

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790286

研究課題名(和文) ポストコンディショニングによる虚血心筋細胞保護機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of Postconditioning: JAK/STAT pathway is linked to mitochondrial ATP-sensitive potassium channels

研究代表者

西田 洋文(Nishida, Hirofumi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80513043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：虚血心筋保護、特にポストコンディショニングにおいてミトコンドリア内膜に存在するATP感受性K⁺(mitoKATP)チャネルとSAFE (Survivor activating factor enhancement)系とよばれるJAK/STAT系が重要な役割を担っている。本検討では、JAK/STAT系を活性化するIL6を用いて薬理的ポストコンディショニングを生じさせ、SAFEの下流でmitoKATPチャネルが効果器として働いていることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ (mKATP) channels and SAFE (Survivor activating factor enhancement, JAK/STAT) pathway have been proposed to play a key role in cardioprotection. To explore possible mechanistic links between mKATP channel and SAFE pathway, we measured infarct size after ischemia/reperfusion in rabbit hearts and mitochondrial flavoprotein (FP) fluorescence in rabbit ventricular myocytes using IL6 (JAK activator). Treatment with IL6 after lethal ischemia significantly reduced the infarct size. This infarct size-limiting effect was abolished by the mKATP channel blocker 5-hydroxydecanoate (5HD) or STAT3 inhibitor STATTIC. IL6 augmented the mKATP channel opener-induced FP oxidation. This effect of IL6 was prevented by STATTIC or 5HD. These results indicate that IL6 potentiates the opening of mKATP channels in a STAT3-dependent manner and further suggest that infarct size-limiting effect of IL6 is mediated, at least in part, by activation of mKATP channels.

研究分野：循環薬理

キーワード：心筋保護 ミトコンドリア ATP感受性Kチャネル SAFE

1. 研究開始当初の背景

(1) プレコンディショニングは、非致死的な短時間の虚血や薬物を、致死的な虚血の前に記憶期間において与えておく心筋保護が得られる現象であり、そのメカニズムについては極めて多くの研究がなされ、我々の研究室でも心筋細胞のミトコンドリア内膜に存在する ATP 感受性 K⁺ チャンネル (mitoKATP チャンネル) が心筋プレコンディショニングにおいて中心的な役割を果たしていることが報告されてきた。

(2) しかしながらプレコンディショニングは心臓手術など待機的に治療を行える際には有用かもしれないが、それ以外でははっきりとした虚血の開始時が予想できないため臨床応用が限られることが問題になっている。

(3) 2003 年に Vinten-Johansen らの研究グループより致死的な虚血の再灌流初期にプレコンディショニングと同様の短時間虚血を繰り返すことで心筋傷害の軽減が認められるとの報告がなされ、この治療戦略をポストコンディショニングと呼んでいる。近年ポストコンディショニングのメカニズムに関して研究が進められており、Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) といわれる JAK/STAT 系 (J Mol Cell Cardiol, 2009) に注目が及んでいる。

(4) しかしながら、SAFE に関して心筋保護効果を発揮する際に効果器として働く下流が不詳であることから、その効果器の候補として mitoKATP チャンネルの可能性も考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、mitoKATP チャンネルと STAT3 のクロストークに着目して、ポストコンディショニングから心筋保護へいたる細胞内シグナル伝達機構を解明することを目的とした。

(2) そこで JAK/STAT 系を活性化するサイトカイン IL6 を用いて、SAFE が薬理的ポストコンディショニングを発揮するか否かを、そのシグナル伝達に関して mitoKATP チャンネルが関与するか否かを、それぞれフラボプロテイン自家蛍光測定、ウサギ Langendorff 灌流心を用いた虚血・再灌流モデルでの心筋梗塞サイズ測定によって検討した。

3. 研究の方法

(1) ウサギ Langendorff 心における虚血・再灌流モデル

ウサギに耳介静脈より pentobarbital 30mg/kg 投与し、心臓を摘出した。

摘出心 Langendorff 装置に懸架し、大動

脈に挿入したカニューレより冠動脈へ Krebs-Henseleit 液を 25-30ml/min の流量で灌流した。灌流圧は 40mmHg 以上に設定した。

心機能評価のため、左房経路でカテーテル付きバルーンを左室内に挿入し左室内圧を測定し、得られた左室内圧波形より心拍数・左室駆出圧 (LVDP) ・最大収縮力 (+dP/dtmax) を算出した。

図 1 のようなプロトコルで、30 分虚血 120 分再灌流を行なった。薬剤を投与しない Control 群、虚血後の再灌流早期に 10 分間 IL6 (10 ng/ml) を投与した群、IL6 と同時に mitoKATP チャンネル遮断薬である 5-hydroxydecanoate (5HD, 500 μM) を投与した群、同様に STAT3 阻害薬である STATTIC (20 μM) を投与群に分けて検討した。

再灌流後の心臓を 6-7 切片に横断面で切断し、1% の 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride 溶液で染色した。染色後各切片の赤く染色しなかった部分の面積を梗塞面積とし、総面積との割合を算出した。この梗塞面積比に各切片の重量を掛けて梗塞重量とし、心臓全体の重量に対する梗塞重量の割合 (%) を算出した。

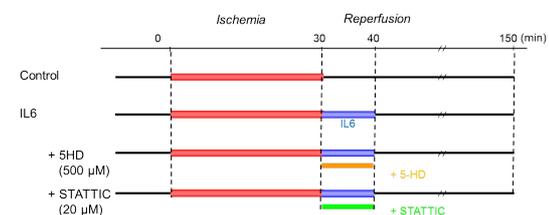


図1: 実験プロトコル

(2) フラボプロテイン自家蛍光反応

ウサギの心室筋細胞をコラゲナーゼ処理により単離した後、培養液に保存して実験に供した。ミトコンドリアの酸化還元状態を安定させるため、単離した心室筋細胞を培養液 (5% ウシ血清を含む DMEM) に少なくとも 3 時間以上保存した。

MitoKATP チャンネル活性化の指標としてフラボプロテイン自家発光を測定した。チャンネルの開口により K⁺ が細胞質からマトリックスへ流入すると、呼吸鎖における H⁺ の排出が促進されるためフラボプロテインの酸化反応が亢進して蛍光が増強する。このときのフラボプロテイン自家蛍光を励起波長 480 nm、測光波長 530 nm にて測定した。

心室筋細胞を蛍光顕微鏡ステージに置いたチャンバーに載せ、glucose を含まない HEPES Tyrode 液にて灌流し、mitoKATP チャンネル開口薬 diazoxide (100 μM) を前投与したうえで IL6 の蛍光反応を観察した。

蛍光強度はミトコンドリア内を完全に酸化する脱共役剤である 2,4-dinitrophenol (DNP, 100 μM) を実験終了時に添加して、最大酸化反応を起こした時のフラボプロテイン自家蛍光を 100% とした相対値で表示した。

MitoKATP チャンネルの遮断薬として 5HD、STAT3 阻害薬として STATTIC を使用した。

(3) 統計処理：各実験で得られた実験的数値は平均値 ± 標準誤差で表し、実験数および細胞数は n で表した。統計学的検討には EXCEL (Microsoft, 米国) を用いて、各群に対して t 検定もしくは ANOVA を行った。有意差は P < 0.05 とした。

4. 研究成果

(1) 虚血・再灌流心モデル

左室内圧機能解析

虚血前の左室駆出圧 (LVDP) および心拍数、最大収縮力 (+dP/dtmax) は各群で有意差はなかった。再灌流 2 時間後の各パラメータでは control 群に比して IL6 群では有意に LVDP および +dP/dtmax の改善を認めた。この IL6 による機能改善効果は 5HD、STATTIC 投与により消失した(表 1)。

Study Groups	n	Before Ischemia			After Reperfusion		
		Heart Rate beats/min	LVDP mmHg	+dP/dt mmHg/s	Heart Rate beats/min	LVDP mmHg	+dP/dt mmHg/s
Control	5	163 ± 27	83 ± 2	1532 ± 214	171 ± 9	45 ± 6	945 ± 264
IL6	5	161 ± 17	80 ± 1	1621 ± 144	166 ± 9	72 ± 4*	1511 ± 146*
+ 5HD	5	165 ± 3	84 ± 3	1644 ± 143	175 ± 11	43 ± 1	1083 ± 17
+ STATTIC	5	170 ± 47	77 ± 5	1688 ± 224	165 ± 35	39 ± 7	1113 ± 148

*p < 0.05 VS control

表 1: 左室機能解析

以上のことから、機能面において IL6 は虚血再灌流障害に対して保護的に働くことが示唆され、その効果発揮において mitoKATP チャンネル開口と JAK/STAT 系の活性化が関与していることが示唆された。

梗塞サイズ

図 2 に示すように、IL6 の虚血後 10 分間適用により梗塞サイズは減少した (38 ± 2%、n = 5) となり、control 群の 63 ± 2% (n = 5) に比して有意に減少した。そしてその梗塞サイズ減少効果は、mitoKATP チャンネル遮断薬である 5HD (63 ± 5%、n = 5) や STAT3 阻害薬である STATTIC (61 ± 3%、n = 5) で抑制された。

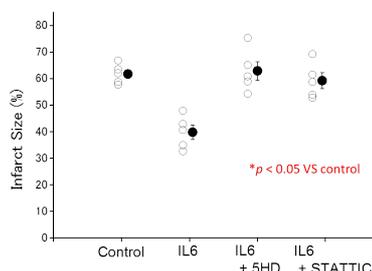


図 2: 心筋梗塞サイズ

以上のことから、IL6 が心筋梗塞減少効果を発揮する際に mitoKATP チャンネル開口と JAK/STAT 経路の活性化の両方が関与してい

ることが示唆された。

(2) フラボプロテイン自家蛍光測定

図 3 に示すように IL6 単独では 10ng/ml と 30ng/ml と濃度をあげても直接的な自家蛍光反応増強を認めることはなく、mitoKATP チャンネルへのダイレクトな開口作用は認められなかった。

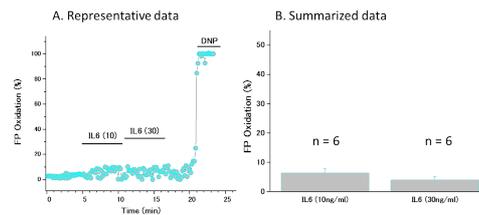


図 3: IL6 の直接的蛍光反応

しかし図 4 に示すように mitoKATP チャンネル開口薬である diazoxide (100 μM) をまえて作用させることで simulated ischemia の状態にし (22 ± 3%、n = 6)、そのうえで IL6 (10 ng/ml) を作用させるとフラボプロテイン蛍光がさらに有意な蛍光増強を認めた (41 ± 5%、n = 6、P < 0.05)。この IL6 によるフラボプロテイン酸化反応増強効果は、mitoKATP チャンネル遮断薬である 5HD によって完全に消失した (5 ± 2%、n = 6)。

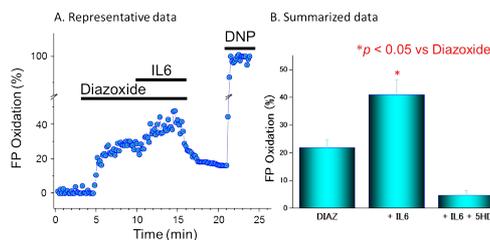


図 4: Diazoxide 存在下での蛍光反応

また、STAT3 阻害剤である STATTIC 存在下で同様の検討を行ったところ、図 5 に示すように IL6 で増強された部分の増強効果だけが消失し、diazoxide による蛍光増強は消失しなかった。

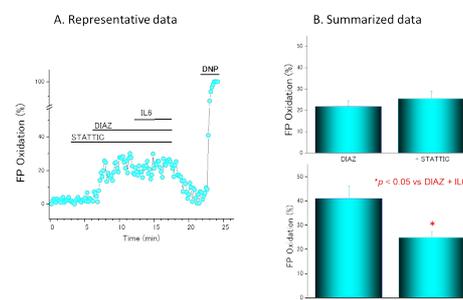


図 5: STAT3 阻害剤存在下での蛍光反応

これらの結果より IL6 が JAK/STAT 系を活性化し、その下流で mitoKATP チャンネル開口を

増強したと示唆された。

(3) 考察

本検討では IL6 の心筋保護機構に mitoKATP チャンネル経路の上流に JAK/STAT 経路が関与していることを示した。JAK/STAT 経路と mitoKATP チャンネル開口にリンクがあることまた、そのことがポストコンディショニングという心筋保護効果と関連していることを示唆する報告は我々が調べる範囲では初めてである。

近年、心筋細胞保護に重要と考えられるのは protein kinase C- (PKC-) ならびに RISK 経路と呼ばれている PI3K-Akt を介したシグナル経路そして、今回検討した SAFE 経路と呼ばれる JAK/STAT 系である。特にポストコンディショニングにおいては SAFE 経路の活性化が注目されている。これらの細胞内シグナルの下流にあって心筋細胞を保護する機序として mitochondrial permeability transition pore (mPTP) の抑制と心筋ギャップ結合透過性の抑制がある。mPTP は細胞内 ATP の低下や Ca²⁺ 過負荷、酸化ストレスなどの要因によりミトコンドリア内膜に形成される非特異的なチャンネルであり、mPTP の開口はミトコンドリアの不可逆的障害をもたらすことから細胞死の基本的な機序のひとつと考えられている。mitoKATP チャンネルは mPTP 開口の誘因であるミトコンドリア Ca²⁺ 過負荷を抑制するばかりでなく、mPTP 開口閾値を上昇させるとの報告がある。これらを踏まえ、本検討より、図6のような心筋保護、特にポストコンディショニングにおける細胞内機が考えられる。

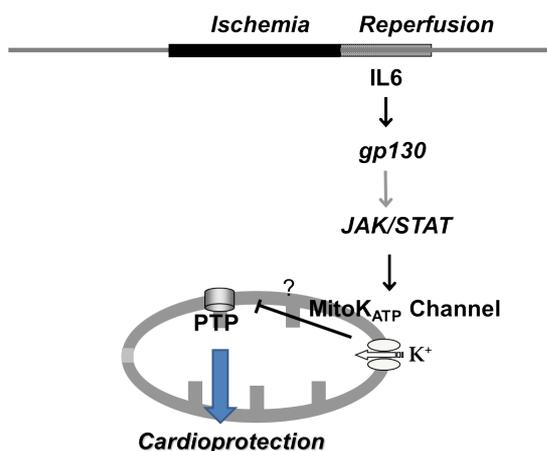


図6: SAFEによる心筋保護メカニズム

MitoKATP チャンネルはミトコンドリア内膜電位を脱分極させ、Ca²⁺の driving force を減少させるのでミトコンドリア内 Ca²⁺過負荷を抑制していることが知られており、それゆえ図6のような細胞内機構が考察されている。しかし、同様のメカニズムをもつもう一つの

ミトコンドリア内膜に存在する K⁺チャンネルである Ca²⁺活性化 K⁺チャンネルというものが存在し、このチャンネルの活性化が生じているか否かを検討すれば、図6の仮説を裏打ちできたと考えられ、将来的な検討が必要であると考えられる。

虚血性心疾患に対して経皮的冠動脈形成による再灌流療法が主流になっており、その後の虚血性心筋症による慢性心不全が問題となっている本邦では特に、ポストコンディショニングという治療戦略は重要なオプションとなりうる。本検討で細胞内機構がいくばくか解明できたことで今後の臨床的な心筋保護薬の開発につながることを期待する。

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)

[学会発表](計 4 件)

西田洋文、丸山浩央、中谷晴昭

Intracellular mechanism underlying IL6-mediated cardioprotection 第88 日本薬理学会年会 2015年3月18日~20日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

小島章光、西田洋文、松本明朗、岩田和実、白山武司、矢部千尋、中谷晴昭 A protective roll of NOX1/NADPH oxidase in a mouse model with hypoxia-induced sinus bradycardia 第87回日本薬理学会年会2014年3月19日~21日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

西田洋文、丸山浩央、松本明朗、中谷晴昭 ミトコンドリア Ca²⁺活性化 K⁺チャンネル活性化を介した endocannabinoid の心筋保護作用 第29回日本心電学会学術集会 2012年10月12日~13日 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

西田洋文、丸山浩央、松本明朗、中谷晴昭 Oxytocinの心筋保護機構における ATP感受性 K⁺チャンネルの役割 第29回日本心電学会学術集会 2012年10月12日~13日 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 洋文 (NISHIDA HIROFUMI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 80513043