

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 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：2012～2014

課題番号：24590284

研究課題名(和文) 虚血再灌流障害に対するプレおよびポストコンディショニング効果発現差異の解明

研究課題名(英文) Effect of preconditioning and postconditioning on ischemic/reperfusion injury

## 研究代表者

鎌田 和浩 (Kamada, Kazuhiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80616350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：虚血再灌流(I/R)に伴う組織障害が、短時間の虚血を長時間の虚血に先行させて行うと軽減することは虚血プレコンディショニング(IPC)とともに長時間の虚血直後にIPCの際の先行虚血よりもさらに短い時間のI/R負荷により、障害を軽減する虚血ポストコンディショニング(IPoC)効果が報告されている。本研究は、マウスの小腸I/R障害モデルを用いて小腸におけるIPCおよびIPoC抗炎症効果の評価することとした。I/R群は組織学的な粘膜障害や炎症細胞浸潤の指標であるMPO活性は上昇し、IPC群ではそれらは低下した。またIPoC群ではIPC群に比し、効果は低いものの粘膜局所での障害は減弱した。

研究成果の概要(英文)：I/R injury is reduced by preconditioning with brief periods of vascular occlusion (ischemic preconditioning: IPC). Ischemia followed by also more short periods of reperfusion immediately after the ischemia and just before the phase of reperfusion that attenuate postischemic injury (ischemic postconditioning: IPoC). The aim of this study was to evaluate the postischemic anti-inflammatory effects of ischemic postconditioning in murine small intestine. Male C57BL/6 mice were using in this study. Mucosal injury and inflammation in the small intestine were evaluated biochemically and histologically. I/R induced severe mucosal injury and neutrophil infiltration. Assessed by tissue associated myeloperoxidase activity. In IPoC group, the post I/R injury in animal small intestine was slightly attenuated compared with I/R group.

研究分野：生理学 微小循環

キーワード：虚血再灌流障害 プレコンディショニング ポストコンディショニング

## 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

## 1. 研究開始当初の背景

虚血プレコンディショニング (Ischemic preconditioning ; IPC) とは、予備的な短時間虚血が起こると、その後、長時間虚血が生じた際に心筋梗塞サイズが縮小し、強い心筋保護効果が得られる現象である。種々の動物や臓器、またヒトの臨床においても IPC の有効性が報告され、IPC の機序にアデノシン受容体、ATP 感受性カリウム (KATP) チャンネル開口などが関与することが明らかになり、多くの薬剤を用いたプレコンディショニングや他のストレスである温熱ストレスやアルコール摂取によるプレコンディショニングの研究も行われ、その機序の多くも報告されてきた。当初 IPC は短時間の虚血負荷より数分後より現れ、2-3 時間継続し消失すると考えられていたが、プレコンディショニングの効果は 2 峰性に存在し、先行虚血や誘発刺激の後、2-4 時間以降に保護作用が再度発現し、およそ 3 日間程度継続することが確認され、前者を early preconditioning と呼び、後者を late preconditioning と呼んでいる。これら 2 つは、その効果はやや前者が強いと考えられるが、そのメカニズムに関しても異なっている。Early preconditioning、および late preconditioning のそれぞれに、発生機序 (トリガー) と伝達機序 (メディエーター) が検討されているが、前者は短時間での反応のため、主に既存のチャンネルの活性化や蛋白のリン酸化やその活性の変化が信号伝達の主体であるが、後者はそれに加え新たな蛋白の産生誘導がその効果発現に必要な不可欠と考えられる。

申請者らはこれまでにマウスの小腸虚血再灌流モデルを使用し、虚血プレコンディショニングと同等の効果を単回の少量のアルコールの摂取によって獲得できることを報告し、その機序の解明を行ってきた。また、そのプレコンディショニングのシグナルには一酸化窒素 (Nitric Oxide ; NO)、一酸化炭素 (Carbon Monoxide ; CO) といった生体内ガスやカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide ; CGRP) の関与も明らかにしている。(Kamada K et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006)

IPC が長時間の虚血の前に短時間の間歇的な虚血を起こすことにより効果を得るのに対し、近年長時間の虚血・再灌流後に同様の短時間の虚血再灌流を行うことによりプレコンディショニング様の心筋保護作用が得られることが報告され、プレコンディショニングにちなんでポストコンディショニングと呼ばれている。このメカニズムは、IPC と異なる部分もあるが重なるところも多いと

考えられており、実際の臨床では、虚血のイベントが起こってから治療を開始することが多いため、虚血のイベントの後での効果のため臨床応用も期待されている。

ポストコンディショニングに関しては、研究論文の発表もここ数年で増加し、プレコンディショニング同様に ATP 依存性カリウムチャンネルやアデノシン、NO の関与が報告されているものの、まだその効果の発生機序は不明な点が多い現状であり、また臨床への応用へはプレコンディショニング同様に効果発現の期待ができる薬剤の開発が必要である。

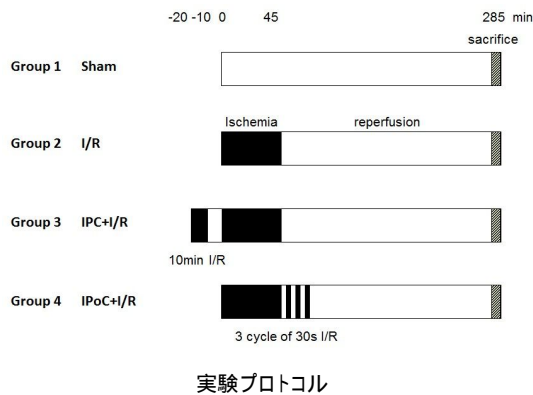
一方、近年の食生活の欧米化に伴い、高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満といったメタリックシンドロームの要素である生活習慣病が増加しているが、これらはそのまますべて動脈硬化の原因であり、また動脈硬化に伴う虚血イベントの危険因子である。医療の場においては、このようなリスクを持つ患者の治療にあたる機会も増加し、侵襲的な処置、手術での周術期での虚血イベントの発生予防や、救急現場での虚血性疾患への対応でも予後の改善が求められている。

## 2. 研究の目的

ポストコンディショニングに関しては、プレコンディショニング同様に KATP チャンネルやアデノシン、NO の関与やミトコンドリアの外膜/内膜を貫通させる膜透過性遷移孔である mitochondrial permeability transition pore (mPTP) の重要性が報告されているものの、まだその効果の発生機序は不明な点が多い現状であるため、本研究の目的は、小腸虚血再灌流障害に対する IPC および IPoC の効果発現の評価、またそのメカニズムについて検討し、IPC、IPoC での効果やその信号伝達経路での差異を解明することを目的とした。

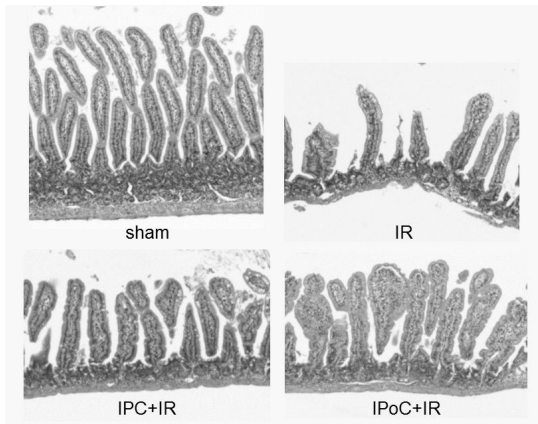
## 3. 研究の方法

C57BL/6J マウスによる小腸虚血再灌流モデルを使用し、実験を継続した。麻酔下で開腹したのち上腸間膜動脈に対しクリッピングによる 10 分間 1 回の先行虚血 (虚血プレコンディショニング) を施行する群としない群をそれぞれ 45 分間血流の遮断を行い、4 時間の再灌流後に、安楽死させ、小腸を摘出しその組織障害の程度を判定し、その効果を検討する。次にプレコンディショニングのモデルに対比するため虚血ポストコンディショニング (IPoC) を検討した。同様に上腸間膜動脈に対し 45 分間血流の遮断を行ったあと、30 秒間の短時間の虚血を 3 サイクル施行での IPoC を施行し、4 時間再灌流後に小腸を摘出、局所の組織障害の程度を判定した。



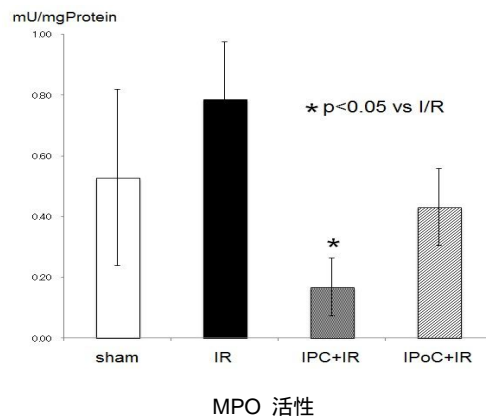
#### 4. 研究成果

C57BL/6J マウスを麻酔下で開腹したのち上腸間膜動脈に対しクリッピングによる 10 分間 1 回の先行虚血（虚血プレコンディショニング）を施行する群としない群をそれぞれ 45 分間血流の遮断を行い、4 時間の再灌流後に、安楽死させ、小腸を摘出しその組織障害の程度を判定し、虚血プレコンディショニング（IPC）は優位に腸管局所での炎症は軽減していることが確認された。次にプレコンディショニングのモデルに対比するため虚血ポストコンディショニング（IPoC）を検討した。同様に上腸間膜動脈に対し 45 分間血流の遮断を行ったあと、30 秒間の短時間の虚血を 3 サイクル施行での IPoC を施行し、4 時間再灌流後に小腸を摘出、局所の障害程度を判定したところ、IPC を施行した群において、施行しなかった群に比べ IPC 群と同様に優位に腸管局所での炎症は軽減していることが確認された。また、炎症の評価項目として MPO 活性、TNF- $\alpha$  においても同様の所見であった。このことにより、IPC および IPoC のいずれにおいても小腸局所の虚血再灌流障害に対し効果があることが確認された。しかし、組織の障害程度が IPC の方が弱いことより、その効果の発現の強弱には差があり、IPoC に比し、IPC はより強い効果発現であると考えられた。一方、再灌流時間を 1 時間に減少させた場合、組織障害の程度は 4 時間の再灌流に比べ障害



腸管組織像

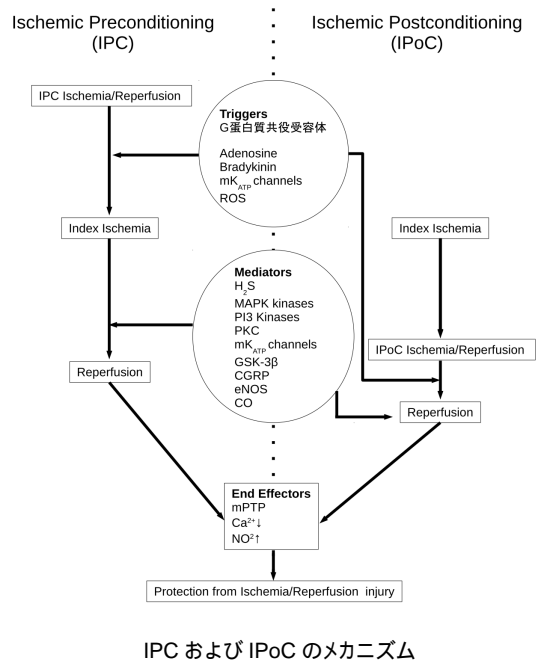
の程度は弱く、障害は継時的に増強することが確認された。



次に CGRP との関連について検討するために CGRP の阻害薬を前投与し、その効果の変化を検討するとともに CGRP の前投与により同等の効果を得ることが可能であるかを検討し、その効果を確認した。

また、NO との関連を確認するために虚血の施行とともに NO 阻害薬を投与した群においてその効果の変化を検討したところ、NO 阻害薬により効果は減弱した。また、NO ドナーを虚血再灌流施行の前投与することにより、同等の効果を得ることが確認された。

一方で IPoC においては、長時間の虚血終了時に NO ドナーや CGRP を投与してもその効果発現は弱く、その関与は IPC に比べ弱いと考えられた。今後は、また IPC に関与が報告されているものに関し、IPoC での検討を進める予定である。



IPC および IPoC のメカニズム

<引用文献>

Marzilli M et al. Heart Metab.54:20-24, 2012

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3件)

鎌田和浩ほか 小腸虚血再灌流モデルにおけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)及び一酸化窒素(NO)の関与について 第9回日本消化管学会総会, 2013年01月25日, 東京

Kazuhiro Kamada et al. Effect of ischemic postconditioning on ischemic/reperfusion injury in murine small intestine. 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, 2014.03.24, Kyoto Japan

鎌田和浩ほか マウス小腸虚血再灌流障害における虚血プレコンディショニング、およびポストコンディショニング効果の検討 第35回日本炎症・再生医学会, 2014年07月01日, 沖縄

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/researches/shokakan.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鎌田 和浩 (KAMADA, Kazuhiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 80616350