

機関番号：10107

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791427

研究課題名 (和文)

麻酔薬プレコンディショニング作用のミトコンドリアイオンチャネルに与える影響

研究課題名 (英文)

Impact of anesthetic-induced preconditioning on mitochondrial ion channels

研究代表者

丹保 亜希仁 (TAMPO AKIHITO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80531524

研究成果の概要 (和文)：

麻酔薬プレコンディショニングの重要なファクターであると考えられているミトコンドリアのイオンチャネルの電気生理学的特徴を調査した。マイトプラストはラットの心筋より単離したミトコンドリアから作製した。ミトコンドリア KATP チャネル電流と考えられる電流は記録できなかった。記録電極に 150mM の KCl 溶液を用いた条件下にて、コンダクタンスが約 110pS のチャネル電流が記録された。このチャネル電流はクロライドイオンをグルタミン酸に置換すると消失した。TEA-Cl を用いた際には電流に変化はなく、クロライドイオンを通過させるチャネルであることが判明した。また、DIDSによりブロックされたことから IMAC (inner membrane anion channel) であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We studied electrophysiological profiles of mitochondrial ion channels, which are known as important factors in anesthetic-induced preconditioning. Mytoplasts were obtained from isolated rat hearts by osmotic shock. Mitochondrial KATP channel were not detected in this study. We identified a mitochondrial ion channel with a conductance of 110pS in equimolar 150mM KCL solution. This channel current was removed when the 150mM KCL bath solution was replaced with 150mM K-glutamate. When 150mM TEA-Cl was used as bath solution, the current was not affected. In addition, The current was inhibited by DIDS, a chloride channel blocker. These results suggested that the mitochondrial ion channel was IMAC (inner membrane anion channel).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：周術期管理学

キーワード：蘇生学

## 1. 研究開始当初の背景

短時間、可逆性の虚血の繰り返しによりもたらされる心筋のプレコンディショニング作用 (Ischemic Preconditioning; IPC) は 1986 年に Murry らにより発表された心筋保護作用である (Murry CE et al. *Circulation* 1986;74:1124-36)。その後、吸入麻酔薬によるプレコンディショニング作用 (Anesthetic-induced Preconditioning; APC) が IPC と同様に心筋保護作用をもたらすデータが 1997 年に報告された (Kerstern JR et al. *Anesthesiology* 1997;87 : 361-370)。APC の効果は、まず初めに心筋梗塞巣の縮小が証明され、その後に APC 発現の機序として G 蛋白、プロテインカイネース C、プロテインタイロシンカイネース、Reactive Oxygen Species (ROS)、Nitric Oxide (NO) などの細胞内情報伝達系への作用が報告されてきた。また、パッチクランプ法を用いた細胞膜上の ATP 感受性カリウム (sarcKATP) チャンネルや、電位依存性イオンチャンネル (ナトリウムチャンネル、カルシウムチャンネルなど) への APC の効果についての研究も発表されている。近年の報告では、ミトコンドリアが APC の心筋保護効果における重要な役割を担っているとの考えが主流になってきている。ミトコンドリアを介する APC の効果発現機序としては、ミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷の減少、膜電位の保持、およびアポトーシスの抑制などが報告されている (Ljubkovic M et al. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292 : C1583-1590)。これらのメカニズムに関するミトコンドリアに存在するイオンチャンネル、トランスポーターとしては、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性カリウム (mitoKCa) チャンネル、ATP 感受性カリウム (mitoKATP) チャンネル、mitochondrial permeability transition pore (mPTP) などがある (O'Rourke B et al. *Physiology* 2005;20:303-315)。また、心筋虚血による致死性不整脈 (心室頻拍、心室細動など) に関するチャンネル (inner membrane anion channel; IMAC) もミトコンドリア内膜に存在することが知られている。しかし、これらの研究はミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度や膜電位の測定、あるいは選択的ブロッカーの使用による心筋梗塞巣の縮小や抗不整脈作用

といったプレコンディショニング作用の消失を証明するなどの、チャンネルの作用の間接的な観察である。また電気生理学的研究としては、人工的に作製した脂質二重膜にミトコンドリアから抽出したチャンネル蛋白を発現させてチャンネル電流を記録したものがある (Jiang MT et al. *Anesth Analg*. 2007;105:926-932)。しかし、ミトコンドリア上に存在するネイティブのイオンチャンネルの活動と APC の関連性について直接的に観察した研究は現在のところ報告されていない。しかし、これまでの研究から、APC による心筋保護作用におけるミトコンドリアイオンチャンネルの関与は上記のとおり明らかである。パッチクランプ法を用いた APC の作用発現に関わる種々のミトコンドリアイオンチャンネルの今回の研究は、今後 APC のメカニズムを明らかにしていく上で新しく、重要な分野である。

## 2. 研究の目的

APC による心筋保護作用に重要な役割を果たしているミトコンドリアのイオンチャンネルのほとんどはその内膜に存在することがわかっている (O'Rourke B et al. *Physiology* 2005;20:303-315)。そこで、それらのイオンチャンネルの活動を観察するためにミトコンドリアの外膜を取り除いたもの (マイトプラスト) を作製し、パッチクランプ法を用いて直接的にチャンネルの電気生理を観察する。マイトプラストの作製には、これまでジギトニンを使う方法と、Osmotic Shock を利用する方法が報告されている。今回は、ネイティブのイオンチャンネルの活動の観察が目的であるので、内膜への薬理学的影響が少ないと考えられる後者の方法をとることとした。現在のところ、ミトコンドリアに存在する各々のイオンチャンネルを確実に isolation して記録する方法は確立されていない。これは、ミトコンドリアのチャンネルのイオン選択性が細胞膜上のイオンチャンネルに比べて低いことが一因である。今回の研究では、これまでの報告におけるチャンネルのコンダクタンスおよび、それぞれのチャンネルの選択的ブロッカーを用い、さらに各々のチャンネルに対して最適な実験溶液のイオン組成を見つけ出すことも目的とする。このように、各々のチャネ

ルを同定し、電気生理学的特徴を研究することが主な目的となる。さらに、各々のチャンネルに対する APC の作用について、*in vivo* APC モデルを用い、APC のミトコンドリアイオンチャンネルに対する作用を解明することを最終目的とする。対象は APC の心筋保護効果の発現に強く関与しているとされる *mitoKCa* チャンネル、*mitoKATP* チャンネル、及び *IMAC* とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) ミトコンドリアの単離

ラット計200匹を用いる。十分な麻酔下にラットの心臓を摘出し、氷上でマンニトールスクロース (MS) 溶液内にて心室筋を細かく刻んだ後にホモジェナイズする。その後、ミトコンドリアを単離するために、低速および高速で遠心分離を行う (4°C)。単離したミトコンドリアはMS溶液中にて氷上で保存する。

#### 2) マイトプラストの作製

マイトプラストは *Osmotic Shock* を利用して作製する。1) で得られたミトコンドリアの浮遊液を低浸透圧溶液中に入れ5分間の *Osmotic Shock* を与えた後、遠心分離を行い (4°C) マイトプラストを抽出する。得られたマイトプラストは高浸透圧溶液中にて氷上で保存する。

#### 3) パッチクランプ法

##### <ガラス電極の作製>

パッチクランプ用のガラス電極は、現有の水平牽引型の電極作製器を用いて作製する。先端にはヒートポリッシュを施す。ガラス電極の抵抗はチャンネル電流記録用の溶液中にて 15-20M $\Omega$  となるように作製する。

##### <チャンネル電流の計測>

各イオンチャンネル電流の計測は室温下でシングルチャンネルモード (*inside-out patch*) を用いて行う。チャンネル電流の記録はアンプリファイアー、アナログ-デジタルコンバーター、電流観察・記録ソフトウェア *pClamp10* を用いる。解析には *pClamp10* および *Origin 7* ソフトウェアを用いる。倒立顕微鏡のチャンバーでマイトプラストを確認し、ガラス電極 (15-20M、等浸透圧溶液中) を接触させギガオームシールを形成した後、パッチ膜を *excise* する。チャンネル電流の記録は、はじめに *ramp protocol* を用いて記録した後、*single-channel protocol* を用いて、チャンネルの活動する電圧を中心に各電圧でのシングル

チャンネル電流の記録を行う。チャンネルの同定は、これらの記録から得られたチャンネルのコンダクタンスおよび各チャンネルの選択的ブロッカー投与により行う。また、チャンネルの開口確立 (NPo) を用いて解析を行う。

### 4. 研究成果

マイトプラストは前述のごとくラットの心筋から得たミトコンドリアから作製した。十分な麻酔下にラットの心臓を摘出し、マンニトールスクロース溶液内にて心室筋を細かく刻みホモジェナイズした。その後、ミトコンドリアを単離するために、低速 (2000rpm) および高速 (9000rpm) で遠心分離を行った (4°C)。単離されたミトコンドリアは MS 溶液中にて氷上で保存した。この方法で得られた分画がミトコンドリアであることは、蛍光色素 (マイトトラッカー) で標識し、蛍光顕微鏡下で確認した。また、ミトコンドリアの生理学的活性は酸素消費量の測定により正常であることを確認した。マイトプラストは上記の方法によって得られたミトコンドリアから *Osmotic Shock* を利用して作製した。ミトコンドリアの浮遊液を低浸透圧溶液中に入れ 5 分間の *Osmotic Shock* を与えた後、遠心分離を行い (4°C) マイトプラストを抽出した。得られたマイトプラストは高浸透圧溶液中にて氷上で保存し、パッチクランプ法による生理学的研究に用いた。

パッチクランプに用いたガラス電極は水平牽引型の電極作製器を使用し、抵抗はチャンネル電流記録用の溶液中にて 15-20M $\Omega$  となるように調整した。電極内、記録チャンバー内ともに等浸透圧溶液を用い、記録は *cell-attached mode* 及び *inside-out mode* にて行った。今回の研究でターゲットとした *mitoKCa* チャンネル、*mitoKATP* チャンネル、及び *IMAC* であるが、チャンネルのコンダクタンスから *mitoKATP* チャンネル電流と思われる電流は記録できなかった (過去に発見率 4%と報告されている)。150mM の KCl 溶液を用いた条件下にて、コンダクタンスが約 110 pS のチャンネル電流が記録された。このチャンネル電流は、K-glutamate に溶液を置換すると消失した。TEA-Cl を用いた際には電流に変化はなく、クロライドイオンを通過させるチャンネルであることが判明した。また、DIDS によりブロックされたことから *IMAC* であると考えられた。

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 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

①丹保亜希仁、高畑治、岩崎寛. 麻酔プレコ  
ンディショニングが心筋Naチャンネルに与え  
る効果. 北海道麻酔学会 2010, 札幌

②鈴木昭広、丹保亜希仁、相沢圭、菊地千歌、  
岩崎寛. 吸入麻酔薬が遅延整流Kチャンネルに  
及ぼす影響の調査. 日本臨床麻酔学会 2010,  
徳島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹保 亜希仁 (TAMPO AKIHITO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80531524

(2)研究分担者  
( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: