

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591578

研究課題名(和文) リピドーム検索を用いた先天性心疾患心虚血再灌流障害時のエネルギー代謝に関する研究

研究課題名(英文) Study on the reperfused myocardial energy metabolism of congenital heart disease by lipidome search

研究代表者

岡 達二郎 (Oka, Tatsujiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80433283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ラットに動静脈短絡作成による心室容量負荷並びに低酸素負荷を加えた先天性心疾患モデルを作成した。心臓の虚血後再灌流障害の程度をコントロールモデルと比較検討した。心筋膜脂肪酸構成の分析はガスクロマトグラフィー質量分析計およびナノ・エレクトロスプレー質量分析計を用いた。低酸素負荷による先天性心疾患モデルではn-3系が増加、n-6系が減少し、そのうちC20:4は変化を認めずC18:2からC22:6へと構成が変化した。

研究成果の概要(英文)：We successfully created a congenital heart disease model by low oxygen load and ventricular volume overload due to arteriovenous shunting created in rats. the extent of post-ischemic reperfusion injury of the heart was compared to a control model. Analysis of myocardial membrane fatty acids components were used nano-electrospray mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometer. The n-3 poly-unsaturated fatty acids (PUFA) were increased and n-6 PUFA were reduced in congenital heart disease model by hypoxia load. C20:4 did not change but configuration of membrane lipids has changed from C18:2 to C22:6.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児循環器学 先天性心疾患 虚血後再灌流 リピドーム

1. 研究開始当初の背景

これまで救命の難しかった先天性心疾患症例の生命予後は手術法や術前術後の管理により向上した。しかし、一部の複雑心奇形（左心低形成症候群など）で予後は十分でない。複雑心奇形群の多くは形態的な問題に加え、心筋が圧負荷に加え低酸素状態にさらされ、幾重もの負荷がかかる状態にある。予後不良な症例の救命には更なる治療法の確立が責務である。こうした心奇形群の多くは複雑な形態に対し手術時間を要することに加え、心臓が圧負荷、容量負荷に加え体静脈血が混合することによる慢性的な低酸素状態にさらされており、心筋に幾重もの負荷がかかっている状態にある。そうした未だ予後不十分な症例の救命には更なる新たな治療法の確立が求められる。

慢性低酸素と脂質過酸化

成人重症心不全症例では reactive oxidized stress (ROS) 量の上昇と心筋障害の発生、特に、酸素を用いエネルギー産生の役割を担うミトコンドリアレベルで過酸化が生じていることが報告されるそして ROS に代表される活性酸素の主要な標的は細胞膜中に存在する 2 重結合を 2 つ以上含む高度不飽和脂肪酸である。細胞膜構成の主成分はリン脂質である。ROS の上昇に伴う過酸化の対象は細胞膜上の高度不飽和脂肪酸である。しかし先天性心疾患モデルの幼若期心を用いての、ROS の発生と心機能変化、心筋の過酸化の程度、抗酸化酵素の変化に対する検証はなされていない。特にチアノーゼ性心疾患の場合、術前血中 PO₂ が 35mmHg 以上であるのが、術中人工心肺装置から送血される供給血液の酸素濃度は 200mmHg 以上になる、チアノーゼのない症例では術前血中 PO₂ は 70~80mmHg であることと比較すれば、チアノーゼ群では酸素暴露による傷害がより生じやすいことが推察される。

負荷心における代謝と膜構成脂質

様々な負荷が心臓にかかることにより、心筋構成因子が胎児化することが報告されている。たとえば、我々は肥大などの負荷が心臓に生じるとミオシン重鎖の組成が から に変化することを示した（中川ら;京府医誌:2000）、またエネルギー代謝（Sambandam N et al, Heart Fail Rev:161:2002）では脂肪酸代謝から乳酸代謝に移行する、など多くの点で胎児期の組成に近づくことがわかっており、また、胎児心では虚血に対する抵抗性が高いことが報告される。しかし、心筋の膜脂質構成に関しては、我々、そして他施設（Jezkova J et al, Mol Cell Biochem:49:2002）の報告から心筋が低酸素負荷された場合、胎児のそれとは大きく異なり、2 重結合をより多く持つ過酸化を受けやすい多価不飽和脂肪酸の構成比が高いことが示されている、つまり低酸素負荷幼若心は胎児心とは違い、虚血に対する抵抗性が低い可能性がある。

2. 研究の目的

先天性心疾患モデルの確立

4 週雄ラットを用いた幼若低酸素負荷ラットを作成、左室全体から抽出した脂肪酸構成が変化し、特に n-6 系脂肪酸であるリノール酸（2 重結合が 2 つ）が減少、一方 n-3 系脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（2 重結合が 6 つ）が増加することで、より過酸化を生じやすい脂肪酸構成になること、抗酸化酵素の一つである superoxide dismutase (SOD) が減少すること、低酸素管理後高酸素暴露を行うことで心筋ホモジネートでの脂質過酸化物(チオバルビツール酸試験)が増加することを示した。

肺・心臓膜構成脂質と脂質過酸化の分析

こうした背景をふまえ、我々は、下大動脈絞扼術+低酸素負荷幼若ラットモデルを作成（チアノーゼ性先天性心疾患モデル）し、その心臓を用い

て、(1) 孤立心灌流を用いた虚血再灌流を行い心機能の変化を検証、灌流後の心筋を液体窒素下に保存して、(2) ELIZA を用いた各種抗酸化酵素量、(3) ナノ-エレクトロスプレ質量分析を用いた膜脂質に対するリピドーム検索を行うことにより、エネルギー代謝障害の程度を多角的に評価する。

これまで正常幼若心を用いたエネルギー代謝の検討報告はあるが、心筋に負荷のかかった幼若モデルでの検討は皆無であり、本研究モデルはより臨床に近く、非常に独創的である。予想される結果としては、圧負荷かつ低酸素負荷幼若心において、虚血後再灌流時に ROS が産生され抗酸化酵素も減少するため、高度不飽和脂肪酸の過酸化が亢進することで細胞障害が生じ、虚血後再灌流時の回復力が低下すること、そして抗酸化治療で回復程度が改善することである。先天性心疾患幼若モデルの虚血再灌流時の心筋エネルギー代謝に基づく研究はこれまで皆無であり、新たな治療戦略を考える際に非常に意義がある。将来的には患者検体の測定が当施設では可能である。

3. 研究の方法

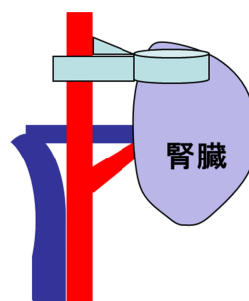
圧負荷および低酸素負荷モデルにおける心臓エコー検査、灌流を用いた心機能を明らかにする。

<使用動物> Sprague-Dawley rat (3週齢、離乳直後)

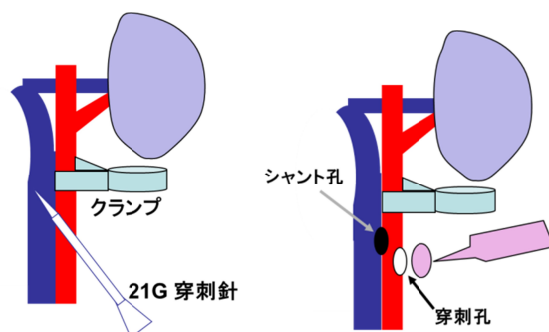
<飼育条件> 水、餌の制限なし。2時間サイクル照明

<圧負荷作成> 3週雄ラットに対して横隔膜直下の下行大動脈部分で間隙調整したクリップを行う。ペントバルビツール腹腔内投与による麻酔の後、左側腹部肋骨直下を切開、腎動脈分岐部よりも上方の腹部大動脈を丁寧に剥離する。リガクリップエキストラ (Ethicon Endo-Surgery, Inc.) を腹部大動脈に挟み込むことで圧負荷による室

肥大心を作成する。



<容量負荷作成> 圧負荷作成と同様に3週齢雄ラットに対してペントバルビツール腹腔内投与による麻酔の後、左側腹部肋骨直下を切開、腎動脈分岐部下方の腹部大動脈と下大静脈血管壁が癒合している部分を丁寧に剥離する。動脈クリップで中枢側の動脈をクランプした後、動脈から静脈にかけて21G針で穿通する。穿刺針を抜去してシアノアクリレートを滴下して止血した後動脈クリップを解除する。本術式による右心室・左心室に容量負荷がかかり肥大心を作成する。



<低酸素管理> 低酸素環境は、窒素ボンベからの窒素および圧縮空気の混合にて10%酸素濃度に調整したガスを、低酸素チャンバーに送気しその中でラットを飼育することで行う。手術後の状態安定化に2日を開け、その後低酸素チャンバーにて2週間飼育する。低酸素管理中は2日に1度、餌、水およびチップの交換をすばやく行う。圧負荷ないし容量負荷を施行したラットは低栄養となるため3週間飼育は難しい。

<心臓エコー検査> 低酸素管理2週間の後、イソ

フルラン麻酔後18Gサーフロー針を用いて挿管を行い、10%低酸素換気を開始する。Toshiba SA-10Aを用いてin vivo心機能評価を行う。右室径、左室径、壁厚、駆出率（(拡張末期容積-収縮末期容積)/拡張末期容積）を測定する。

<孤立心灌流>低酸素管理開始3週間後、体重測定後挿管し胸郭を切開して心臓を摘出、30秒以内にLangendroffによるKrebs-Henseleit buffer (37°C, pH=7.4, gassed with 95 % O₂/5 % CO₂ mixture)を用いた逆行性灌流を開始、そして左心房にもカニューラを挿入し、循環が左房から左室、そして大動脈へと流れる順行性灌流をmodified Krebs-Henseleit solution(2.5 mM Ca²⁺, 5.5mM glucose, 0.8 mMpalmitateprebound to 3% bovine serum albumin, 0.5 mM lactate and 100 □U/mL insulin)を用いて行う(寺町ら;日小循誌:1999)。順行性にするのは、通常行われる逆行性灌流で非生理的なランゲンドルフ灌流に比べ心臓でのエネルギー使用が3倍近く高いからである。灌流プロトコールは20分の有酸素灌流後、20分の虚血、そして30分の再灌流で行う。その間の圧、流量、心拍数、5分ごとに計測する。灌流終了後、心臓は灌流を続けたまま左室自由壁を速やかに液体窒素にて保存する。右室と分ける理由は低酸素による肺高血圧による右室肥大を呈するため左右の心室を分離することが必要なためである。

虚血後再灌流時の回復力低下の原因が、(1)圧及び低酸素負荷により心筋細胞膜に含まれる高度不飽和脂肪酸の率が増加し、(2)抗酸化酵素も減少しているため、(3)ROSが産生され高度不飽和脂肪酸の過酸化が亢進することで、(4)細胞障害が生じるため、であることを示す

(1)心臓における細胞膜の脂肪酸構成

<総脂質における脂肪酸構成>心筋からBligh-Dyer法にて抽出した総脂質をSep-Pack (Water社)

主要リン脂質別に分離後、単純脂質12種(飽和脂肪酸:ミリスチン酸(C14:0,炭素数:不飽和数を示す)、パルミチン酸(C16:0)、ステアリン酸(C18:0)、エイコサン酸(C20:0)、ドコサン酸(C22:0)、1価不飽和脂肪酸:パルミトイル酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、多価不飽和脂肪酸:リノール酸(C18:2)、アラキドン酸(C20:4)、エイコサペンタエン酸(C20:5)、ドコサペンタエン酸(C22:5)、ドコサヘキサエン酸(C22:6)をガスクロマトグラフィ質量分析計にて測定する(使用機種 gas chromatography (GC-17A) mass spectrometer (QP-5000) (Shimadzu)。

<リン脂質における脂肪酸構成および一次酸化物測定>細胞膜は通常脂質二重層と呼ばれる構造をつくっている。細胞膜構成の主成分であるリン脂質はsn-1, sn-2基にそれぞれひとつの脂肪酸が存在する。またミトコンドリア内膜に多く存在するカルジオリピンは、ホスファチジルグリセロールというリン脂質からカルジオリピン合成酵素により合成される脂肪酸鎖を4つ持つリン脂質である。心筋からBligh-Dyer法にて総脂質を抽出後、Sep-Pack (Water社)を用いて各種リン脂質別に分離する。分離したリン脂質をイオントラップ型質量分析計(ブルカ・ダルトニクス・esquire HCT plus)にて2つの脂肪酸を同定する及びそれぞれの脂肪酸の一次酸化物であるヒドロペルオキシドを測定(Ishida et al:RapidCommun Mass Spectrom;2004)。最終酸化物であるマロンジアルデヒドをOhkawa変法TBA法で測定する(Ando et al: Biol Pharm Bull;1995)。

(2)各種抗酸化酵素測定

Superoxide dismutase (SOD)活性はSOD AssayKit-WST (Dojindo Molecular Technologies)を、Catalase活性はcatalase assay kit(Cayman Chemical)、そしてGlutathione peroxidase (GPx)活性はGPx assay kit (Cayman Chemical)

を用いて計測する。

(3) ROS測定

OxiSelect™ ORAC & HORAC 活性測定キット (コスモバイオ) を用いて間接的に測定する。

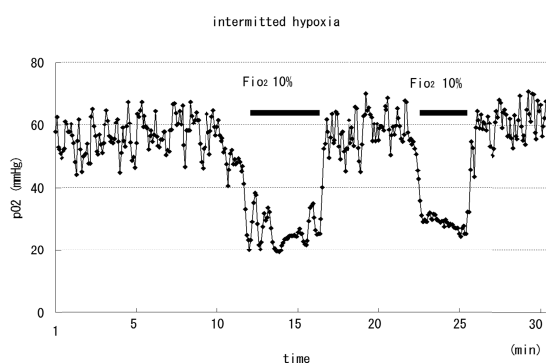
4. 研究成果

(1) 圧負荷および容量負荷心

容量負荷 2 週間では心エコー上の左室拡大は対象に比べて有意差を認めなかったが、2 週間を越えた低酸素負荷はラットの生存率が低下する可能性が高いため 2 週間で終了した。

(2) 慢性低酸素負荷

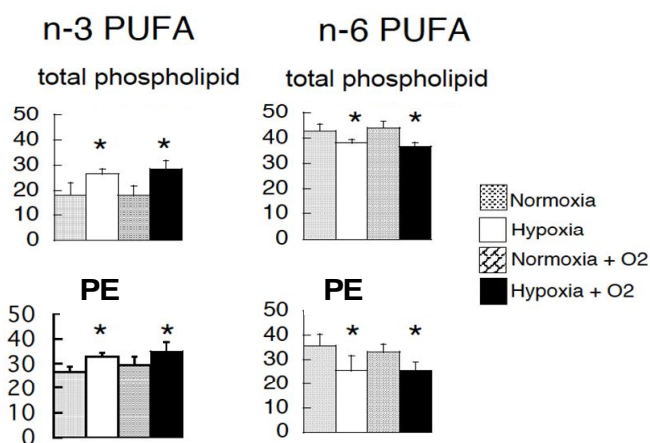
負荷手術施行後に圧縮空気と窒素の混合ガスを密閉した飼育室に送気し酸素濃度を 10% として 2 週間飼育した。この条件でラットは活動および餌摂取量の減少にともなって体重増加は 15~20% 程度減少し、生存率は 80~90% であった。この状態で心筋組織内の pO₂ を OXY LAB (Primetech Co) を用いて測定すると、心筋内酸素分圧は平均 60mmHg から 20~30mmHg へと低下した。



(3) 低酸素負荷に対する脂肪酸変化

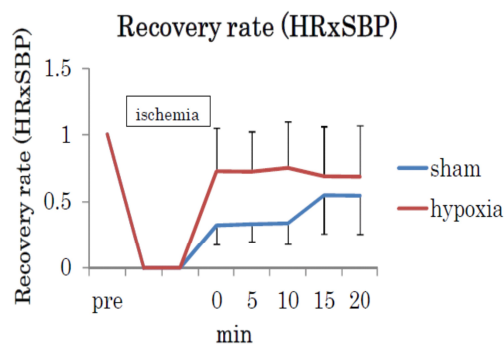
図は心筋内脂肪酸 (総脂質、ホスファチジルエタノラミン(PE)) 変化に関して示したものである。モデルは 4 週雄ラットに 10% 低酸素管理 (Hypoxia) を 2 週間行い作成。対照は room air にて管理 (Normoxia) + O₂ は 10% 低酸素後 100%

酸素負荷 12 時間を行った。n-3; 主にドコサヘキサエン酸 (C22:6、前半の数字が炭素数、後半の数字が二重結合数)、n-6; 主にリノール酸 (C18:2) とアラキドン酸 (C20:4)。結果は、n-3 系が増加、n-6 系が減少、そのうち C20:4 は変化を認めなかった。つまり、低酸素にて C18:2 から C22:6 へと構成が変化したことになる。



(4) 心臓灌流

当初、左心房への前負荷、左心室への後負荷を一定にする心臓の孤立灌流システムである working mode の確立を目指したが、虚血後再灌流時の心機能が極めて不安定で十分な効果判定が得られなかった。そこで、心臓灌流法として Langendorff mode の確立に変更した。



Langendorff 法は左心房から左心室に balloon を挿入し左室内圧を測定するもので、虚血後再灌流時の心機能が比較的安定した状態で得ることが

できた。

(5)虚血後再灌流

対象群での再灌流時心機能が虚血前の心機能の50～60%程度となる虚血時間を検討したところ、虚血時間は30分が適当と判定された。本研究での虚血時間を30分として再灌流障害について検討した。この現象はPre-conditioningの概念を導入する必要があるため、脂肪酸プロフィールの同定と脂肪酸過酸化の詳細については検討が不十分であることも踏まえて、実験計画の一部見直しを行っている。

5. 主な論文発表

Toshiyuki Itoi (2011). Myocardial Lactate Metabolism in Children with Non-Cyanotic Congenital Heart Disease, Congenital Heart Disease - Selected Aspects, P. Syamasundar Rao (Ed.), ISBN: 978-953-307-472-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/myocardial-lactate-metabolism-in-children-with-non-cyanotic-congenital-heart-disease> 2011.Dec

糸井利幸 心臓手術後乳幼児に対する経胃管単回投与によるシルデナフィル血中濃度変化 .日本小児臨床薬理学会雑誌 . 2012; 25: 124-127

糸井利幸 拡張型心筋症 .今日の小児治療指針 . 総編集 大関武彦、古川 漸、横田俊一郎、水口 雅 . 医学書院 (東京) p.488 2012.2.15

Oka T, Lam VH, Zhang L, Keung W, Cadete VJ, Samokhvalov V, Tanner BA, Beker DL, Ussher JR, Huqi A, Jaswal JS, Rebeyka IM, Lopaschuk GD. Cardiac hypertrophy in the newborn delays the maturation of fatty acid β -oxidation and compromises postischemic

functional recovery. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012 May 1;302(9):H1784-94. doi: 10.1152/ajpheart.00804.2011.

Ussher JR, Wang W, Gandhi M, Keung W, Samokhvalov V, Oka T, Wagg CS, Jaswal JS, Harris RA, Clanachan AS, Dyck JR, Lopaschuk GD. Stimulation of glucose oxidation protects against acute myocardial infarction and reperfusion injury. Cardiovasc Res. 2012 May 1;94(2):359-69. doi: 10.1093/cvr/cvs129. Epub 2012 Mar 21.

Oka T, Kato R, Fumino S, Toiyama K, Yamagishi M, Itoi T, Hamaoka K. Noninvasive estimation of central venous pressure after Fontan procedure using biochemical markers and abdominal echography. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 146(1): 153-157 (corresponding author)

Itoi T, Oka T, Terada N. Modulation of C(16:0) -ceramide in hypertrophied immature hearts by losartan. Pediatr Int. 2013; 55 (3): 272-276.

Jan 14. doi: 10.1111/ped.12052. [Epub ahead of print]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 達二郎 (OKA, Tatsujiro)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 80433283

(2) 研究分担者

糸井 利幸 (ITOI, Toshiyuki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 10264780