

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791607

研究課題名(和文)亜硝酸塩ポストコンディショニングによる心筋保護作用とその分子機序の解明

研究課題名(英文)The efficacy of nitrite for cardioprotection

研究代表者

平田 直之(Hirata, Noyuki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00438045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会により手術患者も高齢化が進み、虚血性心疾患を有する患者は増えている。亜硝酸塩は心保護作用が指摘されており、周術期への応用が期待される。本研究において、ラット心筋虚血モデルに対して亜硝酸塩を投与したところ0.15mg/kgの投与により虚血によって誘発される心室性不整脈が抑制されることが示された。その機序として、低酸素環境で亜硝酸塩が還元され一酸化窒素として作用し、心筋ギャップジャンクションであるコネキシン43機能が維持されることが示唆された。心筋虚血後の心室性不整脈は致死的となることが知られており、本研究により周術期だけではなく救急領域においても今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of elderly patients with ischemic heart disease, who receive surgical procedure, are increasing. Therefore, anesthesiologists are required for safety and high quality peri-operative management. Recent studies have shown that nitrite has cardioprotective effects against ischemia-reperfusion injury. We examined the effects of nitrite on ischemic hearts using rat models. Our results demonstrates that 0.15mg/kg nitrite can attenuate ischemia-induced ventricular arrhythmias. Nitric oxide reduced from nitrite may be involved in this anti-arrhythmia effect via preservation of gap junction proteins, connexin 43. Ischemia-induced arrhythmias leads to a lethal condition in acute coronary syndrome. Therefore, our results highlight a potential of nitrite for cardioprotection not only in peri-operative management but also in emergency medicine.

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：周術期管理学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会及び周術期環境の質的向上に伴って、虚血性心疾患を有する患者が増えている。虚血性心疾患は生命予後に直結する疾患であるため、より安全で質の高い周術期管理のためには、マクロからマイクロレベルに至るまで心筋虚血に伴う合併症を軽減することが重要である。麻酔科学領域では、吸入麻酔薬を虚血前に投与することで得られる心保護作用 (APC: Anesthetic Preconditioning) に関するエビデンスが集積され、臨床にも応用されている (J Am Coll Cardiol 2009)。その一方、実際の臨床麻酔や救急の現場では、虚血イベント後の患者に対応することが求められる。したがって、虚血後の合併症を軽減する新たな戦略が望まれる。

亜硝酸塩は日本食に多く含まれる成分である。近年、循環器内科領域において、亜硝酸塩の酸化体である亜硝酸の傾向摂取が高血圧の予防になるという報告、加齢による動脈硬化を予防するという報告、虚血再灌流障害に対して心保護作用を有することなどが相次いで報告されている。一方、周術期管理を視野に入れた研究は皆無であり、周術期における応用が期待される。

2. 研究の目的

周術期管理において問題となる心筋虚血に対する亜硝酸塩の影響を明らかにすることが本研究の目的である。臨床への応用を視野に入れ、様々な用量を用いて効果的な用量を検討する。亜硝酸塩は高濃度の投与によりメトヘモグロビン血症など有害な作用も有するため、安全かつ有用な濃度を検討する。また、これまで亜硝酸塩が心血管系へ及ぼす影響として詳細な分子機序については未だ不明な点が多い。本研究では、ミトコンドリアなど作用の中心的役割を担うと考えられる酵素から発生する活性酸素種の役割について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 亜硝酸塩が虚血心筋に対して及ぼす影響及び効果的な濃度の検討
 ラット心筋虚血モデルを用いて、心筋虚血後に亜硝酸塩が血行動態について及ぼす影響を調べた。Wistar rat を用いて、麻酔下に左冠動脈前下行枝を確保した。左下行枝結紮により心筋梗塞モデルを作成した。心筋梗塞前後に亜硝酸塩を異なる濃度で投与し、亜硝酸塩が血圧や脈拍、不整脈発生へ及ぼす影響を調べた。

(2) 亜硝酸塩の心筋に対する影響としてミトコンドリア由来活性酸素種の役割についての検討。
 亜硝酸塩は低酸素環境下で一酸化窒素に還元されることにより生物学的活性を示すことが示唆されている。そこで、ミトコンドリア

由来の活性酸素種の発生と影響を検討するために、ミトコンドリアを単離し低酸素環境下ミトコンドリアに対する亜硝酸塩の影響を検討した。ミトコンドリアは心筋組織を粉碎、遠心分離を繰り返すことで抽出した。また、ミトコンドリアより発生する活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオンについて照度計を用いて測定した。

(3) 亜硝酸塩心保護作用の分子機序の解明

(1) 及び (2) の研究により、亜硝酸塩は一酸化窒素を介して、虚血に起因する心室性不整脈を抑制することが示唆されたため、機序の解明のために虚血性不整脈において中心的役割を担うと考えられている心筋ギャップジャンクションコネクシン 43 の発現への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 亜硝酸塩が虚血心筋に及ぼす影響と至適用量の検討

本研究により、亜硝酸塩は虚血に起因する心室性不整脈を抑制することが明らかになった。本作用は、濃度非依存性であり、0.15mg/kg という投与量においてのみ抗不整脈作用を示した (図 1)。一方、血圧や心拍数などの一般的な血行動態への影響は認められなかった。また、本効果は、虚血前による投与においてのみ発現し、虚血後の投与での有効性は認められなかった。

また、亜硝酸塩による抗不整脈作用は、一酸化窒素除去薬である PTIO により棄却されたことから、亜硝酸塩が一酸化窒素に還元された後に効果を発現していることが示唆された。亜硝酸塩を低酸素環境下で還元する酵素として、キサンチン酸化還元酵素やミトコンドリア呼吸鎖、ヘモグロビンなどが知られている。本研究では、キサンチン酸化還元酵素

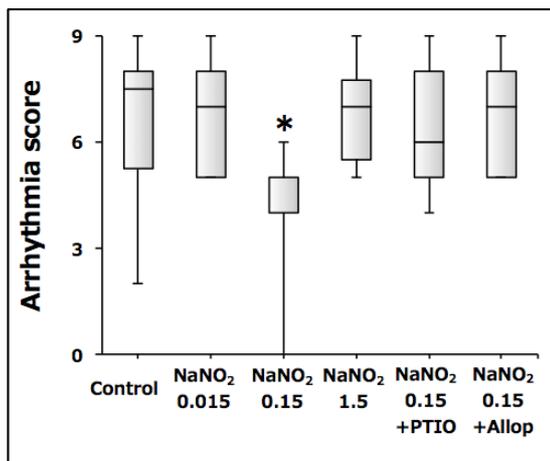


図 1. 亜硝酸塩が虚血誘発性不整脈へ及ぼす影響

阻害薬である Allopurinol (図中の Allop) により抗不整脈作用が棄却されたことから、亜硝酸塩の還元にはキサンチン酸化還元酵素

が関与していることが示唆された。

(2) 亜硝酸塩の心筋に対する影響としてのミトコンドリア活性酸素種の役割について。研究計画当初、亜硝酸塩による心保護作用においてはミトコンドリアによる活性酸素種が関与していると考えた。亜硝酸塩の低酸素環境下ミトコンドリアへの影響を調べるために、ラット心筋よりミトコンドリアを単離し酸素電極を用いて研究を行った。ミトコンドリア基質投与により、ミトコンドリアは酸素を消費し、低酸素環境が構築される。低酸素状態で亜硝酸塩を投与し、その影響を観察したが、亜小差塩の影響は認められなかった。(図2) 従って(1)で認められた虚血心筋に対する保護作用(抗不整脈薬作用)はミトコンドリア由来の活性酸素、一酸化窒素の関わりは低い可能性が示唆された。また、一酸化窒素を測定できる電極を用いた研究においても、一酸化窒素の測定自体は極めて不安定であり、ミトコンドリア由来の一酸化窒素の同定には至らなかった。

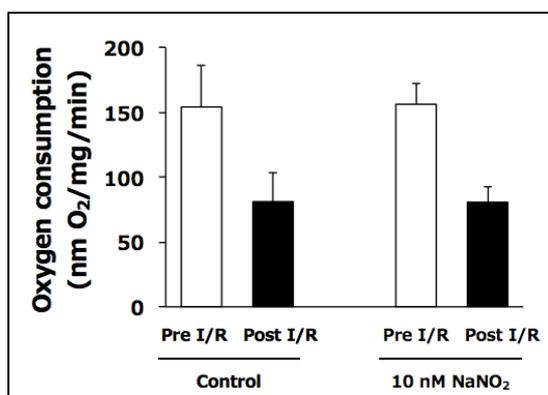


図2. 亜硝酸塩が低酸素下ミトコンドリアへ及ぼす影響

(3) 亜硝酸塩心保護作用の分子機序の解明(1), (2)より亜硝酸塩は、虚血心筋において低酸素環境下でキサンチン酸化還元酵素により一酸化窒素に還元され、抗不整脈作用を示す可能性が示唆された。虚血誘発性不整脈を制御する機序として心筋ギャップジャンクション蛋白であるコネキシン43の関与が考えられている。ウェスタンブロットを用いて、亜硝酸塩によるコネキシン43発現への影響を調べた。心筋虚血はコネキシン43の発現を抑制した。本結果はこれまで報告されてきた虚血とコネキシン43に関する結果と矛盾しないものである。心筋虚血による不整脈がコネキシン43のdown regulationにより、緩徐伝導、伝導途絶、再分極や不応期の不均一性によりリエントリー回路と自動能亢進が生じることで心室性不整脈が発生していると考えられる。亜硝酸塩はコネキシン43のdown regulationを抑制し、抗不整脈作用を示していると考えられる。コネキシンに対する作用は、PTIOやAlloprinolの投与により棄却されたことか

ら、亜硝酸塩から派生したNO及び、Nitrite reductaseであるキサンチン酸化還元酵素の関与も確認された。

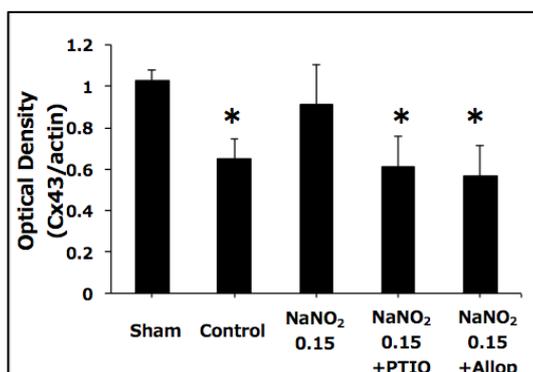


図3. 亜硝酸塩がコネキシン43発現へ及ぼす影響

現在、虚血によるコネキシン43のdown regulationが生じる機序として、全身性及び局所により発生する活性酸素種(Reactive oxygen species)が深く関与すると考えられており、種々の活性酸素種(ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドアニオン、ペルオキシナイトライト)の発生量について研究を継続中である。

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)

Maruyama D, Hirata N, Miyashita R, Kawaguchi R, Yoshikawa Y, Yamakage M. Substrate-dependently modulation of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria following in vitro hypoxia and deoxygenation injury. *Experimental and Clinical Cardiology*, 査読あり, 18, 2013, 158-160

[学会発表] (計2件)

- ① Maruyama D, Hirata N, Miyashita R, Kawaguchi R, Yoshikawa Y, Yamakage M. Nitrite attenuates ischemia-induced ventricular arrhythmias by reduction to nitric oxide in rats. The annual meeting of the American society of Anesthesiologists. 2013年10月13日. San Francisco, USA.
- ② 丸山大介, 平田直之, 山蔭道明. 亜硝酸塩はNOSを介してラット心筋虚血後心室性不整脈を抑制する. 第18回日本心臓血管麻酔学会. 2013年9月27日. 小倉市.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 直之 (Hirata Naoyuki)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：00438045

(2) 連携研究者

吉川 裕介 (Yoshikawa Yusuke)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：40721759

(3) 研究協力者

丸山 大介 (Maruyama Daisuke)
札幌医科大学医学部・研究員
研究者番号：60609006

宮下 龍 (Miyashita Ryu)
札幌医科大学医学部・研究員
研究者番号：50560877

川口 亮一 (Kawaguchi Ryoichi)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：30609003