



Nitric oxide donor, NOC7, reveals biphasic effect on contractile force of isolated rat heart after global ischemia

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岳, 輝 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/374">http://hdl.handle.net/10271/374</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 505号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏 名	岳 輝		
論文題目	<p>Nitric oxide donor, NOC7, reveals biphasic effect on contractile force of isolated rat heart after global ischemia  (一酸化窒素ドナーNOC7 はラット孤立心筋モデル全虚血後の心収縮力に二相性に作用する)</p>		

博士(医学) 岳 輝

## 論文題目

Nitric oxide donor, NOC7, reveals biphasic effect on contractile force of isolated rat heart after global ischemia  
(一酸化窒素ドナーNOC7はラット孤立心筋モデル全虚血後の心収縮力に二相性に作用する)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

心肺蘇生後には心機能障害が発生することが多い。しかしこの不安定な血行動態を改善する適切な薬物治療はまだ報告されていない。

一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) ドナーはこの状況を改善する有望な薬物であるとされる。摘出乳頭筋では何種類かのNOドナーに陽性変力作用があることが示されているが、全虚血後の臓器レベルでの心機能回復作用については不明である。ラット乳頭筋モデルでNOドナーは低濃度で心収縮力を増加させ、高濃度では元のレベルに戻る作用があるとされている。機序として、NOドナーの投与によりサイクリックアデノシン1リン酸 (cAMP) とサイクリックグアノシン1リン酸 (cGMP) の細胞内濃度が変化することが報告されている。

今回 Langendorff 装置を用い、NOドナーの一種である3-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitroso -hydrazino)-N-methyl-1-propanamine (NOC7) が全虚血後ラット孤立心筋モデルの心機能を改善するか否か、また、細胞内メッセンジャーcAMPとcGMPがこの作用に関係するか否かを調べた。

[材料ならびに方法]

Sprague-Dawley (SD) ラット (体重250 – 270 g, 36匹) の心臓をペントバルビタール麻酔下に摘出し、modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB) 灌流液を用いたLangendorff装置で80 cm H<sub>2</sub>Oの定圧灌流をし、灌流を遮断して35分間の全虚血負荷を行った。次にNOC7をそれぞれ0.2, 2.0, 20, 200  $\mu$ M (各群n=6) となるよう灌流液に加え、30分間の再灌流を行った。虚血負荷を行わずKHB単独で灌流を行ったものをsham control群 (SC群, n=6) とした。再灌流時にNOC7を加えずKHB単独で再灌流したものをischemic control群 (IC群, n=6) とした。

心機能の指標としてLeft ventricular developed pressure (LVDP),  $dP/dt_{\max}$ ,  $dP/dt_{\min}$ を測定した。冠灌流量は灌流回路内に組み込んだ超音波流量計で測定した。各指標の測定時点はbaseline (全虚血負荷直前)、再灌流5分、10分、20分、30分とした。測定終了後に心尖部より心筋組織を採取しcAMPとcGMPを酵素免疫法にて測定した。

[結果]

IC群では35分間の全虚血により再灌流10分でLVDPはbaselineの $13.0 \pm 4.5 \%$  まで低下した ( $p < 0.05$ )。IC群とNOC7 0.2  $\mu$ M群では再灌流30分でbaselineの $48.8 \pm 6.1 \%$  と $51.0 \pm 11.5 \%$  となった ( $p < 0.05$ )。NOC7 2.0, 20 $\mu$ M群の再灌流30分ではそれぞれ $119.1 \pm 0.5 \%$ ,  $124.3 \pm 12.5 \%$  と回復した ( $p < 0.05$  vs IC群)。NOC7 200 $\mu$ MのLVDP再灌流30分値は $55.3 \pm 6.0 \%$  とIC群と同レベルであった。

同じく心収縮機能の指標である $dP/dt_{\max}$ , 拡張機能の指標である $dP/dt_{\min}$ ともに再灌流30分でNOC7 2.0, 20 $\mu$ M群にてSC群と同様なレベルまで回復したが、NOC7 200 $\mu$ M群ではIC群再灌流30分値と同レベルで

あった。冠灌流量は経過中各群間で不変だった。

心筋cAMP量はSC群で  $2.34 \pm 0.21$  pmol/mg proteinであり、35分間の全虚血により  $0.83 \pm 0.44$  pmol/mg proteinと有意に低下した ( $p < 0.05$ )。NOC7 2.0, 20, 200  $\mu$ M ではcAMPは  $1.79 \pm 0.39$ ,  $1.86 \pm 0.25$ ,  $2.63 \pm 0.24$  pmol/mg proteinとIC群に比べてそれぞれ上昇した ( $P < 0.05$ )。

心筋cGMP量はSC群で  $2.36 \pm 0.25$  pmol/mg proteinだったが、IC群では  $1.49 \pm 0.61$  pmol/mg proteinと低下した ( $P < 0.05$ )。NOC7 2.0, 20  $\mu$ M ではIC群よりもcGMPの上昇が見られたが有意なものではなかった。NOC7 200  $\mu$ M のcGMPは  $3.92 \pm 0.66$  pmol/mg proteinとIC群に比べて上昇した ( $P < 0.05$ )。

#### [考察]

NOC7 2.0, 20  $\mu$ Mは全虚血後のLVDP,  $dP/dt_{max}$ を含む心機能を改善した。しかし、本研究でのNOC7最大量200  $\mu$ Mでは同様な改善作用を認めなかった。これはラット乳頭筋モデルでNOドナーが二相性作用を示したという過去の研究に一致するが、本研究は臓器レベルで全虚血負荷後心機能障害で同様な作用を明らかにした最初の報告である。

NOドナーを投与すると細胞内でグアニルサイクラーゼを介しcGMPが産生される。このcGMPはフォスフォジエステラーゼⅢを抑制するため、心筋内のcAMPを上昇させる。上昇したcAMPはプロテインキナーゼA (PKA) を活性化させ心収縮力を増強させる。cGMPは心筋に直接作用して心筋収縮抑制的に働く。従来の研究では、細胞内cGMPはプロテインキナーゼG (PKG) を介しトロポニン I のリン酸化を進めるため心筋線維弛緩作用を表すことがin vitroで示されている。本研究のNOC7 2.0, 20  $\mu$ MではcAMPの陽性変力作用はcGMPの陰性変力作用に優ったと推測した。NOC7 200  $\mu$ M群ではcGMPの陰性変力作用がcAMPの陽性変力作用を上回ったと推測した。

この現象を修飾する因子として、1) 虚血再灌流に伴うフリーラジカル産生、2) フリーラジカルとNOの反応によるパーオキシナイトライト産生、これらによる心筋抑制作用がある。NOドナー投与による心収縮力変化とこれら修飾因子の作用との関係についてはさらなる研究が必要であろう。

虚血後不全心の冠動脈にNOドナーを投与し、冠灌流量上昇と心機能回復を示した報告があるが、本研究の冠灌流量は経過中変化していないことから、本研究の心収縮力回復作用は冠動脈酸素供給量上昇以外の要因によると考えられる。

#### [結論]

NOC7は全虚血後孤立心筋モデルの心収縮力で二相性反応を示した。cAMPとcGMPの濃度差がこのメカニズムに関係していると思われる。一定濃度の範囲でNOドナーを投与することは蘇生後心機能障害回復手段の一つと期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

心肺蘇生後の心機能障害を改善する薬物として、一酸化窒素 (nitric oxide, NO) ドナーが有望とされている。ラット乳頭筋モデルにおいて、NOドナーは低濃度で心収縮力を増加させ、高濃度では元のレベルに戻す作用があると報告されている。その機序として、NOドナーの投与によりサイクリックアデノシン1リン酸(cAMP) とサイクリックグアノシン1リン酸(cGMP) の細胞内濃度が変化することが報告されている。しかし、臓器レベルでの心機能回復作用については不明である。申請者は、NOドナーの一種であ

る 3-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitroso-hydrazino)-N-methyl-1-propanamine (NOC7) が、ラット孤立心筋モデル全虚血後の心機能を改善するか、またcAMPとcGMPがこの作用に関係しているかを検討した。

#### [材料ならびに方法]

SDラットの心臓をLangendorff装置で80 cm H<sub>2</sub>Oの低圧灌流をし、灌流を遮断して35分間の全虚血負荷を行った。NOC7をそれぞれ0.2, 2.0, 20, 200  $\mu$ M (各群n=6)となるよう灌流液に加え、30分間の再灌流を行った。再灌流時にNOC7を加えなかったものをischemic control群 (IC群, n=6)とした。心機能の指標としてLeft ventricular developed pressure (LVDP),  $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$ を測定し、冠灌流量は超音波流量計で測定した。各指標の測定時点はbaseline (全虚血負荷直前)、再灌流5分、10分、20分、30分とした。測定終了後に心尖部より心筋組織を採取し、cAMPとcGMPを酵素免疫法により測定した。

#### [結果]

実験結果の概要を以下に示す。

- (1) IC群では35分間の全虚血により、再灌流10分でLVDPはbaselineの $13.0 \pm 4.5\%$ まで低下した ( $p<0.05$ )。IC群とNOC7 0.2  $\mu$ M群では再灌流30分でbaselineの $48.8 \pm 6.1\%$  と  $51.0 \pm 11.5\%$  となった ( $p<0.05$ )。NOC7 2.0, 20  $\mu$ M群の再灌流30分ではそれぞれ $119.1 \pm 0.5\%$ ,  $124.3 \pm 12.5\%$ と回復した ( $p<0.05$  vs IC群)。NOC7 200  $\mu$ MのLVDP再灌流30分値は $55.3 \pm 6.0\%$ とIC群と同レベルであった。同じく心収縮機能の指標である $dP/dt_{max}$ , 拡張機能の指標である $dP/dt_{min}$ ともに再灌流30分でNOC7 2.0, 20  $\mu$ M群にてsham control群と同様なレベルまで回復した。冠灌流量は経過中各群間で不変だった。
- (2) 心筋cAMP量はsham control群で $2.34 \pm 0.21$  pmol/mg proteinであり、35分間の全虚血により $0.83 \pm 0.44$  pmol/mg proteinと有意に低下した ( $p<0.05$ )。NOC7 2.0, 20, 200  $\mu$ MではcAMPは $1.79 \pm 0.39$ ,  $1.86 \pm 0.25$ ,  $2.63 \pm 0.24$  pmol/mg proteinとIC群に比べてそれぞれ上昇した ( $P<0.05$ )。
- (3) 心筋cGMP量はsham control群で $2.36 \pm 0.25$  pmol/mg proteinだったが、IC群では $1.49 \pm 0.61$  pmol/mg proteinと低下した ( $P<0.05$ )。NOC7 2.0, 20  $\mu$ MではcGMPの上昇は有意でなかった。NOC 7200  $\mu$ MのcGMPは $3.92 \pm 0.66$  pmol/mg proteinとIC群に比べて有意に上昇した ( $P<0.05$ )。

#### [考察]

以上より、申請者は以下のように考察した。NO ドナーは細胞内でグアニルサイクラーゼを介しcGMPを産生する。cGMPはフォスホジエステラーゼⅢを抑制して心筋内のcAMPを上昇させ、プロテインキナーゼA (PKA) を活性化して心収縮力を増強する。cGMPはプロテインキナーゼG (PKG) を介しトロポニン I をリン酸化することにより線維弛緩作用を表す。本研究のNOC7 2.0, 20  $\mu$ M ではcAMPの陽性変力作用がcGMPの陰性変力作用に優ったと推測した。NOC7 200  $\mu$ M群ではcGMPの陰性変力作用がcAMPの陽性変力作用を上回ったと推測した。また、本研究の冠灌流量は経過中変化していないことから、心収縮力回復作用には冠動脈酸素供給量上昇以外の要因によると考えられる。一方、1) 虚血再灌流に伴うフリーラジカル産生、2) フリーラジカルとNOの反応によるパーオキシナイトライト産生による心筋抑制作用が修飾している可能性も考えられる。

審査委員会では、NOドナーが全虚血負荷後の心機能障害で同様な作用を臓器レベルで初めて明らかにしたことと、将来一定濃度の範囲でNOドナーを投与することが蘇生後の心機能障害回復手段となる可能性を示した点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) NOドナーとしてNOC7を使った理由
- 2) NOドナーの濃度はどのように決めたか
- 3) 冠灌流量はどのように測定したか
- 4) 心内圧を測定したバルーンのサイズは
- 5)  $dP/dt_{\max}$ と $dP/dt_{\min}$ の測定法と生理学的意味
- 6) NOドナーの作用を正常心臓で測定したか
- 7) PKAとPKGの細胞内シグナリング機構
- 8) 心筋収縮を抑制することによる心筋酸素需要量の変化
- 9) 脳血流および脳機能に対する作用に関して
- 10) プレコンデショニングとミトコンドリアのATP感受性Kチャンネルとの関係

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	林	秀 晴	
	副査	福 田 敦 夫	副査	吉 野 篤 人