

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462774

研究課題名(和文)モノアミン動態への薬理的介入による虚血・再灌流時心筋細胞傷害軽減の検討

研究課題名(英文) Monoamine oxidase-induced hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury during myocardial ischemia-reperfusion

研究代表者

秋山 剛 (AKIYAMA, Tsuyoshi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70202554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔下ラットに心臓マイクロダイアリシス法を用い、心虚血(冠動脈閉塞30分)・再灌流時におけるヒドロキシラジカル産生をトラッピング法によってモニターし、心筋細胞傷害の指標として心筋間質ミオグロビン濃度をモニターした。虚血部において、ヒドロキシラジカル産生、およびミオグロビン放出は虚血時に上昇し、再灌流でさらに上昇した。また、モノアミンオキシダーゼ阻害薬の局所投与により、ヒドロキシラジカル産生、およびミオグロビン放出は虚血時、再灌流時ともに抑制され、心虚血・再灌流時において、モノアミンオキシダーゼは、ヒドロキシラジカル産生および心筋細胞傷害に関与していることが解明された。

研究成果の概要(英文)：We applied microdialysis technique to the heart of anesthetized rats. Dialysate samples were collected during 30 min of induced ischemia followed by 60 min of reperfusion. We monitored dialysate 3,4-dihydrobenzoic acid (3,4-DHBA) concentration as an index of hydroxyl radical production using a trapping agent (4-hydroxybenzoic acid), and dialysate myoglobin concentration as an index of cardiomyocyte injury in the ischemic region. Dialysate 3,4-DHBA concentration increased during ischemia and further increased after reperfusion. Pargyline, a MAO inhibitor, suppressed the averaged increase in dialysate 3,4-DHBA concentration during ischemia and reperfusion. Dialysate myoglobin concentration increased during ischemia and further increased after reperfusion. Pargyline reduced the averaged dialysate myoglobin concentration during ischemia and reperfusion. MAO plays a significant role in hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury during ischemia and after reperfusion.

研究分野：循環生理学

キーワード：心臓 虚血・再灌流 モノアミン ヒドロキシラジカル マイクロダイアリシス法

1. 研究開始当初の背景

- (1) 研究代表者らは、心虚血・再灌流時において虚血部心臓交感神経終末からは大量の norepinephrine が、また、虚血部血小板からは大量の serotonin が放出されることを明らかにしてきた。虚血部心筋間質 norepinephrine は adrenergic receptor を介して、また虚血部心筋間質 serotonin は serotonin receptor を介して、血小板凝集の促進、冠動脈収縮、心筋酸素消費量の増大、求心性交感神経線維刺激、不整脈、等の病態を引き起こし、心虚血・再灌流時における心筋細胞傷害を助長すると考えられている (receptor-dependent effect)。
- (2) 一方、研究代表者らは、心筋間質 norepinephrine は、uptake₁、および uptake₂ carrier を介して、また、心筋間質 serotonin は、serotonin transporter、および extraneuronal monoamine transporter を介して、細胞内に取り込まれ、ミトコンドリア膜に存在する monoamine oxidase により、それぞれ dihydroxyphenylglycol, 5-hydroxyindole acetic acid に代謝されて細胞外に放出されることを明らかにしてきた。生理的条件下では、これら monoamine の代謝の際に、活性酸素である過酸化水素(H₂O₂) が生成されるが、細胞内酵素等により直ちに不活化される。しかし、心虚血・再灌流時において大量に放出された monoamine の代謝からは大量の H₂O₂ が産生され、大量の H₂O₂ は強い心筋細胞傷害作用を有する hydroxyl radical を産生し、この hydroxyl radical が非可逆的心筋細胞傷害を起こすのではないかと考えられている(MAO-dependent effect)。
- (3) しかしながら、MAO を介した monoamine 代謝が、どれほど心虚血・再灌流時における hydroxyl radical 産生、

および心筋細胞傷害に関与しているかは検討されていない。

2. 研究の目的

- (1) in vivo において心虚血・再灌流時の MAO を介した monoamine 代謝が、どれほど心虚血・再灌流時の hydroxyl radical 産生に関与しているかを解明するために、まず、microdialysis 法による hydroxyl radical 産生モニター法を確立させる。次に、心虚血・再灌流時の虚血部心筋間質 hydroxyl radical 産生をモニターし、MAO inhibitor の投与で hydroxyl radical 産生がどの程度抑制されるかを明らかにする。
- (2) 心筋細胞傷害の指標として心虚血・再灌流時の虚血部における myoglobin 放出をモニターし、in vivo において心虚血・再灌流時の MAO による hydroxyl radical 産生を抑えることで、心筋細胞傷害がどの程度抑制されるかを解明する。

3. 研究の方法

ネブタール麻酔下および人工呼吸下で、ラットを左開胸した。左冠動脈に冠閉塞用の糸をかけ、虚血予定部位の心筋に microdialysis probe を植え込み、一方より微量注入 injection pump にてリンゲル液、あるいは薬剤を含んだリンゲル液を灌流し、他方より microfraction collector にて心筋透析液を連続的に採取した。心筋間質の生体物質は、半透膜部分の dialysis fiber を介して、濃度勾配に従って灌流液中に移動する。一方、リンゲル液に含まれた pharmacological agents は、血流のない虚血部でも、dialysis fiber を介して、灌流液から心筋間質に移動する。control の心筋間質透析液 sampling 後、冠閉塞により虚血を惹起し、冠閉塞開放により再灌流し、心虚血・再灌流時を通じて連続的に心筋間質透析液を sampling した。透析液中の生体内物質濃度を高感度 HPLC で測定することで、虚

血部心筋間質における生体内物質の濃度の指標とした。

- (1) 麻酔下ラットにおいて心臓microdialysis法を用い、4-hydroxybenzoic acid を trapping agent として灌流液中に含ませ、4-hydroxybenzoic acid と組織 hydroxyl radical との反応物である心筋間質 3,4-DHBA をモニターすることにより、心筋間質 hydroxyl radical 産生をモニターした。虚血部において心虚血・再灌流時の hydroxyl radical 産生をモニターし、monoamine oxidase 阻害薬である pargyline の dialysis probe を介した局所投与の影響を調べた。
- (2) また、麻酔下ラットにおいて心臓 microdialysis 法を用い、心筋細胞傷害の指標として心筋間質 myoglobin 濃度を心虚血・再灌流時においてモニターし、monoamine oxidase 阻害薬である pargyline の dialysis probe を介した局所投与の影響を調べた。

4. 研究成果

- (1) trapping agent である 4-hydroxybenzoic acid を用いた microdialysis 法により、心虚血・再灌流時における hydroxyl radical 産生をモニターすることが可能となった。
- (2) monoamine oxidase は、虚血・再灌流全体を通じて虚血部心筋間質における hydroxyl radical 産生に関与していることが解明された。
- (3) monoamine oxidase は、虚血・再灌流全体を通じて心筋細胞傷害に関与していることが解明された。
- (4) 心虚血・再灌流時において大量に放出される monoamine は、monoamine receptor を介した心筋細胞傷害だけでなく、monoamine oxidase を介した活性酸素産生による心筋細胞傷害を引き起こすことが解明された。

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11件)

1. Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Kamiya A, Turner MJ, Yamamoto H, Shishido T, Shirai M, Sugimachi M. Medetomidine suppresses cardiac and gastric sympathetic nerve activities but selectively activates cardiac vagus nerve. *Circ J* 78, 1405-1413, 2014. <doi: 10.1253/circj.CJ-13-1456> (査読有)
2. Du CK, Zhan DY, Morimoto S, Akiyama T, Schwenke DO, Hosoda H, Kangawa K, Shirai M. Survival benefit of ghrelin in the heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Pharmacol Res Perspect* 5, e00064, 2014. <doi: 10.1002/prp2.64> (査読有)
3. Sakurai S, Kuroko Y, Shimizu S, Kawada T, Akiyama T, Yamazaki T, Sugimachi M, Sano S. Effects of intravenous cariporide on release of norepinephrine and myoglobin releases during myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Life Sci* 114, 102-106, 2014. <doi: 10.1016/j.lfs.2014.08.008> (査読有)
4. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M. Myocardial interstitial serotonin and its major metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid levels determined by microdialysis technique in rat heart. *Life Sci* 117, 33-39, 2014. <doi: 10.1016/j.lfs.2014.09.019> (査読有)
5. Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Sata Y, Turner MJ, Shirai M, Sugimachi M. Acute effects of arterial

- baroreflex on sympathetic nerve activity and plasma norepinephrine concentration. *Auton Neurosci* 186, 62-68, 2014. <doi: 10.1016/j.autneu.2014.10.016> (査読有)
6. Shimizu S, Kawada T, Akiyama T, Turner MJ, Shishido T, Kamiya A, Shirai M, Sugimachi M. Guanfacine enhances cardiac acetylcholine release with little effect on norepinephrine release in anesthetized rabbits. *Auton Neurosci* 187, 84-87, 2015. <doi: 10.1016/j.autneu.2014.11.010> (査読有)
 7. Sata Y, Kawada T, Shimizu S, Kamiya A, Akiyama T, Sugimachi M. Predominant role of neural arc in sympathetic baroreflex resetting of spontaneously hypertensive rats. *Circ J* 79, 592-599, 2015. <doi: 10.1253/circj.CJ-14-1013> (査読有)
 8. Abe C, Nagai Y, Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sugimachi M, Morita H. Reduced carotid baroreceptor distensibility-induced baroreflex resetting contributes to impairment of sodium regulation in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol* 308, H942-950, 2015. <doi: 10.1152/ajpheart.00697.2014> (査読有)
 9. Inagaki T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Yoshimoto M, Shirai M. Monoamine oxidase-induced hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury during myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic Res* 50, 645-653, 2016. <doi: 10.3109/10715762.2016.1162300> (査読有)
 10. Kawada T, Akiyama T, Li M, Zheng C, Turner MJ, Shirai M, Sugimachi M. Acute arterial baroreflex-mediated changes in plasma catecholamine concentrations in a chronic rat model of myocardial infarction. *Physiol Rep* 4, e12880, 2016. <doi: 10.14814/phy2.12880> (査読有)
 11. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Inagaki T, Shishido T, Shirai M, Pearson J. Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5-hydroxyindole acetic acid during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 312:H60-H67, 2017. <doi: 10.1152/ajpheart.00471.2016>(査読有)
- [学会発表](計15件)
1. Biophysical society 59th annual meeting. February 7~11, 2015. Baltimore, Maryland, USA. Myocardial interstitial serotonin and its major metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid levels determined by microdialysis technique in in vivo rat heart. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M.
 2. Biophysical society 59th annual meeting. February 7~11, 2015. Baltimore, Maryland, USA. The treatment benefit of ghrelin on a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. Zhan DY, Du CK, Morimoto S, Akiyama T, Schwenke DO, Hosoda H, KangawaK, Shirai M.
 3. ESC Congress August 27~31, 2016, Roma, Italy. Medetomidine but not guanfacine enhances cardiac

- parasympathetic acetylcholine release during aortic depressor nerve stimulation. Shimizu S, Kawada T, Akiyama T, Fukumitsu M, Kamiya A, Shishido T, Sugimachi M
4. The American Heart Association Scientific Sessions. November 12-16, 2016. New Orleans, USA. Cardiac vagal control in knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy. Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Morimoto S, Shimizu S, Kawada T, Shirai M, Pearson JT.
 5. 第92回日本生理学会大会 2015年3月21日~23日(神戸市)「拡張型心筋症ノックインマウス生命予後に対するグレリンの治療効果」 戦 冬雲、杜 成坤、森本 幸生、秋山 剛、ダリル シュウエンケ、細田 洋司、寒川 賢治、白井 幹康
 6. 第92回日本生理学会大会 2015年3月21日~23日(神戸市)「心房マイクロダイアリシス法による心臓自律神経活動の定量化と心不全治療のための心臓保護薬の検討」 清水 秀二、川田 徹、秋山 剛、神谷 厚範、宍戸 稔聡、白井 幹康、杉町 勝
 7. 第92回日本生理学会大会 2015年3月21日~23日(神戸市)「モノアミノオキシダーゼによる心筋虚血再灌流時のヒドロキシラジカル産生」 稲垣 薫克、秋山 剛、戦 冬雲、杜 成坤、白井 幹康
 8. 第26回マイクロダイアリシス研究会 2015年12月19日(東京都)教育講演「心臓におけるマイクロダイアリシス法の有用性」 秋山 剛
 9. 第93回日本生理学会大会 2016年3月22日~24日(札幌市)「心不全ラットにおけるノルアドレナリン再吸収阻害が交感神経活動に及ぼす影響」川田 徹、秋山 剛、清水 秀二、杉町 勝
 10. 第93回日本生理学会大会 2016年3月22日~24日(札幌市)「心筋トロポニン T 突然変異に起因する肥大型心筋症における拡張機能障害の分子メカニズム」 杜 成坤、戦 冬雲、森本 幸生、西井 清雅、水上 令子、謝 明芳、土持 裕胤、盧 群偉、秋山 剛、白井 幹康
 11. 第93回日本生理学会大会 2016年3月22日~24日(札幌市)「拡張型心筋症における心臓迷走神経調節機能異常と新規治療薬の開発」 戦 冬雲
 12. 第54回日本生体医工学会大会 2016年4月26日~28日(富山市)オーガナイズドセッション「微小透析法を用いた生体機能の探究」「心虚血・再灌流研究におけるマイクロダイアリシス法の有用性」 秋山 剛
 13. 第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17日~19日(金沢市)「Central α_2 -Adrenergic Receptors, but not α_2A -Receptor, Play a Key Role in Aortic Depressor Nerve Stimulation-induced Cardiac Parasympathetic Activation」 清水 秀二、川田 徹、秋山 剛、福満 雅史、宍戸 稔聡、杉町 勝
 14. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28日~30日(浜松市)「拡張型心筋症ノックインマウスにおける心臓ノルエピネフリン動態異常」 戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、森本 幸生、白井 幹康、ピアソン ジェームス
 15. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28日~30日(浜松市)「拡張型心筋症ノックインマウスに対するドネベジルの治療効果」 杜 成坤、戦

冬雲、森本 幸生、秋山 剛、白井 幹
康、ピアソン ジェームス

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

秋山 剛 (AKIYAMA, Tsuyoshi)
独立行政法人国立循環器病研究センター
ー・心臓生理機能部・心臓生理研究室長
研究者番号：70202554

(2) 連携研究者

稲垣 薫克 (INAGAKI, Tadakatsu)
独立行政法人国立循環器病研究センター
ー・血管生理学部・上級研究員
研究者番号：20638366

清水 秀二 (SHIMIZU, Shuji)
独立行政法人国立循環器病研究センター
ー・循環動態制御部・上級研究員
研究者番号：80443498