



Difference in the cardioprotective mechanisms between ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 若原, 伸行 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1274

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 4 2 1 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 2 3 日
氏 名	若 原 伸 行		
論文題目	Difference in the cardioprotective mechanisms between ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts (ラットの心臓における虚血プレコンディショニングと diazoxide による薬理的プレコンディショニングの心筋保護機構の差異)		

論文題目

Difference in the cardioprotective mechanisms between ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts

(ラットの心臓における虚血プレコンディショニングとdiazoxideによる薬理的プレコンディショニングの心筋保護機構の差異)

論文の内容の要旨

[はじめに]

虚血プレコンディショニング(IPC)は、短時間の虚血・再灌流が先行すると、その後の長時間の虚血に対して心筋保護作用が生じるという現象である。IPC にアデノシンやオピオイド、プロテインキナーゼCなどが関係することが示されているが、その機構はまだ十分に解明されていない。最近の研究では、ミトコンドリアの ATP 感受性 K^+ チャネル(mitoK_{ATP})の開口や活性酸素種(ROS)の産生の重要性が報告されている。mitoK_{ATP} の開口が ROS を産生させ IPC のシグナル伝達に関与する可能性や、ミトコンドリアのCa²⁺過負荷の軽減や形態の保持に mitoK_{ATP} の開口が寄与してミトコンドリアを保護する可能性が報告されている。しかし、IPC における mitoK_{ATP} と ROS の関与を疑問視する報告も散見される。

本研究では、IPC と mitoK_{ATP} 開口薬である diazoxide(DZ) の心筋保護機構に関して、(1)シグナル伝達における mitoK_{ATP} と ROS の関与と、(2)細胞内pHとエネルギー代謝に及ぼす影響を調べることにより、比較検討した。

[材料ならびに方法]

ランゲンドルフ灌流装置を用いてラット摘出心を灌流し、左室内にラテックス製バルーンを挿入し左室圧を測定した。左室収縮能の指標としての左室発生圧(LVDP)は、左室収縮期圧と左室拡張期圧の差から求めた。³¹P 核磁気共鳴スペクトロスコピーを用い、心筋内のホスホクレアチン(PCr)とATP、無機リン酸(Pi)の含量を測定した。細胞内pHはPCrとPiの間の化学シフトから算出した。pH以外の測定結果は実験開始時の値の%で表記した。

全てのラット灌流心に30分虚血および40分再灌流を行った。虚血前の処置により以下の7つの実験群に割り当てた。

- (1)対照群(n=7) ; 無処置の群
- (2)DZ群(n=6) ; 虚血前に、mitoK_{ATP} 開口薬であるDZ(100 μ M)を10分間投与した群
- (3)DZ+5HD群(n=5) ; DZ と mitoK_{ATP} 阻害薬である 5-hydroxydecanoate (5HD; 200 μ M)を投与した群
- (4)DZ+NAC群 ; DZ と ROS スカベンジャーである N-acetylcysteine (NAC; 4mM)を投与した群
- (5)IPC群(n=6) ; 30分虚血の前に、2サイクルの5分虚血・5分再灌流を行った群
- (6)IPC+5HD群(n=4) ; preconditioning の間に 5HD を投与した群
- (7)IPC+NAC群(n=5) ; preconditioning の間に NAC を投与した群

[結果]

- (1) DZ と IPC は共に、対照群に比し再灌流40分後でのLVDP(DZ群 77 $\pm$ 4%(p<0.05)、IPC群

- 110±6% (p<0.05) vs 対照群 48±3%) と PCr (DZ群 50±3% (p<0.05)、IPC群 73±8% (p<0.05) vs 対照群 40±3%) を回復させた。
- (2) 5HDまたはNACの投与により、DZによる心筋保護効果は抑制された (LVDP ; DZ+5HD群 42±11% (p<0.05)、DZ+NAC群 39±4% (p<0.05) vs DZ群 77±4%、PCr ; DZ+5HD群 32±3% (p<0.05)、DZ+NAC群 39±4% (p<0.05) vs DZ群 50±3%)。一方、IPCによる保護効果は5-HDまたはNACにより抑制されなかった (LVDP ; IPC+5HD群 110±6%、IPC+NAC群 114±4% vs IPC群 110±6%、PCr ; IPC+5-HD群 72±8%、IPC+NAC群 68±6% vs IPC群 73±8%)。
- (3) IPCは虚血中の細胞内アシドーシスを軽減したが、DZにその作用は認められなかった (IPC群 6.28±0.04 (p<0.05)、DZ群 6.02±0.05 vs 対照群 6.02±0.06)。
- (4) DZは虚血20分でのATPレベルの低下を抑制したが、IPCではむしろ促進した (DZ群 26.3±3.4% (p<0.05)、IPC群 8.1±3.0% (p<0.05) vs 対照群 15.1±1.3%)。

[考察]

これまでの多くの報告と異なり、本研究の結果は IPC の心筋保護作用に $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ の開口や ROS の産生が関与しない可能性を示唆した。最近、DZ はミトコンドリア $\text{F}_1\text{Fo-ATPase}$ や細胞質 ATPase の阻害作用などの $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 開口以外の作用が報告されている。本研究の結果はこれらの作用を反映しており、DZ の保護作用の一因と考えられた。

また、これまでの報告と同様に IPC の虚血中のアシドーシス軽減作用が認められたが、DZ には虚血中のアシドーシス軽減作用は認められなかった。アシドーシス軽減作用は IPC に特有の作用であり、アシドーシスによるミトコンドリア呼吸鎖の障害の軽減や再灌流時の Na^+/H^+ 交換系と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系を介した Ca^{2+} 過負荷の軽減などが重要な役割を果たしていると考えられた。

[結論]

- (1) DZ の心筋保護効果には、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ の開口やROSの産生が関係しているが、IPC の保護効果にはこれらは関与しない。
- (2) DZ は虚血中の ATP レベルの低下を軽減し、IPC は虚血中のアシドーシスの軽減した。以上から、DZ と IPC の心筋保護効果の機軸はシグナル伝達およびエネルギー代謝の観点から異なることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

虚血プレコンディショニング (IPC) は、短時間の虚血・再灌流が先行すると、その後の長時間の虚血に対して心筋保護作用が生じるという現象である。IPC の機構は十分解明されていないが、IPC はミトコンドリアの ATP 感受性 K^+ チャンネル ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) を開口し、活性酸素種 (ROS) を産生し、このROSが何らかの機構を介して心筋細胞保護効果を発現するという説がある。しかしこの仮説を疑問視する報告もある。近年、 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ を開口させる diazoxide や nicorandil にも虚血・再灌流障害に対する保護作用あることが報告され、これらの薬物とIPCの作用機序の相違が興味ある問題点となっている。

本研究では摘出したラットの心臓をランゲンドルフ灌流装置で灌流し、虚血・再灌流時の左室発生圧 (LVDP) を測定した。同時に ^{31}P 核磁気共鳴スペクトロスコピーを用いて心筋内の ATP とホスホクレアチン (PCr) の含量、細胞内 pH (pH_i) を測定した。IPC と diazoxide により、これらの測定値がどのように変化するか、また IPC と diazoxide の効果が $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$

の阻害剤の 5-hydroxydecanoate (5-HD) や ROS スカベンジャーの *N*-acetylcysteine (NAC) により抑制される否かを調べた。

以下の結果が得られた。

- 1) Diazoxideは、再灌流時のLVDPとPCrレベルの回復を改善させた。Diazoxide は、虚血中のpH_iの低下には影響せず、ATPレベルの低下を軽減した。Diazoxide の LVDPとPCrレベルの改善効果は5-HDとNACのいずれによっても抑制された。
- 2) IPCも、再灌流時のLVDP と PCrレベルの回復を増加させた。しかし、Diazoxide とは異なり、IPCは、虚血中のpH_iの低下を軽減したが、ATPレベルの低下はやや増加した。また、IPCのLVDPやPCrレベルの回復への効果は5-HDやNACにより抑制されなかった。
- 3) CN化合物を虚血前に作用させると、虚血中のpH_iの低下の軽減と再灌流時のLVDPとPCrレベルの回復の増加が見られた。即ち、IPCと類似の効果が見られた。

以上の結果により、次の結論が得られた。

- 1) Diazoxideによる虚血・再灌流障害に対する保護作用にはmitoK_{ATP} の開口、活性酸素種の産生及び虚血中のATPレベル低下の軽減が関与する可能性がある。しかし、IPCによる保護作用には、このモデルではこれらは関与しない。
- 2) IPCにおいては、アシドーシスが軽減され、心筋保護作用がもたらされた可能性がある。CN化合物の前処置がIPCと類似の効果を示すことは、この考え方を支持する。IPCとCN化合物処置はいずれにおいても、酸化リン酸化が抑制され解糖が活性化したため、虚血前に心筋のグリコーゲンが減少し、その結果虚血中のプロトンの産生が減少しアシドーシスが軽減されと考えられる。

この研究により、mitoK_{ATP} 開口薬とIPCの作用機序及びその違いがより明確になったが、この知見は今後の虚血性心疾患の予防・治療薬の開発に有用と思われる。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 虚血プレコンディショニング(IPC)の効果の持続時間について
- 2) IPC の虚血時間及び回数と効果の関係
- 3) diazoxide の投与時間について
- 4) 左室発生圧(LVDP)は心筋障害の指標として適切か
- 5) *N*-acetylcysteine を虚血直前または再灌流の時のみに作用させると効果はどうか
- 6) 虚血中に発生する左心室圧上昇に対する IPC 及び diazoxide の影響について
- 7) LVDP の変化は非可逆的か
- 8) 活性酸素種(ROS) は虚血・再灌流のどの過程で発生するのか
- 9) 虚血中及び再灌流時に、ミトコンドリアでどのような変化が進行し、虚血・再灌流障害を軽減するのか
- 10) IPC に関与するとされるプロテインキナーゼCのタイプはどれか
- 11) diazoxide による虚血・再灌流障害の保護効果に関与する活性酸素種は何か
- 12) *N*-acetylcysteine はどの活性酸素種を減少させるのか
- 13) アデノシンの虚血・再灌流障害の抑制効果について
- 14) IPC による虚血・再灌流障害の保護効果と心筋グリコーゲン含量の関連について
- 15) 過酸化水素の効果について
- 16) IPC と diazoxide の併用効果について
- 17) IPC の効果は虚血中に到達したpHが重要なのか或いは再灌流時にpHが回復する時の変化の程度が重要なのか
- 18) delayed reperfusion した場合の LVDP の回復を調べたか

- 19) 代謝阻害剤の勤果に対する *N*-acetylcysteine の影響について
- 20) このモデルでみられた IPC の効果と *in vivo* で見られる効果の違いについて
- 21) IPC や diazoxide により冠流量が増加するのはなぜか
- 22) 細胞膜 K_{ATP} チャンネルの開口薬の虚血・再灌流障害に対する効果について

これらに対し、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	橋 本 久 邦		
	副査	数 井 暉 久	副査	渡 邊 裕 司