

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	丹保 亜希仁
<p>Accelerated inactivation of cardiac L-type calcium channels triggered by anaesthetic-induced preconditioning</p> <p>(麻酔プレコンディショニングによる、心筋L型カルシウムチャンネル不活性化の促進)</p> <p>共 著 者 名 Hogan CS, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Kwok WM</p> <p>British Journal of Pharmacology 2009 Feb;156(3):432-43</p>			
<p>研 究 目 的</p> <p>短時間、可逆性の心筋虚血の繰り返しによりもたらされる心筋のプレコンディショニング作用 (Ischaemic Preconditioning; IPC) は1986年にMurryらにより発表された心筋保護作用である。その後、吸入麻酔薬による心筋プレコンディショニング作用 (Anaesthetic-induced Preconditioning; APC) がIPCと同様の心筋保護作用をもたらす研究が1997年にKersternらにより報告された。<sup>1</sup> APCの効果は、最初に心筋梗塞巣の縮小が証明され、その後にAPC発現の機序としてG蛋白、プロテインカイネースC、一酸化窒素などの細胞内情報伝達系への作用が報告されてきた。また、パッチクランプ法を用いた細胞膜上のATP感受性カリウムチャンネルの関与についての研究も発表されている。<sup>2</sup> 虚血/再還流による心筋障害の機序として細胞内のカルシウム過負荷が大きな要因となっていることは既に明らかにされているが、細胞内へのカルシウムの流入に大きな役割を果たしているL型カルシウム (Ca) チャンネルとAPCとの関連についての報告はない。本研究では、イソフルランによるAPCとL型Caチャンネルとの関係について調査した。</p>			
<p>材 料 ・ 方 法</p> <p>今回の実験ではウイスターラットとダールSラット (180~280g)の二種類を用いた。ラットはin vivoでのAPC施行の有無により2群に分けられた (non-APC群, APC群)。APC群ではラットは30分間1.0 minimum alveolar concentration (MAC)のイソフルランに暴露され、その後30分間の回復時間を経てから心臓を摘出した。心筋細胞はランゲンドルフ回路を用いて型どおりに単離し、その浮遊液を室温(22°C)にて保存した。In vivo APCの効果を、酸化ストレスに対する耐性、パッチクランプ法を用いた電気生理学、ウエスタンプロット法を用いたカルモジュリンの定量、共焦点顕微鏡を用いた細胞質Ca<sup>2+</sup>濃度の定量、活動電位シミュレーションにて検討した。統計は、3群間の比較にはone-way ANOVAおよびScheffe's test、2群間の比較にはunpaired Student's t-testを用い、p&lt;0.05を有意差ありとした。</p>			
<p>成 績</p> <p>・ 酸化ストレス</p> <p>In vivo APCの効果を証明するために、non-APC群とAPC群における心筋細胞の酸化ストレスへの耐性を、酸化ストレスを与えないコントロール群を含めた3群で比較した。コントロール群に比べてnon-APC群では酸化ストレス後の心筋細胞の死亡率が有意に上昇した。APC群では酸化ストレスによる死亡率がnon-APC群と比較し有意に低下した。これらの結果からAPCが酸化ストレスへの耐性を上げることが証明された。</p>			

#### ・電気生理学

パッチクランプ法（ホールセルクランプ法）を用いて、L型Caチャンネルに対するAPCの効果を検証した。電流-電圧曲線、電流密度、活性化曲線、不活性化曲線、不活性化からの回復はnon-APC群、APC群間で有意差が認められなかった。L型Caチャンネル電流の不活性化を2重指数関数でフィッティングし、得られた時定数を比較したところ、APC群で有意に小さかった。このL型Caチャンネル電流の不活性化速度の促進による細胞外からのCa<sup>2+</sup>の電荷移動の変化を検討したところ、APC群で有意に減少していた。次に、電位依存性不活性化におけるAPCの効果を観察するため、細胞外液中のCa<sup>2+</sup>をBa<sup>2+</sup>に置き換えCa<sup>2+</sup>依存性不活性化が起こらないようにして実験を行った。これで得られたBa電流の不活性化の時定数は2群間で有意差を認めなかった。

#### ・ウエスタンブロット

Ca<sup>2+</sup>依存性のL型Caチャンネル不活性化に関与するカルモジュリンの定量を行った。ローディングコントロールにはβアクチンを用いた。カルモジュリンの発現はAPCによって影響を受けなかった。

#### ・共焦点顕微鏡

酸化ストレスを与えた後の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度をnon-APC、APC群において測定した。両群とも、酸化ストレスにより細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は上昇したが、APC群ではその上昇がnon-APCと比較して有意に抑制された。

#### ・活動電位シミュレーション

APCによるL型Caチャンネルの不活性化の促進と、活動電位の関係を検討するためにFox-McHarg-Gilmourモデルを用いてシミュレーションを行った。ホールセルクランプ法で得られたデータを用いてシミュレーションを行ったところ、活動電位時間はコントロールに比べて短縮した。また、APCによってL型Caチャンネル電流の不活性化が促進されたが、カルモジュリン量に変化しなかったことから、L型CaチャンネルのCa<sup>2+</sup>感受性を上げた場合の活動電位をシミュレーションした。L型CaチャンネルのCa<sup>2+</sup>感受性を28%上昇させた際のL型Caチャンネル電流の不活性化は5%の促進にとどまった。

#### ・ラットの種類による効果の差異

ラットの種類によるAPCの効果の違いについてダールSラットを用いて、酸化ストレスへの耐性、L型Caチャンネル電流の不活性化速度を観察した。酸化ストレスを与えないコントロール群に比べてnon-APC群では酸化ストレス後の心筋細胞の死亡率が有意に上昇した。ウイスターラットと違い、APC群での酸化ストレスによる死亡率はnon-APC群と有意差は認めなかった。さらに、L型Caチャンネル電流の不活性化速度も2群間で有意差は認めなかった。このように、APCに抵抗性のあるダールSラットではL型Caチャンネル電流の変化はみられなかった。

### 考 案

本研究では、イソフルランによるAPCによってL型Caチャンネル電流の不活性化が促進されることがわかった。また、電位依存性不活性化がAPCの影響を受けなかったことから、Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化が促進されたことが示唆された。この効果はAPCに抵抗性のダールSラットでは観察できなかったことから、L型Caチャンネル電流の不活性化はAPCによりもたされたと言える。

しかしながら、Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化が促進されるメカニズムについては不明である。Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化に関与するカルモジュリン量はAPCによって変化を受けなかったが、カルモジュリンの機能や前駆体の量などがAPCによって影響を受けている可能性がある。

L型Caチャンネル電流の不活性化の促進により、Ca<sup>2+</sup>流入や電気生理が影響を受けると考えられる。L型Caチャンネルは細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入のメインルートであり、虚血/再還流によるカルシウム過負荷やそれに引き続き起こるミトコンドリアへのカルシウム過負荷を軽減することでアポトーシスを防いだり遅延させている可能性がある。実際に今回の研究で、APCによる細胞内Ca<sup>2+</sup>の電荷移動の減少、酸化ストレス後の細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇の抑制が観察された。今回の研究で、注目すべきは電気生理学のプロファイルの中で不活性化の速度だけがAPCによって変化を受けたことである。吸入麻酔

薬は直接的にはチャンネル電流を減少させ、心筋の収縮力を弱めることがわかっている。イソフルレンによるプレコンディショニングではこの作用は認めなかった。最近の研究で、L型Caチャンネル電流のピークを保ち、不活性化を促進することが不整脈を防ぐのに効果的という報告がある。今回の研究で得られたAPCの効果は不整脈予防に効果がある可能性がある。

## 結 論

In vivo APCによって、L型Caチャンネル電流の不活性化は促進された。これは電位依存性不活性化がAPCの影響を受けなかったことから、Ca<sup>2+</sup>依存性不活性化が促進されたことが示唆された。ただし、その生理学的機序は不明である。このL型Caチャンネルの変化は、虚血/再還流障害による心筋細胞のカルシウム過負荷およびそれに伴う細胞死から心筋細胞を保護すると考えられる。




## 引 用 文 献

1. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Wartier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K<sub>ATP</sub> channels. reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; 87: 361-70
2. Stadnicka A, Marinovic J, Bienengraeber MW, Bosnjak ZJ. Impact of in vivo preconditioning by isoflurane on adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the rat heart: lasting modulation of nucleotide sensitivity during early memory period. *Anesthesiology* 2006;104:503-10.
3. Marinovic J, Bosnjak ZJ, Stadnicka A. Distinct roles for sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in isoflurane-induced protection against oxidative stress. *Anesthesiology* 2006;105:98-104

## 参 考 論 文

1. Wan TC, Ge ZD, Tampo A, Mio Y, Bienengraeber MW, Tracey WR, Gross GJ, Kwok WM, Auchampach JA. The A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist CP-532,903 [N6-(2,5-dichlorobenzyl)- 3'-aminoadenosine-5'-N -methylcarboxamide] protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 324(1):234-43.
2. Bodiga S, Zhang R, Jacobs DE, Larsen BT, Tampo A, Manthathi VL, Kwok WM, Zeldin DC, Falck JR, Gutterman DD, Jacobs ER, Medhora MM. Protective actions of epoxyeicosatrienoic acid: Dual targeting of cardiovascular PI3K and K<sub>ATP</sub> channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(6):978-88.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	丹保 亜希仁
審査委員長 長谷部 直幸 			
審査委員 高井 章 			
審査委員 岩崎 寛 			
学 位 論 文 題 目 Accelerated inactivation of cardiac L-type calcium channels triggered by anaesthetic-induced preconditioning  (麻酔プレコンディショニングによる、 心筋 L 型カルシウムチャンネル不活性化の促進)			
<p>吸入麻酔薬が虚血性心筋障害の軽減効果をもたらす現象は、「麻酔プレコンディショニング」として知られていますが、その発現メカニズムは十分に明らかにされておられません。申請者は、「麻酔プレコンディショニング」の心筋保護機序を明らかにするために、イソフルレンを吸入させて麻酔前処置を行ったラット心臓から酵素処理により単離した心室筋細胞を用いて研究を行いました。</p> <p>この細胞では、過酸化水素および鉄暴露による酸化ストレスで誘発される心筋細胞死が有意に抑制されることを確認し、吸入麻酔後の心筋に何らかの保護機転が作用していることを確認しました。次に行った膜電位固定による全細胞膜電位測定によって、L 型 <math>Ca^{2+}</math> チャンネルの不活性化過程が促進されている現象を見いだしました。</p>			

また fluo4 を用いた測定により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が抑制されていることを明らかにしました。さらにこの現象は、少なくともカルモジュリンの発現量の変化を伴うものではないことを確認しました。

申請者らが見出したこれらの現象は、イソフルレンの「麻酔プレコンディショニング」作用という、臨床的にも有益な作用が、少なくとも部分的には、L型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの開閉カイネティクスの変化を介することを示したものであり、虚血・再灌流心筋障害の主要過程でもあるCa過負荷を抑制することが、そのメカニズムの一つである可能性を示唆したものです。

諮問審査においても適切かつ論理的な回答が得られ、申請者は関連領域において十分な知識を有することが示されました。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が医学博士の学位に値するものであると判定致しました。

— 以上 —