

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462326

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 cardiac ion channels

研究代表者

丹保 亜希仁 (TAMPO, Akihito)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80531524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、APCによるNaチャンネルへの効果(チャンネル蛋白の増加、電流の増大)をプレコンディショニングを受けないDahl-Sラットで検討した。Dahl-Sラットでは上記のAPC効果が発現しなかった。また、5分間の酸化ストレス/再灌流傷害を与えた心筋細胞では、APC群においてNa電流が抑制された。再灌流から10分後、15分後とNa電流は両群において増大したが、APC群での増大は有意に抑制された。Na過負荷とそれに続くCa過負荷による心筋障害はAPCにより抑制される可能性が示唆された。In vivo APC後の心臓の虚血/再灌流傷害(30分間)では、Na電流がコントロールレベルまで有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the APC effects on sodium channel in the Dahl-S rats which were not pre-conditioned by anesthetics. Increase in the sodium current, and channel protein expression by APC was abolished in the Dahl-S rats. Five minutes oxidative stress and reperfusion injury increased the sodium current in 10 and 15 minutes reperfusion, but the change was not observed in the anesthetic-preconditioned cardiomyocytes. These results suggested that APC treatment reduced myocytes injury by sodium overload and following calcium overload. The increased sodium current by APC was decreased by 30 minutes ischemia-reperfusion injury.

研究分野：麻酔，集中治療

キーワード：プレコンディショニング 心筋傷害 麻酔プレコンディショニング 虚血・再灌流傷害

1. 研究開始当初の背景

虚血プレコンディショニング作用が心筋梗塞巣を縮小することは1980年代に報告されている。吸入麻酔薬により、虚血/再灌流傷害が抑制される心筋のプレコンディショニング作用 (Anesthetic-induced Preconditioning; APC) は、Kersternらにより報告されている¹。APC発現の機序としてはG蛋白、プロテインカインースC、プロテインタイロシンカインース、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²。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、電位依存性イオンチャンネルに対するAPC効果に関する報告もされている^{3,4}。その後、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となってきた。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⁵。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、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⁶。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、チャンネル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⁷。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。

また、敗血症性ショックは、心臓、肺、腎臓、肝臓などの臓器不全を引き起こし、その致死率約40%と報告されている。敗血症における臓器不全の原因としては、高サイトカイン血症により引き起こされる凝固異常や血流障害など関与しているとされるが、その明らかな機序は不明である。敗血症や、それに合併する播種性血管内凝固に対する臨床的治療薬は存在するが、その細胞レベルでの機序は全く不明である。虚血再灌流による臓器障害、プレコンディショニングの関係を、敗

血症と多臓器障害への分野に応用できる可能性が大いにあると考える。そこで、敗血症モデルの心筋細胞において現在臨床使用されている薬剤による臓器保護作用の有用性を検討する。敗血症における多臓器不全の抑制、死亡率の減少は救急集中治療領域におけるホットトピックスであり、重要な領域である。

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。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。また、心筋細胞イオンチャンネルは虚血再灌流障害による心筋壊死、不整脈の発生に大きく関与している。心筋細胞膜状の電位依存性チャンネルへのAPCの効果は虚血再灌流障害からの心筋保護作用の解明に重要であり、また抗不整脈作用のメカニズムの解明にもつながる。敗血症による多臓器不全は先述のとおり、高い死亡率となっている。敗血症モデルを用いて、薬剤による臓器保護作用を細胞レベル、イオンチャンネルレベルで検討する。この分野での臓器保護、死亡率改善に貢献することが目的である。

3. 研究の方法

ラットの心筋から、低速および高速の遠心分離によりミトコンドリアを単離する。Osmotic Shockを利用して、ミトコンドリア外膜を破り内膜が露出した状態 (マイトプラスト) を作製する。パッチクランプ法を用いて、マイトプラストからミトコンドリア内膜上のチャンネル電流を計測する。またランゲンドルフ装置による逆行性還流により心筋細胞を採取し、そのイオンチャンネル電流測定もパッチクランプ法を用いて行う。APCのイオンチャンネルに与える効果を観察するためにin vivo モデルを用いる。また、敗血症による心筋細胞イオンチャンネルの変化、および各種薬剤 (麻酔薬、利尿薬、抗DIC薬など) による心筋保護作用についての研究を行う。方法は、心筋細胞レベルでのストレス耐性への効果、および心筋細胞イオンチャンネルにおける薬剤効果の評価を行う。

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ェナイズする。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°C)。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) 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°C, 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°C, 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°CのTyrode溶液内で保存する。

3) パッチクランプ法

マイトプラスト電流は、室温下でシングルチャンネルモード (inside-out patch) を用いて行う。2) で得られた浮遊液を 1 μ L のせ、そこに等浸透圧溶液を 500 μ L 加える。フェーズコントラスト下でマイトプラストを確認し、ガラス電極 (15-20M Ω 、等浸透圧溶液中) を接触させギガオームを形成した後、パッチ膜を excise する。チャンネル電流の記録は、はじめに ramp protocol を用いて記録した後、single-channel protocol を用いてチャンネルの活動する電圧を中心に各電圧でのシングルチャンネル電流の記録を行う。心筋細胞のイオンチャンネル電流は whole-cell mode を用いて記録する、各イオンチャンネル電流記録用に調整した細胞外液、ピペット溶液を用いる。心筋細胞にガラス電極 (3-5M Ω) を接触させギガオームシールを形成した後、パッチ膜を破りピペット内と細胞内を連絡させる。この状態で Step-up protocol を用いてチャンネル電流を記録する。対象は Na チャンネル電流とする。

4) In vivo APC モデル

APC は in vivo モデルを用いる。吸入麻酔薬はイソフルランを用いる。ラットを 1.4% (1MAC) のイソフルランに調節したクリアケースに 30% の酸素投与下で 30 分間いれておく (プレコンディショニング)。その後 30 分間、空気下でのイソフルランの wash out を行う。このモデルによる APC の効果については心筋細胞の酸化ストレス/再灌流傷害に対する耐性の増加により証明されている⁴。

5) 虚血/再灌流傷害モデル

3) と同様にランゲンドルフ装置上で、上行大動脈からの逆行性環流が確立した後に、環流液を 30 分停止した。その後、酵素溶液で再灌流を行い心筋細胞を単離した。

6) Sepsis モデル

敗血症 (Sepsis) モデルを用いる。敗血症モデルは、エンドトキシンの静脈内投与もしくは腹腔投与により作成する。日本版敗血症診療ガイドラインでは、感染症に伴う臓器障害を敗血症と定義したことで、臓器障害を伴うモデルを作成する必要がある。

4. 研究成果

これまで APC による Na 電流の有意に増加 (1.53 倍)、Na チャンネル蛋白の発現量の有意な増加を確認してきた。これらの Na チャンネルの変化は APC による心筋保護、抗不整脈作用へ寄与していると考えられている。

本研究では、上記の APC による Na チャンネルへ

の効果、プレコンディショニングを受けない食塩感受性高血圧症モデルラット (Dahl-S) で検討した。食塩感受性高血圧症モデルラットでは、Na 電流の増加 (図1)、Na チャンネル蛋白の発現量は増加しなかった。このことから APC による Na チャンネルの変化は心筋保護、抗不整脈作用へ寄与していると考えられた。

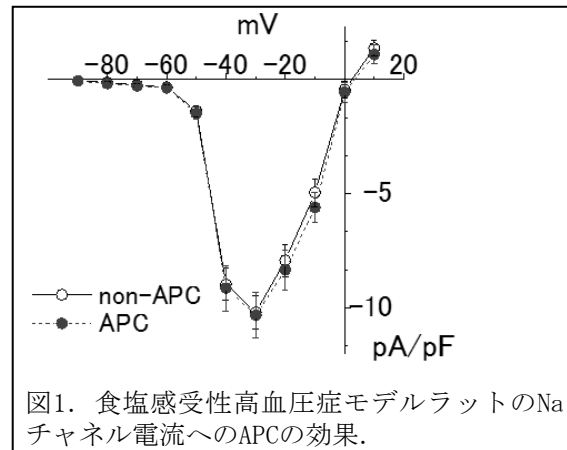


図1. 食塩感受性高血圧症モデルラットの Na チャンネル電流への APC の効果。

また、5 分間の酸化ストレス/再灌流傷害を与えた心筋細胞では、APC 群において Na 電流が抑制された (図2)。再灌流から 10 分後、15 分後と Na 電流は両群において共に増大したが、APC 群で Na 電流の増大は有意に抑制された (図3)。これらから、Na 過負荷とそれに引き続きおこる Ca 過負荷による心筋障害は APC により抑制される可能性が示唆された。

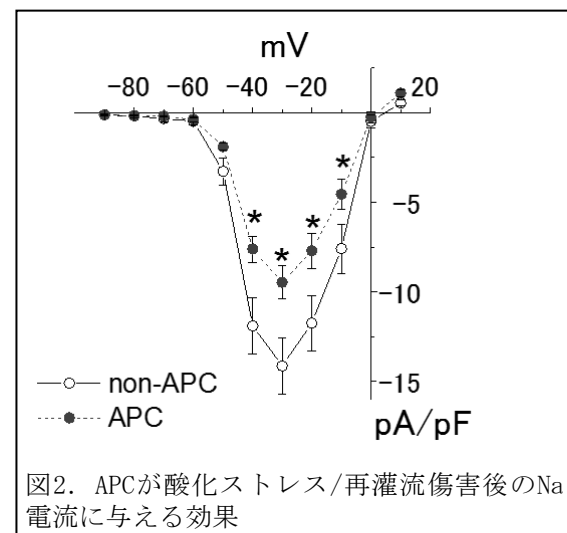
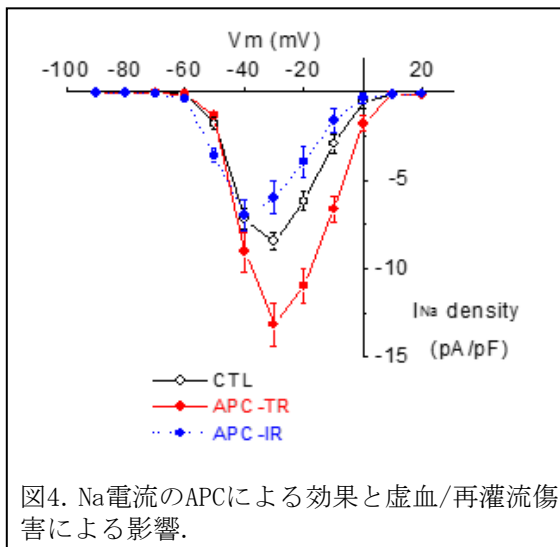
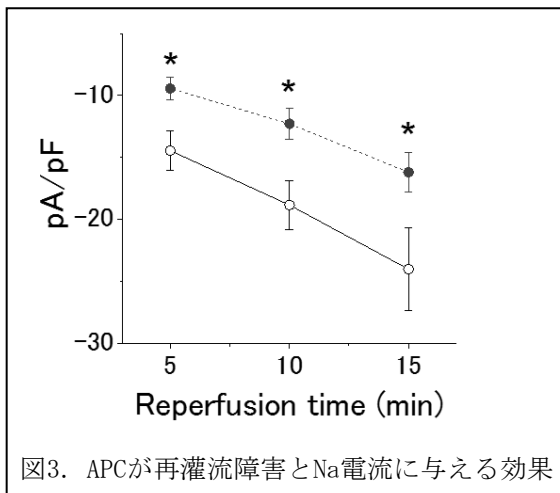


図2. APC が酸化ストレス/再灌流傷害後の Na 電流に与える効果

次に、吸入麻酔薬によるプレコンディショニングを in vivo で施した後に、心臓に虚血/再灌流傷害 (30 分間) を与えた。コントロール (CTL) 群、APC 単独 (APC-TR) 群、APC+ 虚血/再灌流障害 (APC-IR) 群の 3 群で Na 電流を比較した (図4)。APC により増大した Na 電流は、虚血再灌流障害により有意に抑制された。



吸入麻酔薬によるプレコンディショニング効果は、細胞膜上のNaチャンネル蛋白の増加およびNa電流の増大が関係している。この効果は、プレコンディショニングを受けないラットで消失することを証明した。虚血/再灌流傷害により、Na電流が増大し細胞内のNa過負荷、Ca過負荷による細胞死がおこる。APCではこのNa電流の増大を抑制する効果があり、この機序によりプレコンディショニング作用をもたらすことが示唆された。

<引用文献>

- ① Kerstern JR. et al. Anesthesiology 1997;87 : 361-370
- ② De Hert SG. et al. Anesth Analg. 2005;100:1584-93
- ③ Stadnicka A. et al. Anesthesiology 2006;97:1209-1217
- ④ Tampo A. et al. Br J Pharmacol. 2008; 156(3):432-43
- ⑤ Ljubkovic M. et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292 : C1583-1590
- ⑥ O' Rourke B. et al. Physiology 2005;20:303-315

- ⑦ Jiang MT. et al. Anesth Analg. 2007;105:926-932

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2件)

- ① 丹保 亜希仁, 熊倉 隼, 富樫 朋, 八巻 多. 当院における敗血症死亡症例の検討. 集中治療医学会、2018年2月21日、幕張市
- ② 熊倉 隼, 丹保 亜希仁, 富樫 朋, 八巻 多. 当院救急科2年間の敗血症患者に関する後方視的検討. 集中治療医学会、2018年2月21日、幕張市

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・講師

研究者番号：80531524