

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791426

研究課題名（和文） 吸入麻酔薬の心筋保護作用に関わる分子基盤の解明

研究課題名（英文） The molecular and ionic mechanisms for cardioprotective effects of volatile anesthetics

研究代表者

小嶋 亜希子 (KOJIMA AKIKO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50447877

研究成果の概要（和文）： $\text{Ca}^{2+}$ パラドックスは細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を一度低下させたあと、元の濃度に戻した際に急激な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇に伴う細胞の過拘縮を来す現象である。我々は、マウス心筋細胞における  $\text{Ca}^{2+}$ パラドックスが細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ ストアである筋小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$ 含量の減少によって活性化される、TRPC(transient receptor potential canonical)チャンネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が一因となり、この  $\text{Ca}^{2+}$ パラドックスを吸入麻酔薬であるセボフルランが強く抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： $\text{Ca}^{2+}$  paradox occurs when the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is repleted following  $\text{Ca}^{2+}$  depletion and is characterized by the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload associated with cellular hypercontracture. We revealed that  $\text{Ca}^{2+}$  entry via the transient receptor potential canonical (TRPC) channel activated by  $\text{Ca}^{2+}$  decrease in sarcoplasmic reticulum is responsible for the  $\text{Ca}^{2+}$  paradox in mouse ventricular myocytes. Furthermore, we found that volatile anesthetic sevoflurane markedly inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the TRPC channel and thereby protects ventricular myocytes from  $\text{Ca}^{2+}$  paradox-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  overload.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学

## 1. 研究開始当初の背景

虚血に陥った心筋に血流が再開されると、不整脈（再灌流不整脈）、収縮機能の回復遅延（stunned myocardium）、さらには心筋細

胞死（reperfusion-induced cell death）等の種々の心筋傷害が発生する（虚血再灌流傷害）ことが知られている。その原因として再灌流に伴って発生する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷が挙

げられているが、その発生機構は明らかにされていない。

Ca<sup>2+</sup>パラドックスは細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度を一度低下させた後、元の濃度に戻した際に急激な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に伴う細胞の過拘縮を来す現象であり、虚血再灌流時における細胞傷害と多くの共通する特徴をもつ。Ca<sup>2+</sup>パラドックスにおける Ca<sup>2+</sup>流入経路として、我々は細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアである筋小胞体内の Ca<sup>2+</sup>含量の減少などを契機に活性化される、細胞膜の陽イオン輸送ファミリーである TRPC (transient receptor potential, canonical) チャンネルに着目した。TRPC チャンネルは store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) と呼ばれる、筋小胞体内の Ca<sup>2+</sup>含量の減少に起因して細胞外から Ca<sup>2+</sup>流入が起こる現象に関連付けられているが、Ca<sup>2+</sup>パラドックスとの関連は今までに報告がない。

手術麻酔時の臓器傷害は虚血再灌流傷害であり、傷害制御は周術期の鎮痛・鎮静と同様に重要な命題である。我々はこれまで、*in vivo* において臨床使用濃度の吸入麻酔薬が虚血再灌流傷害に対して心筋保護効果を有することを証明してきた。今回、吸入麻酔薬が心筋細胞の Ca<sup>2+</sup>過負荷に対してどのような分子機構で制御するのかを明らかにすることで、マクロ (臓器レベル) からミクロ (細胞・分子レベル) までの統合的理解が可能となる。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、TRPC チャンネルを介する Ca<sup>2+</sup>流入に着目して、Ca<sup>2+</sup>パラドックスの発生機構を単離心室筋細胞を用いて分子生物学的手法から検証し、また Ca<sup>2+</sup>パラドックスに対する吸入麻酔薬の効果を検討する。これにより再灌流時の Ca<sup>2+</sup>動態変調についてのメカニズム、および吸入麻酔薬の心筋保護作用に関わる分子基盤を解明する。これらの結果に基づき、i) 心筋保護効果が最大となる吸入麻酔薬の臨床使用法を確立し、ii) 吸入麻酔薬と類似した心筋保護薬の開発の基盤を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) マウス心室筋細胞における Ca<sup>2+</sup>パラドックスの確認。マウス心室筋細胞に蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬 (fluo-3) を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度のイ

メージングおよび細胞形態の観察を行った。心室筋細胞を Ca<sup>2+</sup>を含まない灌流液で灌流後(10分以上)、Ca<sup>2+</sup>を含む溶液(1.8 mmol/L) で灌流し、急激な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を伴った細胞の拘縮 (Ca<sup>2+</sup>パラドックス) を誘発した。

(2) Ca<sup>2+</sup>パラドックスに関与するイオンチャネルの同定。(1)の実験における細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に対する種々のイオンチャネル (TRPC チャンネル、L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル等) の阻害薬の効果を調べ、Ca<sup>2+</sup>パラドックスに関与するイオンチャネルを同定した。さらに、TRPC チャンネルの発現を免疫細胞化学法で検討した。

(3) TRPC チャンネルアイソフォームの同定。TRPC チャンネルのアイソフォーム (TRPC1~7) に対する抗体を用い、(1)の実験を行い、Ca<sup>2+</sup>パラドックスに関わる TRPC チャンネルのアイソフォームを特定した。

(4) metabolic inhibition 下での Ca<sup>2+</sup>パラドックスの検討。虚血再灌流を実験的に再現するために、2,4-dinitrophenol (DNP) を加えた溶液で灌流し細胞内 ATP 産生を抑え metabolic inhibition を行った。

① この過程を加えることにより、Ca<sup>2+</sup>パラドックスの発生がどのように修飾されるか観察を行った。

② metabolic inhibition により筋小胞体内 Ca<sup>2+</sup>レベルがどのように変化するかを、カフェイン実験により評価した。

(5) セボフルランの Ca<sup>2+</sup>パラドックスに対する影響の検討。

① マウス心室筋細胞にセボフルランを種々の時期 (Pre, Post, Post-long) に投与し、Ca<sup>2+</sup>パラドックスに対する影響を観察した。

② セボフルランの濃度を変えて検討し、濃度依存性を定量的に解析した。

③ TRPC チャンネルに対するセボフルランの効果をパッチクランプ法を用いて検討した。

④ 筋小胞体内 Ca<sup>2+</sup>レベルに対するセボフルランの効果を、Ca<sup>2+</sup>親和性の低い蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬である mag-fluo-4 を細胞に負荷して、レーザー顕微鏡下に検討した。

#### 4. 研究成果

- (1) マウス心室筋細胞において、10~20 分間の無  $\text{Ca}^{2+}$  溶液 ( $0 \text{ Ca}^{2+}$ ) での灌流後再び  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を戻すと、約 50% の細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスが発生した。この  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生は TRPC チャンネルの阻害薬 (2-aminoethoxydiphenyl borate,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ) により有意に抑制できたことから、TRPC チャンネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関わっていることが示唆された。

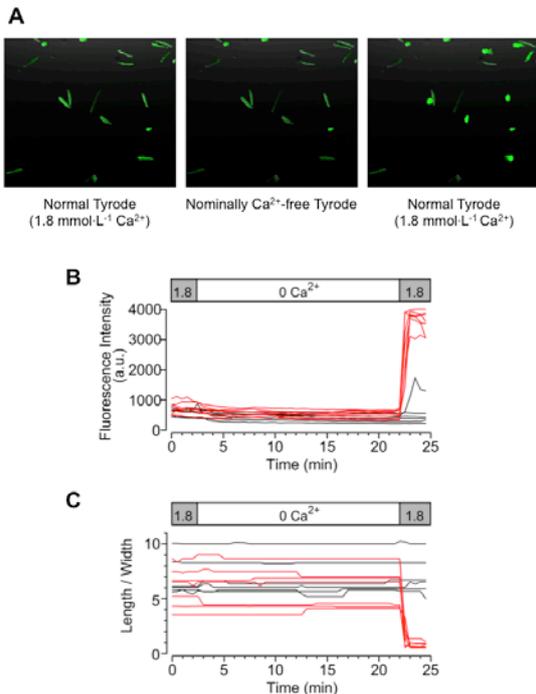


図 1. マウス心室筋細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生

- (2) TRPC1, TRPC3, TRPC4 アイソフォームがマウス心室筋細胞に発現していることを、免疫細胞化学法により確認した。また、パッチクランプ法により、TRPC チャンネルが機能していることも確認した。
- (3) TRPC1 アイソフォームに対する抗体で処理した細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生が有意に抑制されたことから、TRPC1 アイソフォームの関与が示唆された。
- (4) DNP による metabolic inhibition や細胞外 ATP, UTP 投与により  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生は有意に増加した。また、無  $\text{Ca}^{2+}$  溶液灌流中に筋小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルは低

下していったが、これは DNP の存在により増強した。

- (5) 筋小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルを維持するような薬剤 (テトラカイン、KB-R7943) の存在下では  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生は有意に減少した。
- (6) マウス心室筋細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生には、筋小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの低下により活性化された TRPC チャンネルからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関わっている。虚血中には筋小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$  レベルが低下するため、 $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生が増悪する可能性が示唆される。

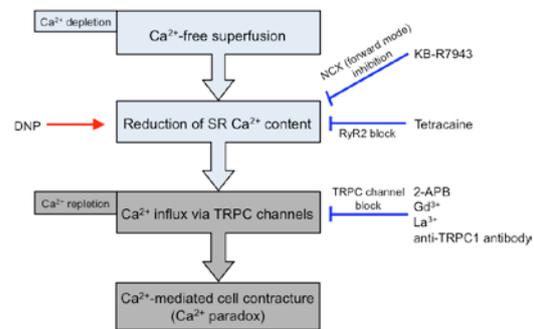


図 2.  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生メカニズム

- (7) セボフルランは無  $\text{Ca}^{2+}$  溶液灌流中から投与 (Post-long)、あるいは  $\text{Ca}^{2+}$  再投与の時期 (Post) に投与すると、 $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの発生を有意に抑制した。この抑制効果は濃度依存性であり、臨床使用濃度で十分な効果が見られた。

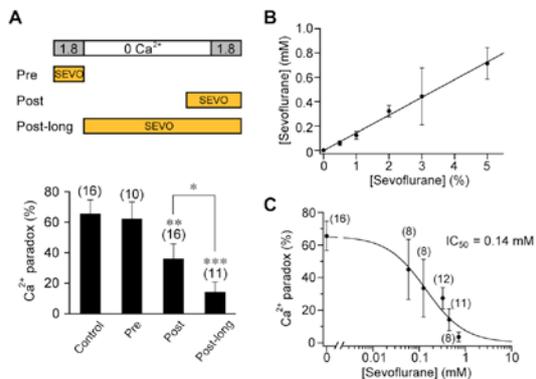


図 3. セボフルランによる  $\text{Ca}^{2+}$  パラドックスの抑制効果

(8) セボフルランは TRPC チャンネルに対する抑制効果を示した。

(9) セボフルランは無  $Ca^{2+}$  溶液灌流中の筋小胞体内  $Ca^{2+}$  レベルの低下を抑制した。

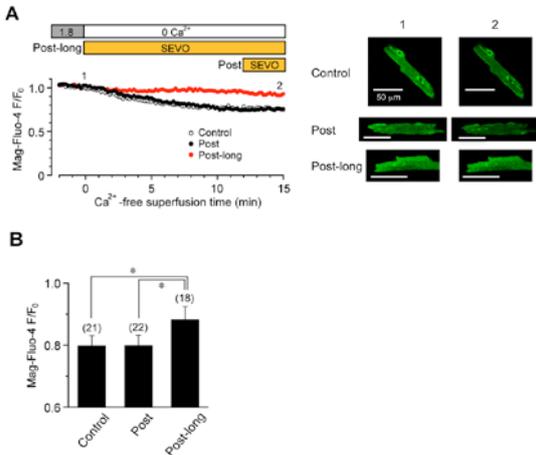


図 4. セボフルランによる筋小胞体内  $Ca^{2+}$  レベルの保持効果

(10) セボフルランは TRPC チャンネルの活性化を抑制することで、 $Ca^{2+}$  パラドックスの発生を強力に抑制した。

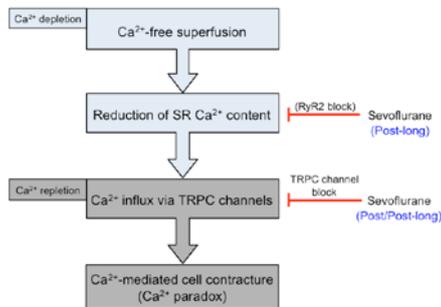


図 5. セボフルランによる  $Ca^{2+}$  パラドックス抑制メカニズム

$Ca^{2+}$  パラドックスの発生には TRPC チャンネルを通る  $Ca^{2+}$  流入が密接に関わっており、セボフルランは TRPC チャンネルの活性化を強力に抑制することにより  $Ca^{2+}$  パラドックス傷害から心筋を保護した。 $Ca^{2+}$  パラドックスは虚血再灌流傷害の一側面をなすと考えられるため、セボフルランの TRPC チャンネル抑制作用はセボフルランのもつ心筋保護作用の分子基盤の一つと考えら

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 3 件)

① Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Inhibitory effects of sevoflurane on pacemaking activity of sinoatrial node cells in guinea-pig heart. *Br J Pharmacol.* (in press) 2012, 査読有

② Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Sevoflurane protects ventricular myocytes from  $Ca^{2+}$  paradox-mediated  $Ca^{2+}$  overload by blocking the activation of transient receptor potential canonical channels. *Anesthesiology.* 115 巻(3), 509-522, 2011, 査読有

③ Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S.  $Ca^{2+}$  paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 161 巻(8), 1734-1750, 2010, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 小嶋亜希子、セボフルランは心筋細胞の  $Ca^{2+}$  ストアを保つことで  $Ca^{2+}$  パラドックスを抑制する、第 58 回日本麻酔科学会学術集会、2011. 5. 19、神戸

② Akiko Kojima, Sevoflurane protects cardiomyocyte from  $Ca^{2+}$  paradox by preserving SR  $Ca^{2+}$  and blocking TRPC channel, 2010 American Society of Anesthesiologists Annual Meeting, 2010. 10. 16, San Diego, California

③ 小嶋亜希子、セボフルランの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作用を介する心筋細胞の  $Ca^{2+}$  パラドックスの抑制、第 57 回日本麻酔科学会学術集会、2010. 6. 4、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 亜希子 (KOJIMA AKIKO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50447877

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

松浦 博 (MATSUURA HIROSHI)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60238962

尾松 万里子 (OMATSU MARIKO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80161397

北川 裕利 (KITAGAWA HIROTOSHI)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：50252391