてはこの心筋保護作用が棄却されたことから、オピオイドならびに吸入麻酔薬によって誘起されるポストコンディショニング心保護効果にカベオリン-3 が重要な役割を演じていることが推測された。

また、コレステロール枯渇剤を前投与してカベオラの崩壊をもたらした場合、これらのポストコンディショニング心保護作用が棄却されることから、カベオラの構造もカベオリン同様この作用発現に重要であることが推測された。

実験 3. マウスに麻酔をかけ人工呼吸下に開胸、心臓の冠動脈を一時的に遮断することで 30 分の虚血および 2 時間の再灌流を行った。再灌流終了後に染色、心臓を取り出し、顕微鏡下に心筋梗塞サイズを測定した。再灌流期に短期虚血を行うことによってポストコンディショニング刺激を加えた場合、心筋梗塞サイズは対照群と比較して有意に減少し、ポストコンディショニングによる心筋保護作用が明らかとなった。また、再灌流期にオピオイドを与えた場合、吸入麻酔薬であるイソフルランを与えた場合においても心筋梗塞サイズが減少し、短期虚血を行ったポストコンディショニングと同様の作用を得ることができることからこれらの薬品においてもポストコンディショニング作用が存在することが明らかになった。

さらに、カベオリン-3 をノックアウトしたマウスを用いて同様の虚血再灌流実験を行いカベオリン-3 のポストコンディショニング作用に及ぼす影響を検討した。短期虚血、オピオイド、吸入麻酔薬によって誘起された心筋保護作用はいずれの場合もカベオリン-3 ノックアウトマウスにおいては観察されず、ポストコンディショニング効果が棄却されることが明らかになった。このことより、心

筋保護作用にカベオリン-3を介した経路が重要であることが推測された。

実験4. マウスの摘出心臓をランゲンドルフ法にて灌流することで、単一心筋細胞を取り出した。得られた心筋細胞をディッシュに定着させ、培養を行った。その後、遊離心室筋細胞に対し短期虚血、オピオイド、および吸入麻酔薬を用いてポストコンディショニング刺激を行った。ポストコンディショニング刺激を行った細胞をホモジナイズし、超遠心を行う事で密度勾配遠心法にて細胞分画を得た。この細胞分画を用いて、イムノブロット法を行う事により、各ポストコンディショニング作用のシグナル伝達物質として、オピオイド受容体、ATP感受性Kチャンネル、Protein Kinase C、Nitric Oxide Synthase、Src、Phosphoinositide 3-kinase、Protein Kinase Bの関与が明らかとなった。

さらに、上記酵素法にて取り出した心室筋細胞を前述の伝達物質およびカベオリン-3と共に蛍光抗体を反応させることによってタンパクの局在を調べた。共焦点顕微鏡を使用し局在を同定した結果、カベオリン-3とオピオイド受容体、ATP感受性Kチャンネル、Protein Kinase C、Nitric Oxide Synthase、Src、Phosphoinositide 3-kinase、Protein Kinase Bが共発現していることによりこれらの伝達物質がカベオリン-3を介した作用であることが明らかとなった。さらに、カベオリン-3のノックアウトマウスを用いることでこれらの実験の結果が棄却されることを明らかにし、ポストコンディショニング心筋保護作用におけるカベオリン-3の重要性を明らかにした。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Katsuya Tanaka, Takashi Kawano, Yasuo Tsutsumi, Michiko Kinoshita, Nami Kakuta, Kayo Hirose, Masakazu Kimura, and Shuzo Oshita. Differential effects of propofol and isoflurane on glucose utilization and insulin secretion. *Life Sci* 88: 96-103, 2011. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.032. (査読有)
- ② Yasuo Tsutsumi, Rie Tsutsumi, Kazuaki Mawatari, Yutaka Nakaya, Michiko Kinoshita, Katsuya Tanaka, and Shuzo Oshita. Compound K, a metabolite of ginsenosides, induces cardiac protection mediated nitric oxide via Akt/PI3K pathway. *Life Sci* 88:725-729, 2011. doi: 10.1016/j.lfs.2011.02.011. (査読有)
- ③ Yousuke T. Horikawa, Mathivadhani Panneerselvam, Yoshitaka Kawaraguchi, Yasuo Tsutsumi, Sameh S. Ali, Ravi C. Balijepalli, Fiona Murray, Brian P. Head, Ingrid R. Niesman, Timo Rieg, Volker Vallon, Paul A. Insel, Hemal H. Patel, and David M. Roth. Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 attenuates cardiac hypertrophy and increases natriuretic peptide expression and signaling. *J Am Coll Cardiol* 57: 2273-2283, 2011. doi: 10.1016/j.jacc.2010.12.032. (査読有)
- ④ Kayo Hirose, Yasuo Tsutsumi, Rie Tsutsumi, Masayuki Shono, Erika Katayama, Michiko Kinoshita, Katsuya Tanaka, and Shuzo Oshita. Role of the O-linked β -N-acetylglucosamine in the cardioprotection induced by isoflurane. *Anesthesiology* 115: 955-962, 2011. doi: 10.1097/ALN.0b013e31822fcede. (査読有)
- ⑤ Yasuo Tsutsumi, Yoshitaka Kawaraguchi, Yousuke T. Horikawa, Ingrid R. Niesman, Michael W. Kidd, Blake Chin-Lee, Brian P. Head, Piyush M. Patel, David M. Roth, and Hemal H. Patel. Role of caveolin-3 and glucose transporter-4 in isoflurane-induced delayed cardiac protection. *Anesthesiology* 112: 1136-1145, 2010. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181d3d624. (査読有)
- ⑥ Yasuo Tsutsumi, Yoshitaka Kawaraguchi, Ingrid R. Niesman, Hemal H. Patel, and David M. Roth. Opioid-induced preconditioning is dependent on caveolin-3 expression. *Anesth Analg* 111: 1117-1121, 2010. doi: 10.1213/ANE.0b013e3181f3351a. (査読有)
- ⑦ Mathivadhani Panneerselvam, Yasuo Tsutsumi, Jacqueline A. Bonds, Yousuke T. Horikawa, Michelle Saldana, Nancy D. Dalton, Brian P. Head, Piyush M. Patel, David M. Roth, and Hemal H. Patel. Dark chocolate receptors: epicatechin-induced cardiac protection is dependent on δ opioid receptor stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1604-1609, 2010. doi: 10.1152/ajpheart.00073.2010. (査読有)

〔学会発表〕(計16件)

- ① 神邊紀子、アミノ酸の mTOR/p70S6K 経路を介した心筋保護作用の影響 第59回日本麻酔科学会 神戸国際会議場・神戸市 6/8/2012
- ② 堤保夫、心筋保護作用における吸入麻酔薬とゲラニルゲラニルアセトンの相互作用—細胞膜マイクロドメインに及ぼす影響— 第59回日本麻酔科学会 神戸国際会議場・神戸市 6/8/2012
- ③ Yasuo Tsutsumi, Protective effects of amino acids on the ischemic myocardium via mTOR/S6 kinase pathway. Experimental Biology Annual Meeting, San Diego Convention Center, California, USA, April 23, 2012.
- ④ Kayo Hirose, The relation between isoflurane-induced O-linked β -N-acetylglucosamine and mitochondrial function. the American Society of Anesthesiologist Annual Meeting, Chicago Convention Center, Illinois, USA, October 16, 2011.
- ⑤ Katsuya Tanaka, Simvastatin restores anesthetic postconditioning in the presence of hyperglycemia in vivo rabbits. the American Society of Anesthesiologist Annual Meeting, Chicago Convention Center, Illinois, USA, October 16, 2011.
- ⑥ 木下倫子、イソフルランのポストコンディショニング効果における Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルと cAMP 依存性プロテインキナーゼの役割 第58回日本麻酔科学会 神戸国際会議場・神戸市 5/19/2011
- ⑦ 廣瀬佳代、イソフルランによる心筋保護効果における O-Linked β -N-Acetylglucosamine とミトコンドリア機能 第58回日本麻酔科学会 神戸国際会議場・神戸市 5/19/2011
- ⑧ Yasuo Tsutsumi, Geranylgeranylacetone induced delayed cardiac preconditioning requires caveolin-3. Experimental Biology Annual Meeting, Washington D.C. Convention Center, Washington D.C. USA, April 13, 2011.
- ⑨ Kayo Hirose, The role of O-linked β -N-acetylglucosamine in the cardiac protection induced by isoflurane. the American Society of Anesthesiologist Annual Meeting, San Diego Convention Center, California, USA, October 16, 2010.
- ⑩ 廣瀬佳代、イソフルランによる心筋保護効果における O-Linked β -N-Acetylglucosamine の役割 第57回日本麻酔科学会 福岡国際会議場・福岡市 6/4/2010
- ⑪ 堤保夫、吸入麻酔薬による遅延型プレコンディショニングの細胞膜ドメインに及ぼす影響 第57回日本麻酔科学会 福岡国際会議場・福岡市 6/4/2010
- ⑫ Erika Katayama, Role of mTOR/p70S6K in amino acid induced cardiac protection. Experimental Biology Annual Meeting, Anaheim, Convention Center, California, USA. April 27, 2010.
- ⑬ Yoshitaka Kawaraguchi, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β is involved in isoflurane-induced delayed cardiac protection. Experimental Biology Annual Meeting, Anaheim Convention Center, California, USA. April 26, 2010.
- ⑭ Rie Tsutsumi, Compound K produces cardiac protection by activating Akt phosphorylation. Experimental Biology Annual Meeting, Anaheim Convention Center, California, USA. April 25, 2010.
- ⑮ Yasuo Tsutsumi, Role of O-linked β -N-acetylglucosamine in isoflurane induced cardiac protection. Experimental Biology Annual Meeting, Anaheim Convention Center, California, USA. April 25, 2010.
- ⑯ 堤保夫、オピオイドプレコンディショニングの細胞膜ドメインに及ぼす影響 第56回日本麻酔科学会 神戸国際会議場・神戸市 8/16/2009

〔図書〕(計1件)

- ① 田中克哉、堤保夫、大下修造「徹底ガイド 心臓麻酔 Q&A—心臓麻酔における臓器保護—心臓手術中の心筋保護」麻酔科学レクチャー 総合医学社 1巻4号 901-909, 2009

〔その他〕

ホームページ等
http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/masui_totsu/ikyoku/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 保夫 (TSUTSUMI YASUO)
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：90523499

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :