

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592254

研究課題名(和文) 脳死後の心機能低下におけるサバイバル蛋白の役割

研究課題名(英文) The role of survival proteins involved in myocardial dysfunction after.

研究代表者

林 行雄 (Hayashi, Yukio)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60294063

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)：ラット脳死モデルを用いて、脳死後の心機能低下のメカニズムを検討した。まず、心機能に関与するphosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)とその下流にあるAktに着目した。脳死に伴いAktのリン酸化が進み、ワルトマニンにてPI3Kを阻害することで、Aktのリン酸化は抑制され、脳死後の心機能の改善が見られた。さらに脳死に伴いフォスフォランバンのリン酸化が認められ、PI3Kの阻害薬であるワルトマニンは脳死に伴うフォスフォランバンのリン酸化の抑制を阻害した。脳死に伴い心筋細胞内においてCaイオンの心筋小胞体への取り込みが阻害され、心不全を招く要因となっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanism involved in myocardial dysfunction following brain death using rat-brain-death-model. Brain death was produced by graded inflation of a 4Fr Fogarty catheter inserted into the animal's subdural space by 300 ul of saline. The study was designed to examine the Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt signaling involved in the myocardial dysfunction after brain death. Wortmannin, an inhibitor of PI3K, improved EF and LV dp/dt max and survival rate after brain death. Another study using Western blotting showed that brain death increased phosphorylation of Akt and decreased phosphorylation of phosphoramban and wortmannin suppressed the phosphorylation of Akt and reversed the decreased phosphorylation of phosphoramban. In addition, wortmannin did not affect of level of SERCAs. These data indicate that myocardial PI3k-Akt-signaling phosphorylation and reduction of phosphorylation of phosphoramban may be involved in the myocardial dysfunction following brain death.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔科学

キーワード：脳死 心機能 フォスフォイノシトール3キナーゼ Akt フォスフォランバン

1. 研究開始当初の背景

脳死移植医療の定着につれ移植臓器の不足は社会問題化している。脳死に至れば暫時心機能が低下し、1週間で約90%が心臓死に至る。脳死後の心機能の低下のメカニズムについては脳死に伴う内因性カテコールアミンの過剰分泌がトリガーとなって全身性の炎症性反応が惹起されることが有力視されつつある。全身の炎症性反応はミトコンドリアの機能不全を招き、cytochrome Cが放出され、それは apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1)の活性化、Caspase 9 および 3 の活性化を経てアポトーシスを招く、いわゆるミトコンドリアアポトーシスパスウェイを招くと考えられている。この心筋細胞のアポトーシスの誘導が、結果として心機能不全に至ると考えられる。さらに最近の研究ではカテコールアミンの大量暴露に伴い、様々な細胞内伝達因子が活性化されることが示されている。その一つとして phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)の活性化からいわゆるサバイバルタンパクと称せられる Akt、glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)のリン酸化からミトコンドリアの mitochondrial permeability transition pore (mPTP)の閉口を招く。これがミトコンドリア機能の温存につながり、アポトーシスの抑制に働く。他領域での研究をみると、例えば敗血症ではここで示したアポトーシスに至る様々な細胞内の変化は示されている。しかし、脳死に伴う生体の反応で同様の変化がみられ、それが心機能不全に結び付くのかは現時点では明らかとなっていない。

脳死に陥ると早晩心機能が低下し最終的には心停止に至る。その過程で、もし心機能の低下を抑制することができれば、今までは医学的な理由で移植不可とされた心臓が移植医療に使える可能性がある。

2. 研究の目的

移植医療において麻酔科医はドナーの管理も行うため、ドナーの心機能をいかに維持

するかは麻酔科医にとっても大きな関心事でもある。本研究ではラットの脳死モデルを用いて、脳死に伴う心機能低下に關与する因子を検討し、その結果をもとに臨床への応用可能な治療につなげたい。

3. 研究の方法

(1) 脳死後の心機能測定：薬理的な手法による脳死後の循環動態の検討

ラットを開胸、心臓を露出、心尖部よりコンダクタンスカテーテルを左室内に挿入する。これを用いて心拍ごとの圧容積曲線を描出、パソコンによる解析で一回拍出量、駆出率、dP/dT max 等の心収縮の指標を得る。続いてフォガティカテーテルを頭蓋内に挿入し、ゆっくりバルーンを膨らませてラットを脳死に誘導し、脳死前および後の心機能の経時的な変化を検討する。測定項目としては血圧、脈拍、収縮および拡張末期左室容量、1回拍出量、心拍出量、駆出率、dP/dT max、Emaxとし、測定は脳死前、脳死後は30分ごとに脳死後6時間まで行う。本研究ではミトコンドリアの機能と脳死後の心機能の悪化の関連を検討するため、脳死に誘導直後からPI3Kの阻害薬のワルトマニン (Akt, glycogen synthase kinase 3 β 等の一連のサバイバルタンパクのリン酸化を抑制)の効果を検討する。

(2) ウェスタンブロットによる脳死後のサバイバルタンパクとファオスファランバンの解析

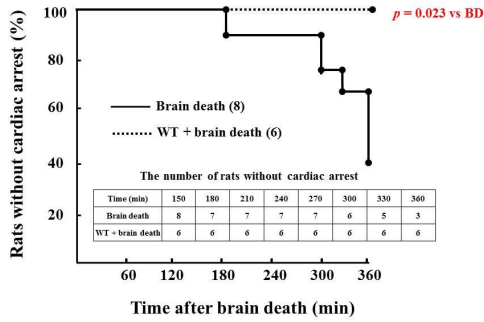
脳死導入前、脳死後3時間後および6時間後にラットの動脈より灌流液を投与し、すばやく心筋を切り取り、心筋切片を超音波破碎および遠心分離することで細胞質分画を取り出す。ウェスタンブロット(化学発光法)にてサバイバルタンパク(Akt)およびAkt下流にあるファオスファランバン及びSERCA_sのリン酸化と量的な変化を測定する。

4. 研究成果

(1) 脳死後の生存率と循環動態の変化

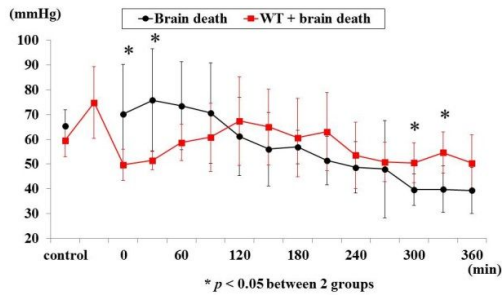
ラット脳死モデルを用いて、脳死後の生存率および循環動態の変化をコンダクタンスカテーテルを用いて、詳細に検討した。PI3Kの阻害薬であるワルトマニン(WT)は有意に脳死後の生存率を高めた。

Survival rate after brain death

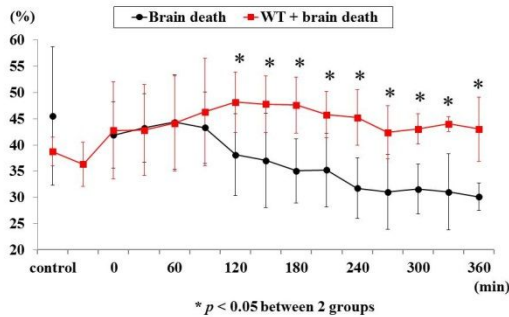


次に循環動態の指標として平均動脈圧(MAP)、Ejection fraction (EF)、LVdP/dt maxの脳死後の変化を示すが、WTの投与によりMAPには有意な変化は認められなかったが、EFおよびLVdP/dt maxは有意な改善が認められた。

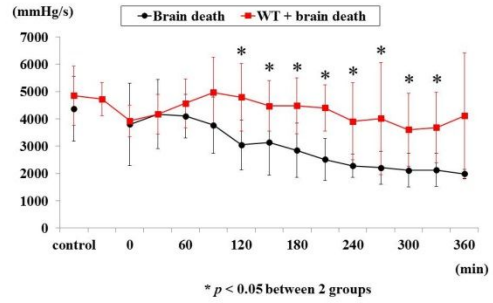
MAP



EF



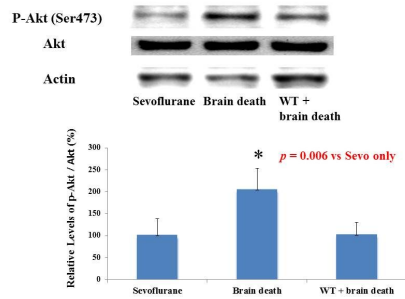
LV dp/dt max



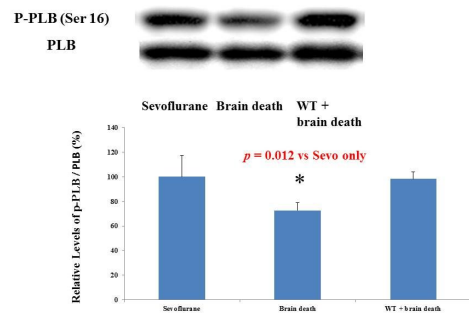
(2) ウェスタンブロット

脳死に伴いAktのリン酸化は亢進し、フォスフォランパンのリン酸化は抑制され、ワルトマニンはこれらの変化を阻害した。このときSERCAsに変化は認められなかった。

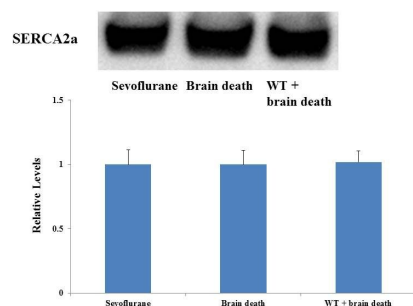
Western blotting Analysis



Western blotting Analysis



Western blotting Analysis



これらの結果から脳死による PI3K の活性化から Akt リン酸化の亢進、フォスホランバンのリン酸化の抑制が生じ、結果心筋細胞内において Ca イオンの心筋小胞体への取り込みが阻害され、心不全を招く要因となることが示唆された。さらに、PI3K の阻害薬であるワルトマニンは脳死に伴うこれらの変化を阻害し、それにより心機能の低下を抑え、脳死後の生存率の向上につながったものと思われる。

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1件)

1. Iwasaki M, Hayashi Y, Yamanaka H, Kamibayashi T, Mashimo T.
Nicorandil preserves myocardial function following brain death in rats by mitochondrial adenosine triphosphate- sensitive potassium channel-dependent mechanism. Eur J Cardiothorac Surg. Sep; 40: 710-714, 2011.
2. 林 行雄、本田絢子。脳死ドナーの管理 (臓器摘出にかかわる全身管理)。麻酔, 62: S44- S51, 2013.

〔学会発表〕(計1件)

1. Satoh M, Hayashi Y, Yamanaka H, Miyata Y, Kamibayashi T, Fujino Y. Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt signaling in myocardial dysfunction following brain death in rats. The annual meeting of the American Society of Anesthesiologists, San Francisco, California 2013.

〔図書〕(計0件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)
なし
取得状況 (計0件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

上林卓彦 (KAMIBASHI, Takahiko)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 10273640