

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791590

研究課題名(和文) 虚血再灌流傷害に対する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 basis underlying cardioprotective action of volatile anesthetics on ischemia/reperfusion injury

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は虚血再灌流傷害を想定して、虚血再灌流時に発生する細胞内Ca²⁺制御機構の異常に起因した細胞傷害モデルであるオキシゲンパドックス(過酸化水素による傷害)、Ca²⁺パドックス(筋小胞体内Ca²⁺枯渇による傷害)をマウス心室筋細胞に施し、吸入麻酔薬セボフルランによる心筋保護効果を、共焦点レーザー顕微鏡下のCa²⁺イメージング法およびパッチクランプ法を用いて検討した。

その結果、セボフルランは複数のCa²⁺輸送タンパク質をブロックすることにより、これらの細胞傷害から心筋細胞を保護することを明らかにした。この細胞保護効果はセボフルランの持つ心筋保護作用の一端を担うと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The disturbance of intracellular Ca²⁺ homeostasis occurs in myocardium during ischemia/reperfusion and is responsible for cellular injury leading to cardiac dysfunction, namely ischemia/reperfusion injury. We investigated the molecular mechanisms underlying cardioprotective action of the volatile anesthetic sevoflurane on ischemia/reperfusion injury, using experimental models for Ca²⁺ overload-induced cellular injuries mediated by oxidative stress or store operated Ca²⁺ entry (SOCE) process. We found that sevoflurane protects mouse ventricular myocytes against these cellular injuries, presumably by affecting multiple Ca²⁺ transporting pathway, including ryanodine receptor, Na⁺/Ca²⁺ exchanger and SOCE channel. These actions appear to produce the cardioprotection on ischemia/reperfusion injury associated with intracellular Ca²⁺ overload.

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：麻酔学 心筋虚血再灌流傷害 心筋保護 吸入麻酔薬 Ca²⁺輸送タンパク質

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）。その原因として再灌流に伴って発生する細胞内 Ca^{2+} 過負荷が挙げられており、オキシゲンパラドックスと Ca^{2+} パラドックスはその主要な発生機転と考えられている。我々はこれまでに Ca^{2+} パラドックスが、筋小胞体（SR）内の Ca^{2+} 含量の減少により活性化された TRPC (transient receptor potential canonical) チャンネルを介する Ca^{2+} 流入により発生することをマウス心室筋細胞においてはじめて明らかにした。さらに、この Ca^{2+} パラドックスに対して、臨床使用濃度のセボフルランがポストコンディショニング作用を介して有効に抑制することを示し、セボフルランのもつ新たな心筋保護作用の分子基盤を解明した。

一方、オキシゲンパラドックスは再灌流時に爆発的に産生される活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) に起因する。ROS は、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスを制御するタンパク質（細胞膜 L 型 Ca^{2+} チャンネル、 Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX)、TRPC チャンネル、リアノジン受容体 (RyR2) 等) に酸化作用をおよぼし、その破綻（細胞内 Ca^{2+} 過負荷による細胞拘縮や細胞死）を引き起こす。吸入麻酔薬はこのオキシゲンパラドックスに対して保護作用をおよぼしていると考えられているが、その作用機序は十分には解明されていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、吸入麻酔薬のもつ心筋保護作用の分子基盤を明らかにする目的で、心筋虚血再灌流傷害であるオキシゲンパラドックスと Ca^{2+} パラドックスに対する吸入麻酔薬の作用を、TRPC チャンネルやリアノジン受容体などの Ca^{2+} 輸送タンパク質に着目して電気生理学的、分子生物学的手法により検討を行う。得られた知見は、周術期における吸入麻酔薬の心筋保護作用の理解のみなら

ず、そのメカニズムを応用して広く心筋虚血再灌流傷害の予防・治療戦略の構築に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

- (1) 正常マウス心臓から酵素処理により単離した心室筋細胞に蛍光 Ca^{2+} 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^{2+} 濃度のイメージングおよび細胞形態の観察を行った。正常タイロード液に H_2O_2 (100 μ M) を加えた溶液で心筋細胞を 15 分間灌流し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と異常収縮、細胞拘縮（細胞死）を誘発した。
- (2) この現象における L 型 Ca^{2+} チャンネル、NCX や RyR2 等の関わりを、それらの抑制剤を用いて検討した。
- (3) パッチクランプ法を用い、異常収縮の原因として、早期および遅延後脱分極 (early and delayed afterdepolarization; EAD、DAD) や異常自動能の発生の関わりについて検討した。
- (4) 臨床使用濃度 (1~5%) のセボフルランを H_2O_2 と同時に投与して、上記(1)、(3)の実験を行った。
- (5) 上記の実験から明らかとなったオキシゲンパラドックスおよび Ca^{2+} パラドックスに関わる Ca^{2+} 輸送タンパク質の心臓虚血再灌流傷害への関与を、ランゲンドルフ灌流心に虚血再灌流操作を行い、その阻害薬による左心室収縮期圧・拡張期圧の改善の有無で検討した。

4. 研究成果

- (1) マウス心室筋細胞において、15 分間の H_2O_2 (100 μ M) 灌流により、約 55% の細胞が細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とともに異常収縮を引き起こし、ついには細胞拘縮（細胞死）に至った。
- (2) この細胞死の発生率は、L 型 Ca^{2+} チャ

ネル、NCX、RyR2 の阻害薬にて減少したため、これらの Ca^{2+} 輸送タンパク質が、 H_2O_2 による細胞内 Ca^{2+} 過負荷に関与していることがわかった。

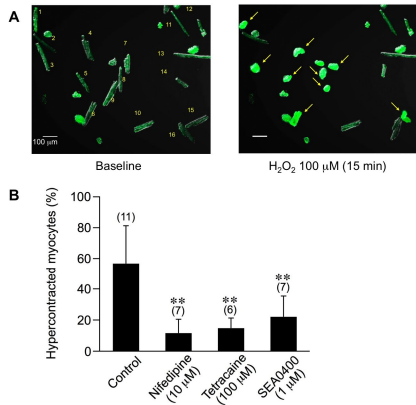


図1 H_2O_2 による細胞内 Ca^{2+} 過負荷を伴う細胞死の発生と、 Ca^{2+} 輸送タンパク質の関与

- (3) パッチクランプ実験から、 H_2O_2 (100 μM) は静止したマウス心室筋細胞に異常自動能の発生につながる DAD を引き起こすことがわかった。この DAD は NCX 阻害薬で発生が抑制された。
- (4) さらに H_2O_2 は、電気刺激存在下でのマウス心室筋細胞に EAD から triggered activity を発生させ、これも異常自動能の原因となることがわかった。この EAD の発生は L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬で抑制された。
- (5) これらの結果から、 H_2O_2 による細胞傷害の発生機転として、筋小胞体 RyR2 からの Ca^{2+} リーク NCX による Ca^{2+} 排出とそれに伴う細胞膜脱分極 (EAD, DAD) 異常自動能の発生と L 型 Ca^{2+} チャンネルを通る Ca^{2+} 流入、という Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻の可能性が考えられた。
- (6) 1~5% のセボフルランは濃度依存性に H_2O_2 による細胞死の発生率を減少させた。

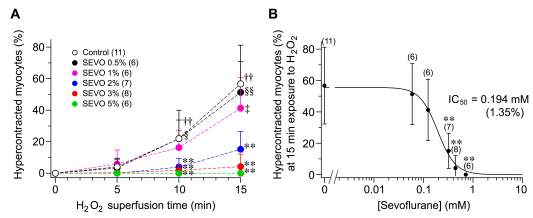


図2 H_2O_2 による細胞死の発生に対するセボフルランの抑制効果

- (7) セボフルランによる細胞死の減少には、DAD、EAD、triggered activity 発生の抑制作用が関わっており、その背景としてセボフルランによる RyR2、NCX、L 型 Ca^{2+} チャンネルの抑制作用の存在が、パッチクランプ法で明らかとなった。

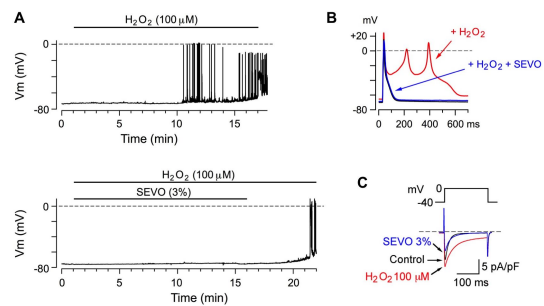


図3 セボフルランによる DAD、EAD、異常自動能発生の抑制

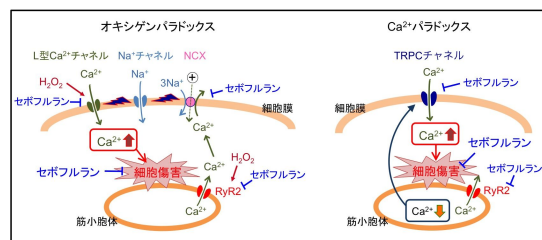


図4 オキシゲンパラドックスと Ca^{2+} パラドックスに関わる Ca^{2+} 輸送タンパク質と、セボフルランの作用部位

- (8) ラングENDORF 灌流下のマウス心臓に虚血再灌流を施行し、心機能 (左室 developed pressure ; LVDP) を評価したところ、再灌流時に TRPC チャンネル阻害薬 (2-aminoethoxydiphenyl borate ; 2-APB、 La^{3+}) を投与することによって、再灌流後の心機能が対照群と比較して有意に改善した。このことから、心臓虚血再灌流傷害に TRPC チャンネル

が関与していることが明らかとなった。

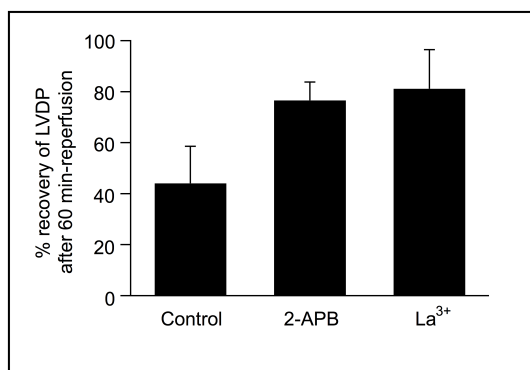


図5 TRPCチャネル阻害薬による虚血再灌流後の心機能の回復

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6件)

- (1) Kojima A, Ito Y, Kitagawa H, Matsuura H, Nosaka S (2014). Direct negative chronotropic action of desflurane on sinoatrial node pacemaker activity in the Guinea pig heart. *Anesthesiology* 120:1400-1413. 査読有。
- (2) Kojima A, Itoh Y, Kitagawa H, Matsuura H, Nosaka S (2013). Remifentanyl has minimal direct effect on sinoatrial node pacemaker activity in guinea-pig heart. *Anesth Analg* 117:1072-1077. 査読有。
- (3) Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2013). Sevoflurane protects ventricular myocytes against oxidative stress-induced cellular Ca²⁺ overload and hypercontracture. *Anesthesiology* 119:606-620. 査読有。
- (4) Kojima A, Matsuura H (2012). Electrophysiological importance of

embryonic stem cell-derived cardiac progenitors. *Circ J* 76:2746-2747. 査読有。

- (5) Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2012). Presence of store-operated Ca²⁺ entry in C57BL/6J mouse ventricular myocytes and its suppression by sevoflurane. *Br J Anaesth* 109:352-360. 査読有。
- (6) Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S (2012). Inhibitory effects of sevoflurane on pacemaking activity of sinoatrial node cells in guinea-pig heart. *Br J Pharmacol* 166:2117-2135. 査読有。

[学会発表](計7件)

- (1) 小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一。セボフルランはマウス心室筋細胞における store-operated Ca²⁺ entry に対して抑制作用をもつ。2013年、日本麻酔科学会(優秀演題)。
- (2) 小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一。セボフルランは酸化ストレスから心筋細胞を保護する。2013年、日本麻酔科学会。
- (3) 小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一。デスフルランの心臓ペースメーカー細胞におよぼす直接陰性変時作用。2013年、日本麻酔科学会。
- (4) 小嶋亜希子。「若手奨励賞」受賞記念講演。2013年、日本麻酔科学会。
- (5) 小嶋亜希子、伊藤有紀、北川裕利、野坂修一。セボフルランによる洞房結節に対する陰性変時作用とその背景となるイオンチャンネル電流の抑制作用。2012年、

日本麻酔科学会。

- (6) 小嶋亜希子、北川裕利、野坂修一。セボフルランの心臓ペースメーカー細胞におよぼす影響。2012年、日本心臓血管麻酔学会。
- (7) 小嶋亜希子、北川裕利、伊藤有紀、野坂修一。Oxidative stressによる細胞傷害に対するセボフルランの心筋保護作用。2012年、日本蘇生学会。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 亜希子 (KOJIMAAKIKO)
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・教授
研究者番号：50252391