

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月23日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659746

研究課題名（和文） 細胞老化および関連病態における虚血心保護戦略

研究課題名（英文） Ischemic heart protection strategy in cellular senescence and related conditions

研究代表者

澄川 耕二 (Koji Sumikawa)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60028660

研究成果の概要（和文）：

細胞老化に関連した病態の一つである高血糖下において心筋保護効果を発揮できる薬理的なポストコンディショニング法の開発を行った。ミルリノンは高血糖の影響を受けず、また塩酸ファスジルとレボシメンダンは薬理的なポストコンディショニングの閾値が上昇するものの投与量を増すことで心筋保護効果を得ることが出来ることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Pharmacological post-conditioning against myocardial infarction is discovered to be preserved the effect under hyperglycemia, one of the pathologic condition associated with the cellular senescence. Milrinone was not affected by hyperglycemia, and hyperglycemia raises the threshold of levosimendan and fasudil-induced postconditioning.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：細胞老化、薬理的な心筋保護法

## 1. 研究開始当初の背景

臓器虚血再灌流障害の克服のため、障害機序解明および保護手段の開発に労力が注がれてきた。その中で、短時間虚血および薬理的処置による内在性臓器保護機構の存在が明らかとなり、臨床応用が試みられている。一方、ある種の病態（加齢、高血糖状態、脂質代謝異常、肥満）において虚血再灌流障害に対する内在性臓器保護機構が障害されることが示されており、プレクリニカルスタディで効果を得た保護手段の臨床応用が制限される一因となっている。これら内在性臓器保護機構が障害される病態は、酸化ストレス増大や糖化、炎症の惹起により細胞内小器官や分子レベルの変性が引き起こされることによる“細胞老化”に関連した病態である。

細胞老化に関連した各病態は、虚血再灌流障害においてプレコンディショニング（プレコン）やポストコンディショニング（ポストコン）に関わる細胞内シグナル伝達を司るメディエーターやエフェクターの発現や活性を阻害し、臓器保護機構を障害するとされる。加齢モデルにおける保護機構障害の機序に関し、従来から虚血/薬理的プレコンの主要なメディエーターやエフェクターとして知られる細胞内構造体/蛋白の発現や活性が加齢により影響を受けることが示されている。

高血糖状態、脂質代謝異常、肥満モデルにおいて現時点でROS、NOS、NO、mito-KATPチャンネルに対する影響が内在性臓器保護作用障害に関与するとされ、これらエフェクターをターゲットとした薬理的臓器保護戦

略は各病態においても有効な保護手段となり得る事が明らかになってきている。しかし現時点で有効性が明らかになっている臨床応用可能な薬剤は、HMG-CoA還元酵素抑制による脂質代謝異常治療薬であるスタチン類、核受容体 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) に作用する糖尿病治療薬であるチアゾリジオン系抗糖尿病薬、抗酸化剤である N-acetylcysteine や Resveratrol、我々が明らかにした PDE-III 阻害薬であるオルプリノンなどごく少数である。

内在性臓器保護機構の働きを阻害する病態は加齢と同様に細胞老化をきたす病態であり、保護作用減弱機序の全容は明らかでないものの保護戦略のターゲットは前述した加齢により影響を受ける虚血/薬理学的プレコンの主要メディエータ、エフェクターと共通する。よって、高血糖状態、脂質代謝異常、肥満といった病態モデルに対し有効な臓器保護戦略は、他の細胞老化に関連した病態における臓器保護機構開発にもつながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

細胞老化に関連した病態における臓器保護機構開発を念頭に、急性高血糖ラットにおける内在性臓器保護機構の開発を臨床使用可能な薬剤で行い、その分子機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

すでに確立された *in vivo* 心筋虚血再還流モデルを用い、ラット心筋虚血モデルに対して虚血後に薬物を投与しその心筋保護効果を検討する。またその投与量が心筋保護効果に及ぼす影響も合わせて検討する。同じく虚血前よりブドウ糖投与を行い高血糖状態としたラットの心筋虚血モデルに薬物を虚血後に投与し、コントロール群と比較してその心筋保護効果を検討する。加えて心筋虚血ラットに各種阻害薬を投与し対象薬物の心筋保護作用の機序について検討する。

(1) 急性高血糖下におけるミルリノンとレボシメンダンの薬理的ポストコンディショニング

① ウィスターラットにペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔後、右内頸静脈に薬剤投与用静脈ルートを確認、右内頸動脈に圧トランスデューサーカテーテルを留置する。

② 生体監視装置を用いて動脈圧、心拍数を経時的に測定する。

③ 気管切開の上人工呼吸管理とした後に左開胸し、心臓を露出した後に肉眼的に冠動脈左前下行枝を同定し、7-0 ナイロン糸をかけ30分間の冠動脈閉塞を行い、その後120分間再還流時間を設ける。

④ 心筋虚血モデルに再灌流直前に下記各種薬剤を投与する

ミルリノン 10 (MIL10) or 30 (MIL30)  $\mu$ g/kg

レボシメンダン 3 (LEV3) or 10 (LEV10)  $\mu$ g/kg

⑤ 再灌流時間の後、冠動脈を再び閉塞した状態でパテントブルーダイを心腔内に投与し虚血危険領域を明らかにした状態で心臓を取り出し凍結保存し、その後に心筋切片を TTC 染色にて染色し梗塞領域を明らかにして、梗塞領域と虚血危険領域の面積比を求め対照群と比較する。

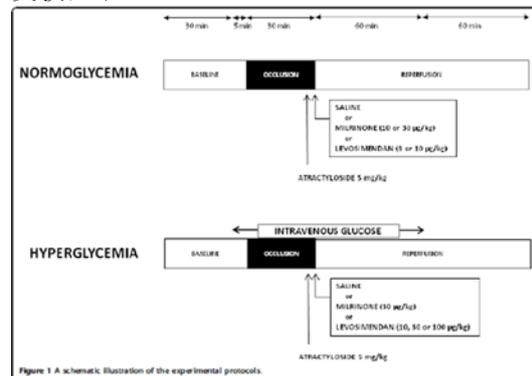
⑥ 急性高血糖ラットにおける薬理的ポストコンディショニングの影響：

内頸静脈カニューレシオン後よりブドウ糖 0.5g/hr の投与を行い、血糖  $\approx$  350 mg/dl の高血糖状態を作る (HG)。その後上記実験で得た心筋保護効果を示す薬剤の投与量でポストコンを行い、心筋保護効果への影響を検討する。

⑦ 分子機序の解明 (mPTP の関与)：

mPTP 開口薬：アトラクチロシド 5 mg/kg (ATR) を各薬剤に先立って投与しその影響を検討する。

実験タイムコース



(2) 急性高血糖下における塩酸ファスジルの薬理的ポストコンディショニング

① (1) と同様の方法でラット心筋虚血モデルを作成。

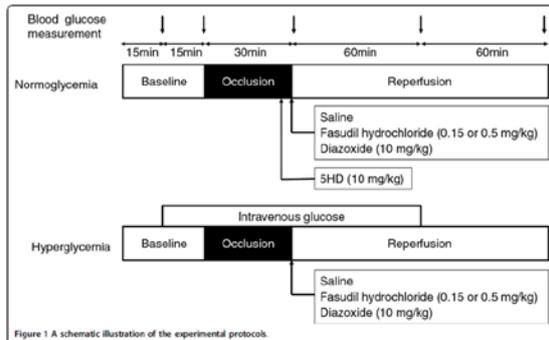
②心筋虚血モデルに再灌流直前に塩酸ファスジル 0.15 mg/kg (LF) or 0.5 mg/kg (HF) を投与

③(1)と同様に梗塞領域と虚血危険領域の面積比を求め対照群と比較する。

④(1)と同様に急性高血糖ラット (HG) を作成し、塩酸ファスジルの薬理的ポストコンディショニングへの影響を調べる。

⑤分子機序の解明 (mKATP チャンネルの役割) 高血糖ラットに対して mKATP チャンネル開口薬: ジアゾキサイド 10 mg/kg (DIA) を再灌流直前に投与し保護効果への影響を検討する。また mKATP チャンネル阻害薬: 5-hydroxydecanoic acid (5HD) 10 mg/kg を塩酸ファスジルに先立って投与し、保護効果への影響を検討する。

#### 実験タイムコース



#### 4. 研究成果

(1) 急性高血糖下におけるミルリノンとレボシメンダンの薬理的ポストコンディショニング

##### ①虚血危険領域

	Number	Area at Risk/Left Ventricle (%)
CON	14	57 ± 8
MIL10	8	51 ± 9
MIL30	9	52 ± 7
LEV3	7	56 ± 5
LEV10	9	51 ± 5
HG CON	10	50 ± 4
HG MIL30	7	53 ± 3
HG LEV10	9	52 ± 7
HG LEV30	7	56 ± 5
HG LEV100	7	50 ± 10
ATR	6	51 ± 4
MIL30 + ATR	8	48 ± 5
LEV10 + ATR	7	48 ± 8
HG MIL30 + ATR	7	48 ± 8
HG LEV100 + ATR	9	51 ± 4

Data are mean ± SD.

CON = control; MIL10 or 30 = 10 or 30 µg/kg milrinone; LEV 3, 10, 30 or 100 = 3, 10, 30 or 100 µg/kg levosimendan; HG = hyperglycemia; ATR = atactylsilde.

各群に有意差を認めなかった。

②ミルリノンとレボシメンダンの心筋保護効果

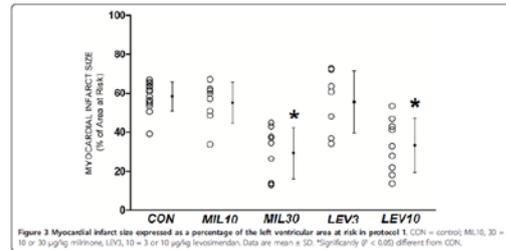


Figure 3 Myocardial infarct size expressed as a percentage of the left ventricular area at risk in protocol 1. CON = control; MIL10, 30 = 10 or 30 µg/kg milrinone; LEV3, 10 = 3 or 10 µg/kg levosimendan. Data are mean ± SD. \*Significantly (P < 0.05) different from CON.

MIL 30 と LEV 10 は対照群と比較し心筋保護効果を示した。

③急性高血糖ラットにおけるミルリノンとレボシメンダンの心筋保護効果

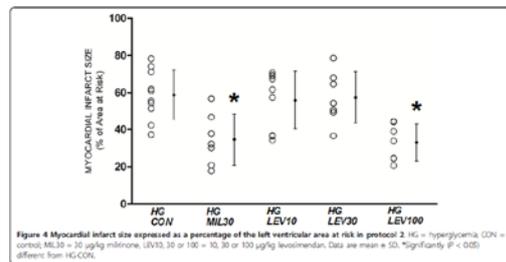


Figure 4 Myocardial infarct size expressed as a percentage of the left ventricular area at risk in protocol 2. HG = hyperglycemia; CON = control; MIL30 = 30 µg/kg milrinone; LEV30, 100 = 10, 30 or 100 µg/kg levosimendan. Data are mean ± SD. \*Significantly (P < 0.05) different from HG CON.

急性高血糖下において LEV 10 の心筋保護効果は抑制されたものの LEV 100 では心筋保護効果が得られた。一方、MIL 30 の心筋保護効果は抑制されなかった。

④ミルリノンとレボシメンダンの心筋保護効果における mPTP の役割

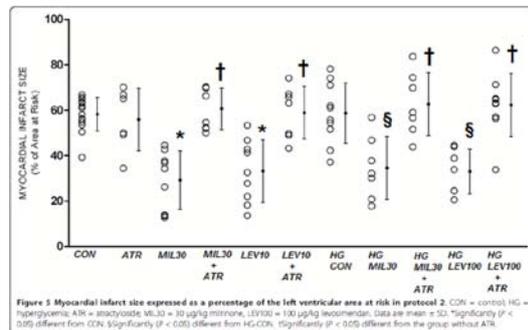


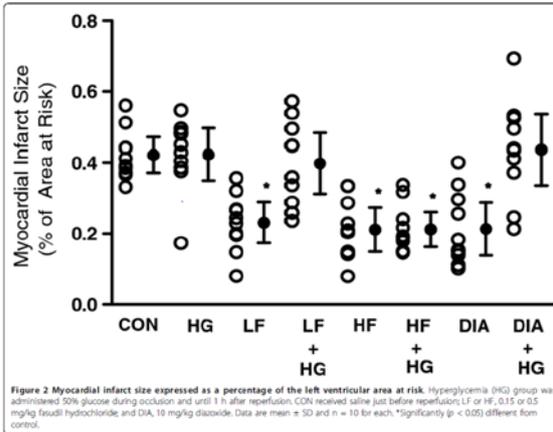
Figure 5 Myocardial infarct size expressed as a percentage of the left ventricular area at risk in protocol 2. CON = control; HG = hyperglycemia; ATR = atactylsilde; MIL30 = 10 µg/kg milrinone; LEV100 = 100 µg/kg levosimendan. Data are mean ± SD. \*Significantly (P < 0.05) different from CON; †Significantly (P < 0.05) different from HG CON; ‡Significantly (P < 0.05) different from the group without ATR.

ミルリノンとレボシメンダンの心筋保護効果は mPTP 開口薬であるアトラクチロシドにより抑制された。

結論: ミルリノンとレボシメンダンの薬理的ポストコンディショニングは mPTP の開口抑制を介している。急性高血糖下においてレボシメンダンの薬理的ポストコンディショニングの閾値が上昇するが、ミルリノンの薬理的ポストコンディショニングは高血糖の影響を受けない。

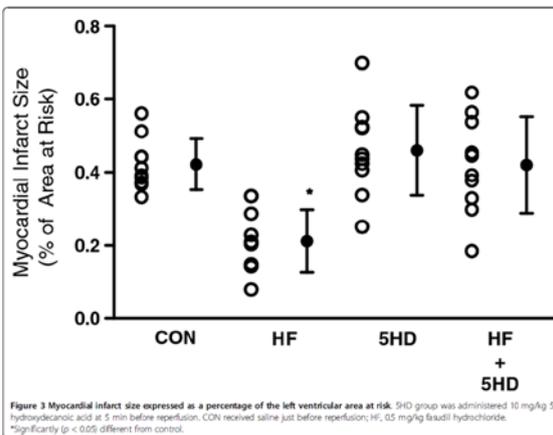
(2) 急性高血糖下における塩酸ファスジルの薬理的ポストコンディショニング

① 塩酸ファスジル、ジアゾキサイドの心筋保護効果と高血糖の影響



低用量、高用量塩酸ファスジルの投与は共に心筋保護効果を示した。また低用量塩酸ファスジルの心筋保護効果は高血糖下において抑制されたが、高用量塩酸ファスジルの心筋保護効果は高血糖下においても維持された。ジアゾキサイドの心筋保護効果は高血糖下において抑制された。

② 塩酸ファスジルの心筋保護効果におけるmKATPチャネルの役割



高用量塩酸ファスジルの心筋保護効果は5HDの投与により抑制された。

結論：塩酸ファスジルの薬理的ポストコンディショニングはmKATPチャネルの活性を介している。高血糖下において塩酸ファスジルの薬理的ポストコンディショニングは抑制されるが、高用量投与により保護効果を得ることが出来る。

総括：臨床使用可能な薬剤を用いて、高血糖下においても効果を得ることが出来る薬理的ポストコンディショニング法の開発を行った。今後はこれらの薬剤を中心に更なる機序の解明を行い、細胞老化に関連した他の病態における心筋保護法の開発を進めていく。

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2件)

① Cardiovasc Diabetol. 2012 Jan 12;11:4. doi:10.1186/1475-2840-11-4.

Hyperglycemia raises the threshold of levosimendan- but not milrinone-induced postconditioning in rat hearts.

Matsumoto S, Cho S, Tosaka S, Higashijima U, Maekawa T, Hara T, Sumikawa K.

② Cardiovasc Diabetol. 2012 Mar 22;11:28. doi: 10.1186/1475-2840-11-28.

High-dose fasudil preserves postconditioning against myocardial infarction under hyperglycemia in rats: role of mitochondrial KATP channels.

Ichinomiya T, Cho S, Higashijima U, Matsumoto S, Maekawa T, Sumikawa K.

[学会発表] (計2件)

① Shuhei Matsumoto, Koji Sumikawa, et al. Interaction of remote ischemic preconditioning with anesthetics in rat hearts. Anesthesiology 2012/10/16(アメリカ)

② Koji Sumikawa, Taiga Ichinomiya, et al. High-dose fasudil preserves postconditioning against myocardial infarction under hyperglycemia in rats: role of mitochondrial KATP channels, World Congress of Anesthesiologists 2012/4/22(トルコ)

[図書] (計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

該当なし

○取得状況(計0件)

該当なし

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

澄川 耕二 (KOJI SUMIKAWA)  
長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・教授  
研究者番号：60028660

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし