

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791681

研究課題名(和文) 麻酔プレコンディショニングがミトコンドリアイオンチャンネルに与える影響

研究課題名(英文) Effects of anesthetic-induced preconditioning on mitochondrial ion channels

研究代表者

丹保 亜希仁 (Tampo, Akihito)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80531524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：心筋の虚血/再灌流障害の機序として、カルシウムオーバーロードは重要である。細胞外からのカルシウムの取り込みにより賦活されるリアノジンレセプターはこの現象に関与する。ミトプラストから数種類のコンダクタンスの電流が記録された。これらの中にミトコンドリアのリアノジンレセプターが含まれている可能性が考えられた。心筋細胞のナトリウムチャンネル電流を記録した。APCによりナトリウム電流は有意に増加した。またチャンネル不活性化曲線も有意にシフトした。不活性化からの回復もAPCにより有意に早くなった。ナトリウムチャンネル蛋白の発現量はAPCで有意に増加した。これらの変化は活動電位時間にほとんど影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：We studied electrophysiological profiles of mitochondrial ion channels, which are known as important factors in anesthetic-induced preconditioning. Calcium overload is crucial mechanism to trigger cardiac ischemia/reperfusion injury. Ryanodine receptors play an important role as a mediator of calcium-induced calcium release in myocytes. We found several types of mitochondrial ion channels, and one of them may be mitochondrial ryanodine receptors. Cardiac sodium current was also recorded. APC resulted in the increase of the sodium current density. This change was correlated with the increase of the sodium channel expression. The steady-state inactivation curve was significantly shifted toward depolarizing direction, and recovery from inactivation was significantly accelerated. These electrophysiological changes by APC did not affect the action potential simulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：周術期管理学

キーワード：麻酔プレコンディショニング ミトコンドリア ナトリウムチャンネル 虚血再灌流傷害

1. 研究開始当初の背景

短時間、可逆性の心筋虚血の繰り返しによりもたらされる心筋のプレコンディショニング作用 (Ischemic Preconditioning; IPC) は 1986 年に Murry らにより発表された心筋保護作用である (Murry CE et al. *Circulation* 1986;74:1124-36)。その後、吸入麻酔薬による心筋プレコンディショニング作用 (Anesthetic-induced preconditioning; APC) が IPC と同様の心筋保護作用をもたらす研究が 1997 年に Kerstern らにより報告された (Kerstern JR et al. *Anesthesiology* 1997;87 : 361-370)。APC の効果は、最初に心筋梗塞巣の縮小が証明され、その後に APC 発現の機序として G 蛋白、プロテインキナーゼ C、プロテインタイロシンキナーゼ、Reactive Oxygen Species (ROS)、Nitric Oxide (NO) などの細胞内情報伝達系への作用が報告されてきた (De Hert SG et al. *Anesth Analg.* 2005;100:1584-93)。また、パッチクランプ法を用いた細胞膜上の ATP 感受性カリウム (sarcK_{ATP}) チャンネルや、電位依存性イオンチャンネルに対する APC の効果についての研究も発表されている (Stadnicka A et al. *Anesthesiology* 2006;97:1209-1217, Tampo A et al. *Br J Pharmacol.* 2008; 156(3):432-43)。近年の報告では、ミトコンドリアが APC の心筋保護効果における重要な役割を担っているとの考えが主流になってきている。ミトコンドリアを介する APC の効果発現機序としては、ミトコンドリアの Ca²⁺過負荷の減少、膜電位の保持、およびアポトーシスの抑制などが報告されている (Ljubkovic M et al. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292 : C1583-1590)。これらのメカニズムに関するミトコンドリアに存在するイオンチャンネル、トランスポーターとしては、Ca²⁺依存性カリウム (mitoK_{Ca}) チャンネル、ATP 感受性カリウム (mitoK_{ATP}) チャンネル、mitochondrial permeability transition pore (mPTP)、multiconductance チャンネ

ルなどがある (O'Rourke B et al. *Physiology* 2005;20:303-315)。また、心筋虚血による致死性不整脈 (心室頻拍、心室細動など) に関与するチャンネル (inner membrane anion channel; IMAC) もミトコンドリア内膜に存在することが知られている。しかし、これらの研究はミトコンドリア内の Ca²⁺濃度や膜電位の測定、あるいは選択的ブロッカーの使用による心筋梗塞巣の縮小や抗不整脈作用といったプレコンディショニング作用の消失を証明するなどの、チャンネルの作用の間接的な観察である。また電気生理学的研究としては、人工的に作製した脂質二重膜にミトコンドリアから抽出したチャンネル蛋白を発現させてチャンネル電流を記録したものがある (Jiang MT et al. *Anesth Analg.* 2007;105:926-932)。近年は、ミトコンドリア上に存在するネイティブのイオンチャンネルの活動と APC の関連性について直接的に観察した研究は現在のところ報告されていない。しかし、これまでの研究から、APC による心筋保護作用におけるミトコンドリアイオンチャンネルの関与は上記のとおり明らかである。パッチクランプ法を用いた APC の作用発現に関わる種々のミトコンドリアイオンチャンネルの今回の研究は、今後 APC のメカニズムを明らかにしていく上で新しく、重要な分野である。

2. 研究の目的

APC の心筋保護作用に重要な役割を果たしているミトコンドリアのイオンチャンネルのほとんどはその内膜に存在することがわかっている (O'Rourke B et al. *Physiology* 2005;20:303-315)。そこで、これらのイオンチャンネルの活動を観察するためにミトコンドリアの外膜を取り除いたもの (マイトプラスト) を作製し、パッチクランプ法を用いて直接的にチャンネルの電気生理を観察する。マイトプラストの作製には、内膜への薬理学的影響が少ないと考え

られる Osmotic Shock を利用する方法を用いる。また、現在のところ、ミトコンドリアに存在する、各々のイオンチャネルを確実に isolation して記録する方法は確立されていない。これは、ミトコンドリアのチャネルのイオン選択性が細胞膜上のチャネルに比べて低いことが一因である。今回の研究では、これまでの報告におけるチャネルのコンダクタンスおよび、それぞれのチャネルの選択的ブロッカーを用い、さらに各々のチャネルに対して最適な実験溶液のイオン組成を見つけ出すことも大きな目的である。各々のチャネルの同定に引き続き、それらの電気生理学的特徴を研究する。さらに、各々のチャネルに対する APC の作用について、*in vivo* APC モデル (研究計画・方法参照) を用いて APC のミトコンドリアイオンチャネルに対する作用を解明することが目的である。また、虚血/再灌流による心筋細胞傷害のトリガーは、カルシウムオーバーロードである。この現象の機序として、先行するナトリウムオーバーロードの関与が報告されている。近年、虚血/再灌流傷害を起こす最終段階であるミトコンドリアの研究が多い中で、ナトリウムオーバーロードの関連性についての重要性が高まると考えられる。虚血/再灌流傷害の起こった心筋から分離した心筋細胞では、ナトリウムチャネル電流が抑制されると報告されている。しかし、この事実とナトリウムオーバーロードの関連性は不明である。心筋細胞ナトリウムチャネル、ナトリウム/カルシウム交換系などの細胞内ナトリウム調節系と、カルシウムオーバーロード、さらに細胞死までのエピソードについての研究は虚血/再灌流傷害、それを抑制する麻酔プレコンディショニングの分野で興味深い。細胞膜上ナトリウムチャネルと APC の関連についても研究を行う。

3 . 研究の方法

1) ミトコンドリアの単離

十分な麻酔下にラットの心臓を摘出し、氷上でマンニトール - スクロース (MS) 溶液内にて心室筋を細かく刻んだ後にホモジエナイズする。その後、ミトコンドリアを単離するために、低速および高速で遠心分離を行う (4) 。単離されたミトコンドリアは MS 溶液中にて氷上で保存する。

2) マイトプラストの作製

マイトプラストは Osmotic Shock を利用して作製する (次ページ、Figure 1 参照) 。1) で得られたミトコンドリアの浮遊液を低浸透圧溶液中に入れ 5 分間の Osmotic Shock を与えた後、遠心分離を行い (4) マイトプラストを抽出する。得られたマイトプラストは高浸透圧溶液中にて氷上で保存する。

3) 心筋細胞の単離

十分な麻酔下にラットの心臓を摘出する。この際、上行大動脈を 5mm 程度残した状態で切離する。ランゲンドルフ装置上で、上行大動脈から逆行性に心臓を酵素溶液で環流させる (38 , 12 ~ 15 分) 。その後、心室筋を切離し細かく刻んだ後にホットバスにて振盪させる (38 , 5 ~ 8 分) 。低速で遠心分離後に上澄を破棄し、Tyrode 溶液で攪拌する。この作業を 2 回行い心筋細胞は 22 の Tyrode 溶液内で保存する。

4) パッチクランプ法

< チャンネル電流の計測 >

マイトプラスト電流は、室温下でシングルチャネルモード (inside-out patch) を用いて行う。心筋細胞のイオンチャネル電流は whole-cell mode を用いて記録する。Step-up protocol を用いてチャネル電流を記録する。

4 . 研究成果

マイトプラストは、ミトコンドリアへの Osmotic Shock を利用して作製、浮遊液を低浸透圧溶液中に入れ 5 分間の Osmotic Shock を与えた後遠心分離を行い (4) マイトプラストを抽出した。記録は cell-attached mode 及び inside-out mode にて行った。心筋の虚血/再灌流障害を引き起こす機序として、カルシウムイオンの細胞内での増加 (カルシウムオーバーロード)

は非常に重要である。細胞外からのカルシウムの取り込みにより賦活されるリアノジンレセプターの役割はこの現象に關与している。150mMのCsClを電極内、記録チャンバー内に使用し電流を記録したところ数種類のコンダクタンスの電流が記録された。これらの中にミトコンドリアのリアノジンレセプターが含まれている可能性が考えられた。

心筋細胞のナトリウムチャンネル電流の記録を行った。APCによりナトリウム電流は有意に増加した(1.53倍)。またチャンネル不活性化曲線も有意にシフトし、電流が1/2となる平均電圧は-78.9から-74.5mVへと増加した。不活性化からの回復もAPCにより有意に早くなった。また、ナトリウムチャンネル蛋白の発現量はAPCで有意に増加した。これらの変化は活動電位時間にほとんど影響を与えなかった。

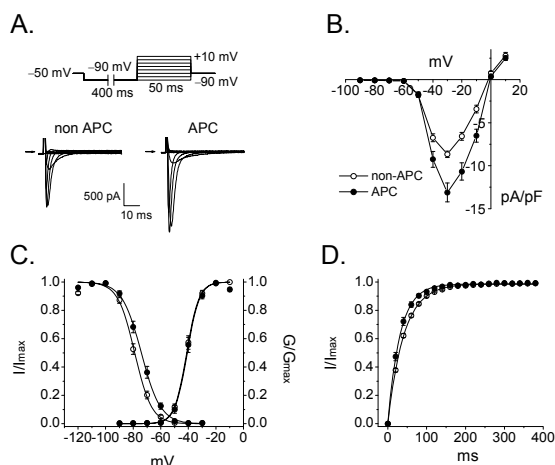


図1. ナトリウム電流へのAPCの影響
 A. Sodium current (左 non-APC, 右 APC)
 B. Current-voltage relationship.
 C. Activation and inactivation curves.
 D. Recovery from inactivation curve.

表1. ナトリウム電流へのAPCの影響

	non-APC	APC
Peak I_{Na} density (pA/pF)	-8.6 ± 0.4	$-13.2 \pm 1.0^*$
Steady-state activation		
$V_{1/2}$ (mV)	-41.2 ± 0.8	-40.7 ± 0.9
k	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.2
Steady-state inactivation		
$V_{1/2}$ (mV)	-78.9 ± 1.0	$-74.5 \pm 1.4^*$
k	5.8 ± 0.1	6.2 ± 0.2
Recovery from inactivation		
tau (ms)	40.5 ± 1.5	$31.5 \pm 2.8^*$

*P<0.05 vs non-APC

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
 出願状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
 丹保亜希仁(TAMPO AKIHITO)
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号：80531524

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：