

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791447

研究課題名(和文) 不整脈制御タンパクの同定と揮発性麻酔薬の作用

研究課題名(英文) Identification of intracellular factors involved in the prevention of arrhythmias induced by volatile anesthetics.

## 研究代表者

岩崎 光生 (IWASAKI MITSUO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80528365

## 研究成果の概要(和文)：

イミダゾリン受容体刺激薬のリルメニジンを脳内に投与に伴う迷走神経刺激はハロセン-アドレナリン不整脈の抑制に関与するが、そのメカニズムを検討したところ、それに関与する細胞内因子としては百日咳毒素感受性 G 蛋白質、phosphatidylinositol 3-kinase、Akt (protein kinase B)、glycogen synthase kinase 3、mitochondrial permeability transition pore (ミトコンドリア遷移性透過孔)、さらには内因性 NO であることを示した。さらに、迷走神経刺激に伴い、Akt、glycogen synthase kinase 3 のリン酸化が有意に増加しており、これらの蛋白のリン酸化が抗不整脈作用をもたらすことを示した。

## 研究成果の概要(英文)：

Activation of pertussis toxin-sensitive G protein, phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-GSK3 signaling pathway and endogenous nitric oxide may be involved in prevention of adrenaline-induced arrhythmias during halothane anesthesia.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：不整脈・揮発性麻酔薬・タンパク質・リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

ハロセンがアドレナリン誘発性不整脈を容易に惹起することで知られているが、この欠点を補うことが新たな麻酔薬の開発に不可欠であり、結果イソフルレン、セボフル

レン開発につながった。セボフルレンやイソフルレンはアドレナリン誘発性不整脈を起こしにくい、その具体的な理由について未だ十分説得に値する説明はできていない。未解決のままである背景には不整脈研究にお

ける常套手段である電気生理学的な手法での研究ではこれらの麻酔薬の差異を明確に示すことができなかつたため、研究手法の限界となっているためであり、新たなアプローチが必要と考えられる。

1886年にプレコンディショニングという概念が提唱された。もともとは長時間の虚血に伴う梗塞巣の減少がみられる現象をとらえた概念であったが、その後の研究から梗塞巣の減少のみならず、心機能の維持や不整脈の抑制などの心臓に保護的な作用を含めた概念に拡大されてきた。そのメカニズムの研究では心筋細胞内に細胞機能を左右する様々な細胞内伝達因子(タンパク)の存在が明らかとなった。おそらくはそれらの中には不整脈を制御する因子が含まれていると想像できる。

## 2. 研究の目的

ハロセン-アドレナリン不整脈をモデルとしてその不整脈制御に関わる心筋内の細胞内因子を同定する。

## 3. 研究の方法

ハロセン麻酔下のアドレナリン不整脈を用いる。ラットをハロセンにて麻酔導入・維持し、股動脈および静脈にカニューレクションを行い、それぞれを動脈圧の測定および薬剤の投与ラインとした。エピネフリンを少量からの静脈内投与し、除々に投与量を暫増し、心室性不整脈の発生したエピネフリン投与量を持ってエピネフリン不整脈閾値と定める。この方法で不整脈閾値が高くなることは不整脈が出にくい、つまり抗不整脈的と評価できる。私たちはこの不整脈モデルを用いて、脳内にイミダズリン受容体刺激薬のリルメニジンを投与すると迷走神経を活性化し、抗不整脈作用をもたらすことを明らかにしてきた。今回はこの抗不整脈作用に関与する心

筋の細胞内因子を同定することで、不整脈に関与する因子のスクリーニングを行う。本研究で対象とする因子としては百日咳毒素感受性G蛋白質、phosphatidylinositol 3-kinase(以下PI3K)、Akt、glycogen synthase kinase 3 $\beta$ (以下GSK-3 $\beta$ ・、mitochondrial permeability transition pore(以下mPTP:ミトコンドリア遷移性透過孔)、NO合成酵素とし、まずそれぞれの因子の拮抗薬を用いた薬理的な手法にて関与する因子を同定する。

続いて、イミダズリン受容体刺激薬のリルメニジンを脳内に投与し、1時間後にラットの動脈より灌流液を投与し、すばやく心筋を切り取り、心筋切片を超音波破碎および遠心分離することで細胞質分画を得る。対象となる因子の抗体を用いてウエスタンブロット(化学発光法)を行い、そのリン酸化と量的な変化を測定する。

## 4. 研究成果

リルメニジンによる抗不整脈作用(不整脈閾値の上昇)は図1のごとく、百日咳毒素(PTX)の投与により失われた。

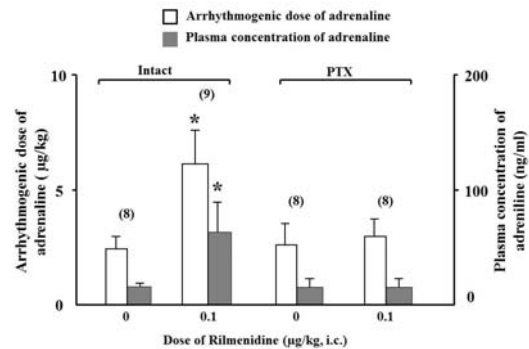


図1. 百日咳毒素のリルメニジンによる不整脈作用への影響。

次にリルメニジンによる抗不整脈作用(不整脈閾値の上昇)は図2のごとく、PI3K-Akt伝達系の拮抗薬であるワルトマニンの投与

により失われた。

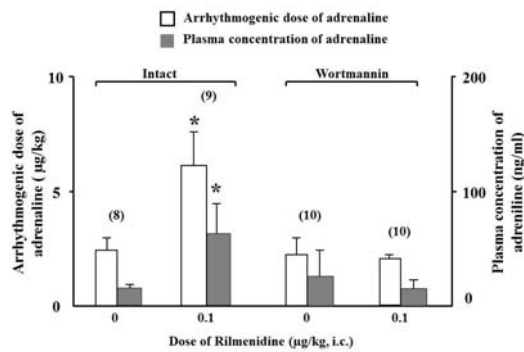


図 2. ワルトマニンのリルメニジンによる不整脈作用への影響。

さらにリルメニジンによる抗不整脈作用（不整脈閾値の上昇）は図 3 のごとく、NO 合成酵素の拮抗薬である L-NAME の投与により失われた。

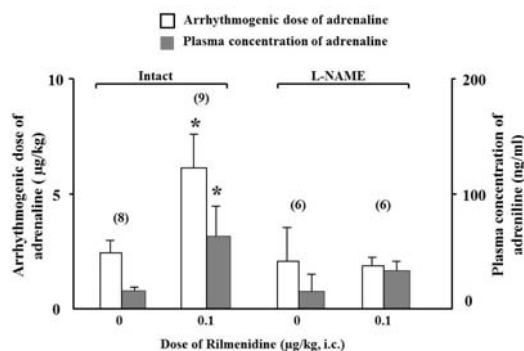


図 3. L-NAME のリルメニジンによる不整脈作用への影響。

最後にウェスタンブロットの結果を図 4 に示す。リルメニジンによる迷走神経刺激は結果として Akt および GSK-3β のリン酸化を増強した。ただし、この変化はワルトマニンの投与により、失われた。この結果は迷走神経刺激に伴い、PI3K-Akt 伝達系の活性化が生じていることを明確に示したもので、薬理学的手法で示した抗不整脈因子として PI3K-Akt 伝達系が関与していることを裏付けると考

えられる。

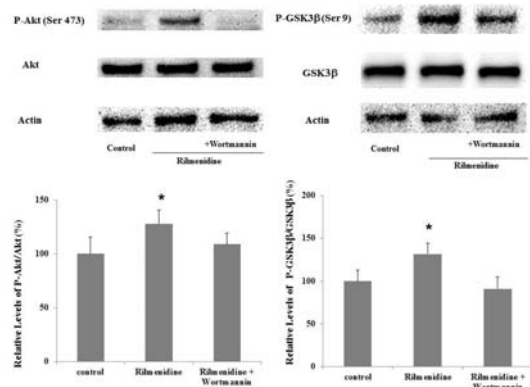


図 4. ウェスタンブロットの結果。

今回の実験結果からハロセン - アドレナリン不整脈の抑制に関与する細胞内因子としては百日咳毒素感受性 G 蛋白質、PI3K-Akt 伝達系、glycogen synthase kinase 3β さらには内因性、NO であることを示した。さらに、これらの伝達系は mPTP の開閉に深く関与していることは知られており、以前に私たちが行った研究でも mPTP の開口薬がリルメニジンの抗不整脈作用を拮抗した結果から、心筋内の抗不整脈因子として、PI3K-Akt 伝達系と mPTP の関与が明らかとなった。

#### 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 3 件）

- ① Iwasaki M, Hayashi Y, Kamibayashi T, Ymatodani A, Mashimo T: The antiarrhythmic effect of centrally administered rilmenidine involves muscarinic receptors, protein kinase C, and mitochondrial signalling pathways. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1623-30
- ② Yamanaka H, Hayashi Y, Iwasaki M, Kamibayashi T, Yamatodani A, Mashimo T. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and

endogenous nitric oxide are needed for the antiarrhythmic effect of centrally administered rilmenidine. Eur J Pharmacol 2010; 647: 155-160.

- ③ 山中寛男、林 行雄。プレコンディショニングと麻酔への臨床応用。麻酔 58: 279-87, 2009

〔学会発表〕(計1件)

- ①迷走神経を介したリルメニジンの抗不整脈作用における PTX 感受性 G 蛋白および PI3K/Akt シグナル伝達の働き

山中 寛男、林 行雄、岩崎光生、上林 卓彦、真下 節

第31回日本循環制御医学会(大阪)、2010年、5月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 光生 (IWASAKI MITSUO)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：80528365

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

林 行雄 (HAYASHI YUKIO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：60294063