

プレコンディショニングの機構について

所属機関 昭和大学医学部第三内科
研究者名 片桐 敬

研 究 の 概 要

心臓におけるプレコンディショニングは、短時間の虚血が先行することにより、その後遭遇する長時間の虚血に対する抵抗性を獲得することをいう。すなわち、血流の停止に伴って、心筋は強い虚血状態に陥り、それが一定時間を越えると不可逆性になり心筋梗塞を発症するが、壊死を生じない程度の極短時間の虚血の先行によって、その後続く長時間の虚血に対して抵抗性を獲得し、虚血性障害が軽減される。この現象は、薬物や心臓カテーテル手技を用いての外因的な機序ではなく、心筋自体が有する内因性の心筋保護機構を発現させることである。プレコンディショニングの機序の解明は新しい虚血心筋保護法の開発の一助となると思われる。本研究では、プレコンディショニングの機序の解明のため、5施設の研究者からなるグループを結成した。プレコンディショニングとしてラットの灌流心や成犬の心臓を用い短時間の虚血を繰り返す、引き続き長時間の虚血を作成すると、プレコンディショニングを行わないものに比較して梗塞心筋領域の減少、心機能の保持、また、再灌流に伴う重篤な不整脈の減少が確認された。プレコンディショニングの機序にATPの代謝物であるアデノシンの関与が推察された。アデノシンA₁受容体、ATP感受性Kチャンネル、Gi蛋白などの細胞器官やメディエーターの遮断によってプレコンディショニング効果は減弱し、アデノシンに関与する反応の関与が証明された。虚血心筋細胞内では、虚血によるpH低下の抑制、カルシウムイオン、ナトリウムイオンの増加が抑制された。ATP感受性Kチャンネルの開口作用をもつニコランジル投与によりプレコンディショニング効果は増強され、抗不整脈薬としてのナトリウムチャンネル遮断薬も細胞内のカルシウムイオンやナトリウムイオンの虚血による異常な増加を抑制することにより心筋保護効果を示した。臨床的には前壁中隔梗塞で梗塞前狭心症を有する症例は、有しない症例に比較して、慢性期の心機能が有意に良好であった。プレコンディショニングの機構の成果は虚血性心筋保護効果の可能性を強く示唆し、冠動脈インターベンションや開心術などにおける臨床応用の可能性を強く示唆した。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
片桐 敬	昭和大学医学部第三内科教授	総括及び成犬心の微小器官の代謝の生化学的、超微形態的検討
望月 正武	東京慈恵会医科大学 青戸病院内科教授	灌流心モデルにおける心筋代謝の検討
竹尾 聡	東京薬科大学薬理教授	灌流心モデルにおける心筋代謝の検討
市原 和夫	北海道薬科大学薬理教授	成犬心における代謝変化の検討
仲澤 幹雄	新潟大学医学部薬理助教授	単離心筋細胞を用いてのアデノシンの由来の検討

研 究 報 告

I 研究目的

短時間の虚血の先行によって長時間の虚血に対する耐性が獲得され、引き続く長時間の虚血による心筋傷害が軽減されることが Murry ら (Circulation 74: 1124-1136, 1986) により ischemic preconditioning (PC) として発表され、新たな心筋保護法として注目されている。プレコンディショニングは再灌流性心室性不整脈の抑制、心筋梗塞巣の縮小、心収縮能の保持などの有益な心筋保護効果を示し、臨床的にも梗塞前狭心症を有する症例の方が心筋梗塞後の心機能が良好なことが経験されてきている。

本研究の目的はプレコンディショニングの機序を解明し、虚血心筋障害に対する新しい心筋保護法として臨床への応用を検討することである。

II 研究計画及び材料と方法

1 ラット心 in situ モデルにおいて 5 分間の先行する虚血を繰り返してから 30 分間の虚血を作成したプレコンディショニング (PC) 群と単純に 30 分間の虚血を作成したものにおいて、梗塞巣のサイズを TTC 染色し比較定量した。また、再灌流後の心室頻拍 (VT)、心室細動 (VF) などの重篤な不整脈の発生の差異を比較し、PC 効果を検討した。

2 成犬を用いて、PC を施行した群と対照の単純に長時間の虚血を作成した群との血行動態 (心拍出量、左室圧、冠血流量、局所心筋血流量) と超音波クリスタルを使用した虚血部心筋の左室壁運動を %segment shortening (%SS) として評価、さらに虚血部心筋に微小ガラス電極を挿入し、PC を施行した群との心筋間質 pH 変化についても比較検討した。PC 効果を細胞微小器官レベルで検索するために虚血部心筋における高エネルギーリン酸化化合物などの変化や、小胞体 (SR: sarcoplasmic reticulum) の Ca 依存性 ATPase 活性やミトコンドリア呼吸酵素活性の差異を検討した。電子顕微鏡的に心筋細胞傷害の程度についても観察した。

3 アデノシンは PC の機序において重要な代謝物であり、ラット心筋細胞を用いて、アデノシンの由来について検討した。先行する短時間の虚血中に遊離されると想定されるため、培養心筋細胞を deoxyglucose (30mM)、oligomycin (2 μ M/ml) で処理し、虚血類似

のシミュレーションとし、細胞内外の ATP、ADP、AMP、IMP、アデノシン等を測定した。

4 PCの機序として、アデノシン A₁受容体の活性化を検討してきたが、PC効果に対してアデノシン A受容体の拮抗薬である 8-phenyltheophylline (8-PT)、ATP感受性 Kチャンネルの遮断薬である glibenclamide、さらに Gi 蛋白抑制薬である pertussis toxin 投与でプレコンディショニング効果が消失するかどうかを検討して機序の類推を計った。

5 プレコンディショニングの効果を薬理的に再現できるかどうかを検討するため ATP感受性 Kチャンネルの開口作用が認められている nicorandil や一部の β遮断薬 (tilisolol) を投与することによる PC効果を、ischemic preconditioning 時の血行動態、心筋微小器官の酵素活性の変化と比較検討した。

6 プレコンディショニングの発現に虚血部心筋細胞内の pH低下の抑制や細胞内カルシウム、ナトリウムの代謝などの関与が推察され、ラット灌流心に蛍光色素マーカである Fura2/AM、SBF1 あるいは BCECF をローディングして細胞内カルシウム [Ca²⁺]_i、細胞内ナトリウム [Na⁺]_i、pHi の変化を比較検討した。

7 プレコンディショニングの機序を考える上で、PC効果は低酸素負荷でも現れるか検索するために、ラット灌流心モデルで40分間の虚血に先行して10分間の低酸素負荷、10分間の再灌流の hypoxic preconditioning を施行し、ischemic preconditioning で認められたアデノシン A₁受容体や ATP感受性 Kチャンネルの関与の有無について検討した。

III 研究成果

1 ラットの左冠動脈を2分間閉塞、5分間再灌流を3回繰り返して ischemic preconditioning (PC) として、その後再度30分間の冠結紮をし、30分間の再灌流を加えた。PCを行わなかった群においては TTC染色により評価した梗塞巣(心室全重量に対する梗塞巣の重量比:%)は33%であったが、PCを行ったものでは14%にまで縮小が確認された(図1)。梗塞後の再灌流不整脈に対しても30分間の虚血後の重篤な心室性不整脈(VT:心室頻拍、VF:心室細動)の発生は図2に示すように明らかに減少しており、PC効果が確認された。

2 成犬心に5分間冠閉塞、10分間再灌流を4回繰り返して、ischemic preconditioning (PC) とし、引き続いて60分間の冠閉塞後60分間の再灌流を行い血行動態をモニターすると、PC中の再灌流に冠血流はオーバーシュートしたが60分虚血60分再灌流終了時には虚血群(1群)と差を認めなかった。虚血部心筋壁運動の指標としての%segment shorteningはコントロール群で-30%の dyskinesia を呈したのに対して PC群では40%の hypokinesia に留まった。梗塞部心筋から抽出した小胞体 Ca依存性 ATPase 活性は PC群では非梗塞部心筋の79%(心内膜側)に対し、コントロール群では41%にまで低下した。

ミトコンドリアの呼吸活性(State III呼吸活性)は、コントロール群の非梗塞心筋の活性の54%(内膜側)にまで低下していたのに対して PC群では70%にまで保持されていた。以上のように PCにより梗塞部心筋壁運動が保たれ、その原因としてはエネルギー産生系のミトコンドリアや収縮系の小胞体機能の保持が認められた。また、超微形態学的には、PCにより梗塞部心筋の壊死性変化が有意に軽減された。

3 アデノシンは冠血流の調節因子としてよく知られており、特に虚血時に局所心筋における産生増加と冠血管拡張作用が知られている。アデノシンの産生が短時間の虚血の間

にも増加して PC に関与していることは、後述のアデノシン A 受容体阻害薬による結果からも推測されている。アデノシンは ATP (adenosine triphosphate) の代謝産物であり、protein kinase C や 5'-nucleotidase の活性化、K 感受性 ATP チャンネルの開口が報告されており、PC 効果の発現に重要な位置を占める。

虚血・再灌流におけるアデノシンの由来を検索するために、コラゲナーゼ処理により分離したラット心筋細胞を培養し、deoxyglucose (30mM)、oligomycin ($2\mu\text{M}/\text{ml}$) 処理で虚血類似のシミュレーションとし、ecto-5'-nucleotidase の抗体による阻害やアデノシン輸送の阻害薬である dipyridamole 処理などを組み合わせて行った。Ecto-5'-nucleotidase の抗体により細胞外のアデノシン産生が抑制されたこととアデノシン輸送機構の阻害薬である dipyridamole によりアデノシン濃度が変わらなかったことにより、細胞外アデノシンは細胞内から遊離されたというよりはむしろ細胞外 AMP から ecto-5'-nucleotidase により産生されたと考えられ、かつこのアデノシンの前駆物質である AMP は虚血に基づく細胞膜の透過性変化により心筋細胞から遊離した nucleotidase であると推察された (図 3)。

4 成犬心で確認された PC 効果に対して、アデノシン A 受容体の阻害薬である 8-phenyltheophylline (8-PT) を $10\text{mg}/\text{kgBW}$ 静脈内に前投与により、PC による %SS や小胞体 Ca 依存性 ATPase 活性、ミトコンドリア呼吸活性などの改善が消失し、単純に 60 分間虚血 60 分間再灌流を施行した虚血群 (1 群) と同様の値を示した。同様に、K 感受性 ATP チャンネルの阻害薬である glibenclamide の投与によっても微小器官の活性保持が消失した (図 4-1、4-2)。Gi 蛋白の抑制薬である pertussis toxin の投与によって、心筋間質に留置した微小ガラス電極によりモニターした虚血部心筋の pH は PC によるアシドーシスの軽減が有意に認められなかった (図 5)。図 6 に示すようにアデノシン A_1 受容体、ATP 感受性 K チャンネル、Gi 蛋白が心筋細胞膜上において関与し活性化されることにより PC 効果を生じているものと推察された。

5 このような PC の機序を踏まえて、薬理的に PC 効果が発現されるかという観点に立ち、K 感受性 ATP チャンネルの開口薬である nicorandil を PC に加えてさらに投与し Nic-PC 群とし、PC 群、単純虚血 (I) 群と比較すると、微小器官の酵素活性や虚血部壁運動 (%SS) の改善など ischemic preconditioning を増強する傾向がみられた (図 7、図 4-1、図 4-2)。β 遮断薬である tilisolol も ATP 感受性 K チャンネル開口作用があり、他の β 遮断薬以上に虚血による心筋のアシドーシス化を抑制した (図 8)。ラット心を用いた working heart 法による虚血・再灌流実験で PC を施行したものは、心筋内の高エネルギー化合物の維持および心筋内 H^+ 産生の抑制、細胞内ナトリウム ($[\text{Na}^+]_i$) 増加の抑制、そして細胞内カルシウム ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の有意な増加の抑制を示すことが蛍光色素指示薬を用いた実験から判明しており、この機序としてはプレコンディショニングにおいて Na^+/H^+ ポンプの亢進、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の抑制を生じたためと思われた (図 9-1、9-2)。これに基づいて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換系の抑制薬である Ni^{2+} を投与すると、PC を行ったものにおいても高率に再灌流不整脈が出現した (図 10)。このような細胞内イオン環境の変化を調節することも、プレコンディショニングにつながる可能性があり、最近、抗不整脈薬として使用されているナトリウムチャンネル遮断薬 (Na channel blocker) にもこの効果が期待される。ラット灌流心において再灌流後の心機能として左室拡張期圧 (LVDP) を指標に検討すると、心筋中の Na^+ 、 Ca^{2+} 濃度と LVDP には負の相関があり (図 11)、左室拡張期圧の回復はナトリ

ウムチャンネル遮断薬としての強さに比例していた。このようにオリジナルの ischemic preconditioning の機序を検討し、その変化を薬理的に再現し PC 効果を期待することも可能と考えられる。

6 Hypoxic preconditioning は ischemic preconditioning と同様に長時間 (40 分間) の虚血・再灌流直後の左室拡張終期圧の上昇の著明な軽減や心機能の良好な回復などのプレコンディショニング効果が証明された。この機序に関して ischemic preconditioning で確認されているアデノシン A₁ 受容体や ATP 感受性 K チャンネル、Gi 蛋白の関与をおのおのの阻害薬で検討したが、ischemic preconditioning と異なって抑制が認められないことにより、hypoxic preconditioning には他の機序が存在する可能性が示唆された。

IV 考 察

Ischemic preconditioning は成犬の実験で証明され、ラット、ブタ、ウサギなどの他種動物においても心筋梗塞巣の縮小、心機能の保持、重篤な再灌流発生の抑制などが確認されている。ヒトにおいても梗塞前狭心症を有する患者のほうが心エコーなどで評価する心機能、左室壁運動の保持が証明されており、また、冠血行再建術時のバルーンカテーテルのインフレーションでも 1 回目より、2 回目の方が心電図上の ST 変化が軽いことなども虚血に対する抵抗性を示している。運動負荷試験においても連続して 2 回施行すると、胸痛の出現が有意に遅延しており、大心静脈の血流には差を認めないが、アデノシンの遊離は 2 回目の方が有意に増加していた。

このように確認された ischemic preconditioning の機序としては (1) ATP 感受性 K チャンネルの開口、(2) フリーラジカル産生の抑制、(3) ATP 利用の低下、(4) H⁺ 産生の抑制、(5) アデノシン A₁ 受容体の活性化、(6) プロスタグランディンの産生、(7) ブラディキニンの産生、(8) プロテインキナーゼ C の活性、(9) ストレスプロテインの産生などが提唱されているが、その詳細はまだ明らかではない。

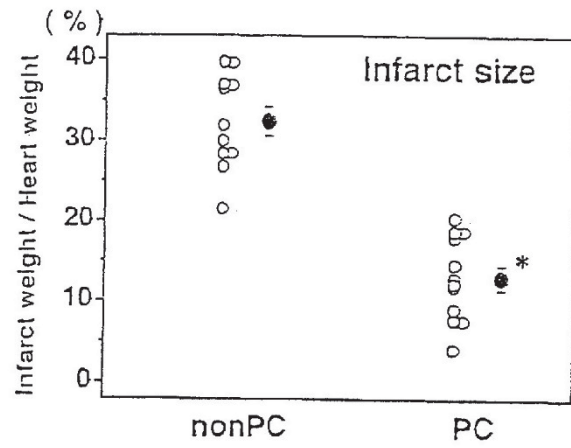
今回、ラット心灌流モデルや成犬心の虚血モデルなどの実験系を用いて、アデノシンの産生の由来、アデノシン A₁ 受容体の活性化、ATP 感受性 K チャンネルの開口、Gi 蛋白の活性化などが ischemic preconditioning に関与していることが証明された。また、この現象に基づいて細胞内の pH 低下の抑制、細胞内カルシウムやナトリウムの増加の抑制が生じていることが判明した。臨床応用のために薬理的プレコンディショニングを試み、ATP 感受性 K チャンネルオープナーの nicorandil や ATP 感受性 K チャンネルの開口作用を有する tilisolol (β 遮断薬) はプレコンディショニング効果を示した。また、抗不整脈薬として使用されているナトリウムチャンネル遮断薬も細胞内ナトリウムやカルシウムの増加を抑制することによりプレコンディショニング効果を有する可能性が示唆された。以上、プレコンディショニングのユニークな点は本来、生物そのものがもつ内因生の虚血耐性、一種のアダプテーションであり、この現象を再現することにより類似の効果を期待することができ、臨床応用の可能性を秘めていると考えられる。

V 研究成果の発表

1 石岡晴彦、下司映一、荒田浩久、富田昌孝、木庭新治、鈴木 洋、伊藤誠司、迎 修司、吉津 徹、今野 述、柳下俊邦、片桐 敬：急性虚血心に対する preconditioning

- の効果、心筋の構造と代謝 15 巻、p199-206, 1992
- 2 石岡晴彦、下司映一、荒田浩久、岩田俊樹、富田昌孝、伊藤誠司、迎 修司、今野 述、柳下俊邦、片桐 敬：Ischemic preconditioning における adenosine receptor の関与—8-PT を用いた検討—、心筋の構造と代謝 16 巻、p119-129, 1993
 - 3 下司映一、石岡晴彦、渡部琢也、岩田俊樹、荒田浩久、今野 述、柳下俊邦、片桐 敬：Ischemic preconditioning に対する Nicorandil の効果、Therapeutic Research 15：1389-1397, 1994
 - 4 片桐 敬、荒田浩久、石岡晴彦、伊藤誠司、下司映一：虚血心筋のアダプテーション 虚血再灌流における心筋の動態、第 2 回 William Ganz Symposium (1994 年 4 月)、Therapeutic Research 15：4046-4052, 1994
 - 5 Ishioka H., Geshi E., Arata H. and Katagiri T.: Effect of preconditioning on ischemic myocardium. Showa Univ J Med Sci 7: 71-82, 1995
 - 6 Mochizuki S. and MacLeod K. T.: The effect of hypoxia on cytoplasmic Ca^{2+} during low Na^+ exposure in isolated cardiac myocytes from guinea pig. J Physiol London 446: 334, 1992
 - 7 MacLeod K. T. and Mochizuki S.: Effects of hypoxia and pH on cytoplasmic Ca^{2+} during Na^+ -free exposure in isolated cardiac myocytes from guinea pig. Biophys J 61: A 444, 1992
 - 8 望月正武、他：心筋虚血・再灌流と preconditioning の効果、循環器科 31:275-282, 1992
 - 9 望月正武、他：虚血・再灌流による心筋細胞障害と内因性の制御機構 Preconditioning の役割とその機序：Therapeutic Research 13：9-13, 1992
 - 10 望月正武、他：心筋虚血、低酸素時の Na^+ / Ca^{2+} 交換機構、Mebio 3：74-78, 1992
 - 11 Mochizuki S., et al.: Na^+ / H^+ exchanger and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in isolated perfused heart: possible role amiloride. Mol Cell Biochem 119: 151-157, 1993
 - 12 谷口正幸、小野寺達之、木下知子、江島正顕、田中文夫、石川眞一郎、望月正武、永野 允：Preconditioning における H^+ 産生の制御に関する研究、循環器科 34:590-596, 1993
 - 13 谷口正幸、小野寺達之、木下知子、田中文夫、江島正顕、奥村 允、石川眞「一郎、望月正武、永野 允：医学のあゆみ 162：13, 1992
 - 14 Takeda S., Ohashi T., Mochizuki S., et al.: Ischemic preconditioning attenuates the increase in $[H^+]_i$, $[Ca^{2+}]_i$ and $[Na^+]_i$ during prolonged ischemia in isolated rat hearts. in preparation
 - 15 Yamaguchi F., Nasa Y., Yabe K., Ohba S., Hashizume Y., Oaku H. and Takeo S.: Activation of cardiac muscarinic receptor and ischemic preconditioning effects in situ rat heart.: Submitted
 - 16 Yabe K., Nasa Y. and Takeo S.: Hypoxic preconditioning in isolated rat heart: lack of involvement of activation of adenosine A_1 receptor, G_i protein and ATP-sensitive K channel.: Heart and Vessels: in press

- 17 Yabe K., Nasa Y., Sato M. and Takeo S. : Enhancement of glycolysis during an early phase of reperfusion as a possible mechanism for preconditioning in isolated rat heart. : in preparation
- 18 Takeo S., Liu J-X., Tanonaka K., Nasa Y., Yabe K., Tanahashi H. and Sudo H. : Reperfusion at reduced flow rates enhances postischemic contractile recovery of perfused heart. *Am J Physiol* 268: H 2364-H 2395, 1995
- 19 Takeo S., Tanonaka K., Hayashi M., Yamamoto K., Liu J-X., Kamiyama T., Yamaguchi N., Miura A. and Natsukawa T. : A possible involvement of sodium channel blockade of class-1-type antiarrhythmic agents in postischemic contractile recovery of isolated, perfused hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 273, 1403-1409, 1995
- 20 Kamigaki M., Ichihara K. and Abiko Y. : Enhancement of ischemic myocardial metabolic derangement by glibenclamide. *Jpn J Pharmacol* 65: 121-129, 1994
- 21 Hayase N., Chiba K., Abiko Y. and Ichihara K. : Effects of tilisolol on ischemic myocardial metabolism in dogs. *Euro J Pharmacol* 260: 183-190, 1994
- 22 Kamigaki M., Ichihara K., Kohga Y. and Abiko Y. : Effect of glibenclamide on ischemic canine myocardium with glucose infusion. *Euro J Pharmacol*: in press 1995
- 23 Hayase N., Chiba K., Abiko Y. and Ichihara K. : Effects of tilisolol, a β -adrenergic blocking wity K_{ATP} channel opening agent, on ischemia-induced myocardial acidosis in dogs. *J Cardiovas Pharmacol*: Submitted
- 24 Miura K., Nakai T. and Ichihara K. : Effects of preconditioning on ischemic myocardial acidosis in dogs. *Am J Physiol*: Submitted
- 25 Sasage H., Nakazawa M., Arakawa M. and Imai S. : Contribution of cyclic GMP generation to relaxation by nipradilol in the rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 26: 85-91, 1995
- 26 Kato K., Nakazawa M., Masani F., Izumi T., Sibata A. and Imai S. : Ethanol injection on allylamine-induced experimental subendocardial fibrosis. *Alchol* 12: 233-239, 1995
- 27 仲澤幹雄、蔡 際群、今井昭一 : 心臓における細胞外 AMP の由来について、第 46 回日本薬理学会北部会抄録集 p31, 1995
- 28 仲澤幹雄、時 安雲、今井昭一 : 無マグネシウム灌流と虚血心筋代謝、心筋の構造と代謝 16 : 227, 1994



PC: preconditioning ☒

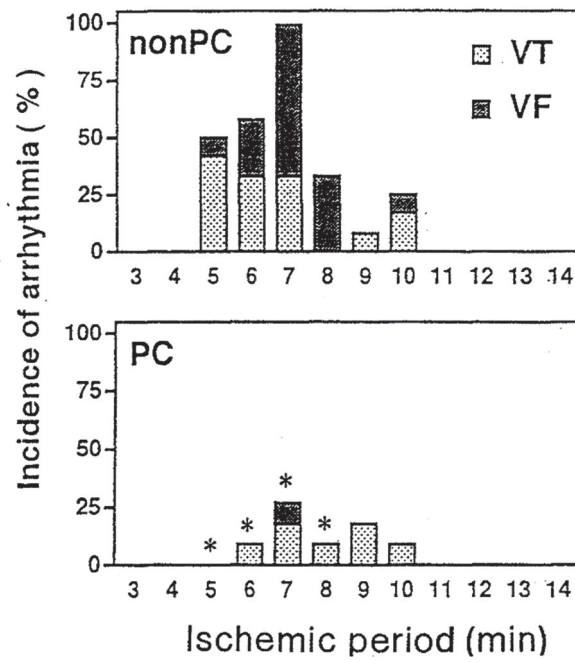


図 2

VT: 心室頻拍
VF: 心室細動

心筋細胞における adenosine 産生経路

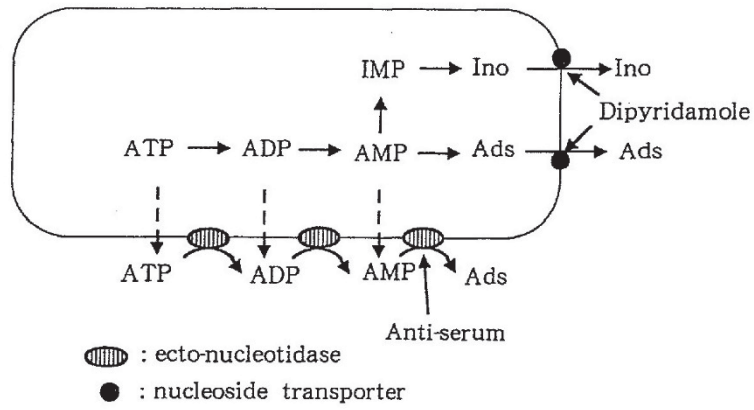


図 3

Ca²⁺ATPase Activity of SR

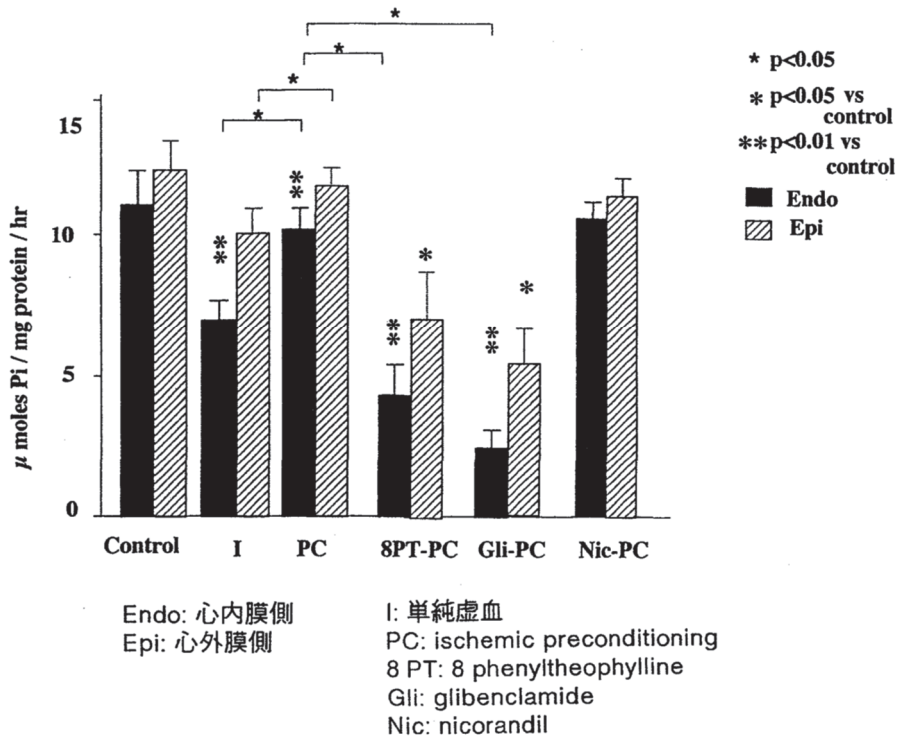


図 4-1

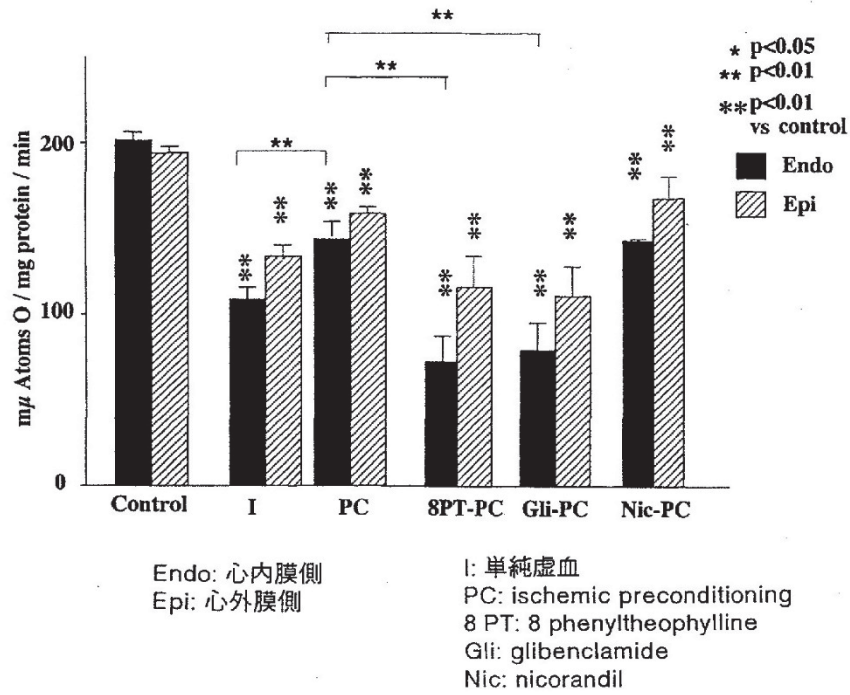
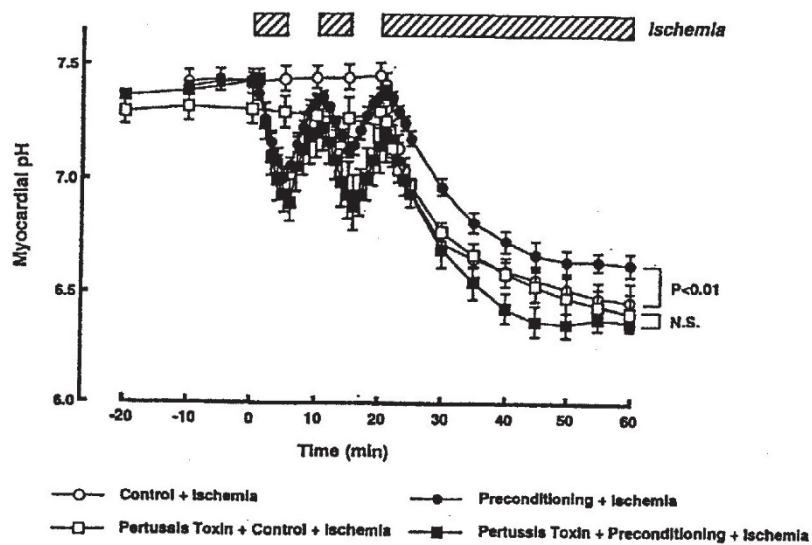
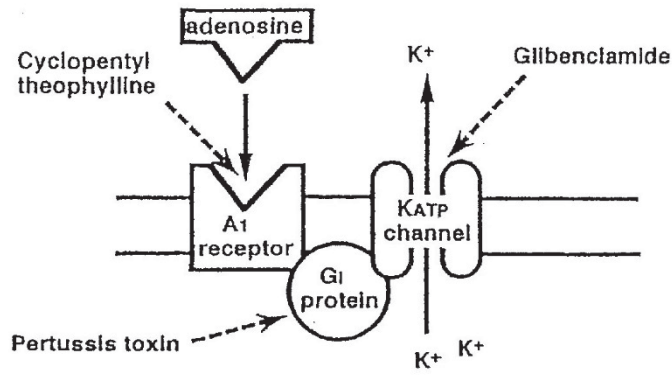


図 4-2



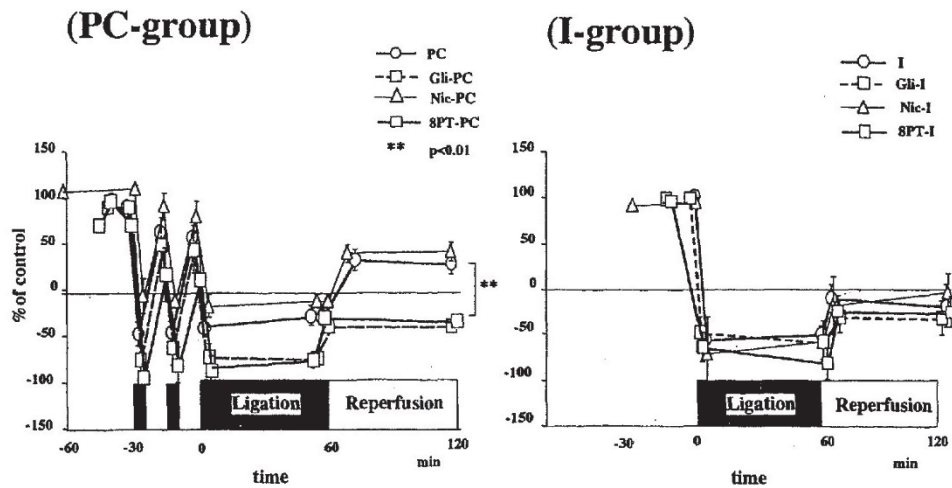
虚血心筋 pH 変化に対するプレコンディショニング効果におよぼす百日咳毒素 (PTX) の作用。40 分間虚血 (○) ; プレコンディショニング (●) ; 3 日前に PTX 0.3 μ g/kg を前投与した動物に 40 分間虚血 (□) ; PTX 前投与した動物でのプレコンディショニング (■) 。

図 5



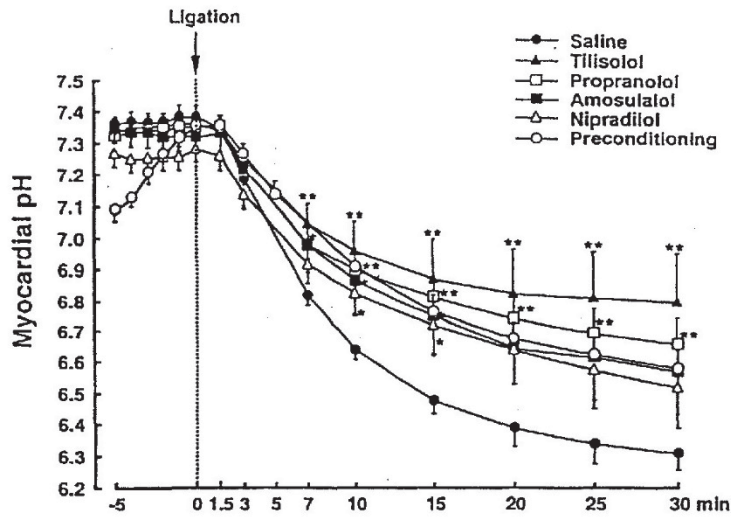
Adenosine A₁-receptor, Gi protein, ATP-sensitive K-channel とそれぞれに対する特異的遮断薬.

図 6



PC: ischemic preconditioning
 8 PT: 8 phenyltheophylline
 Gli: glibenclamide
 Nic: nicorandil

図 7



各種β受容体遮断薬とプレコンディショニングの虚血心筋アシドーシス改善効果。薬物は冠動脈結紮の5分前に静脈内投与し、プレコンディショニングは5分虚血、5分再灌流を2回繰り返した。冠動脈結紮は30分間行い、経時的に心筋組織pHをモニターした。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 、生理的食塩水投与群の対応する値との比較。

図 8

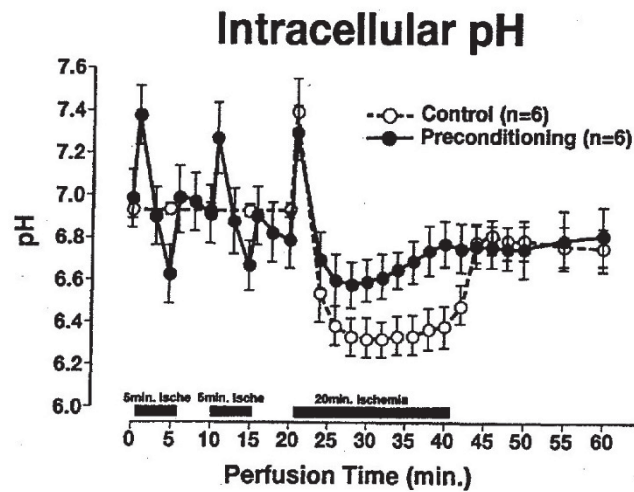
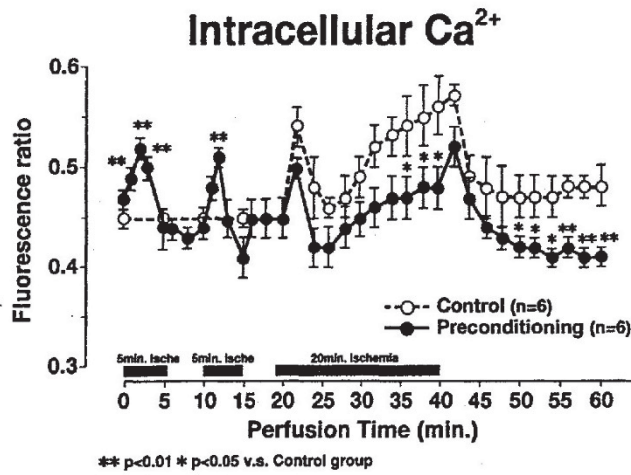
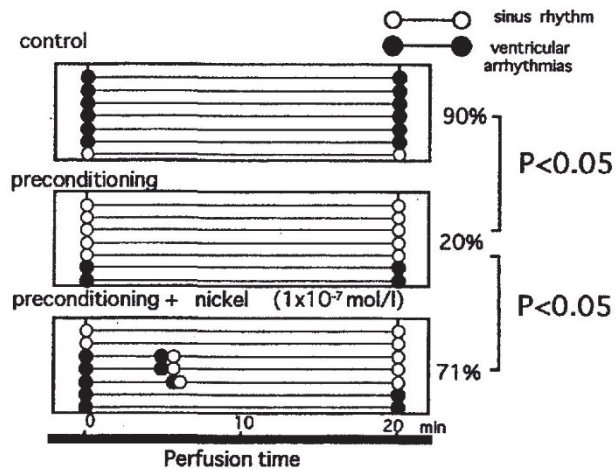


図 9-1

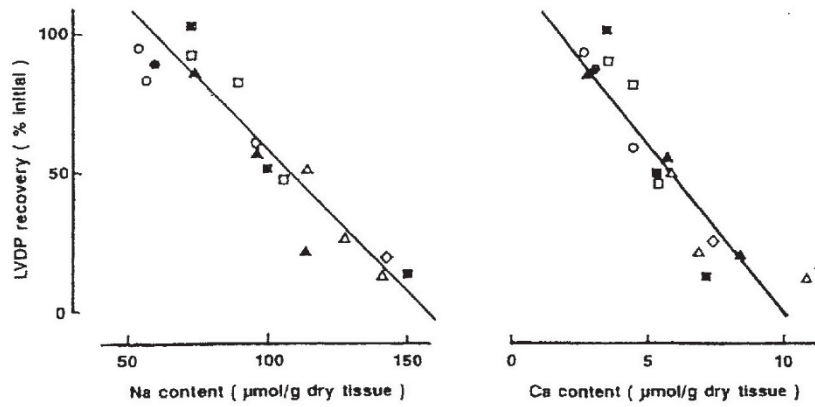


☒ 9-2

Incidence of Ventricular arrhythmias during reperfusion



☒ 10



The relationship between postischemic LVDP recovery and tissue Na and Ca contents of the perfused heart at the end of 60 min of reperfusion. The hearts were pretreated with quinidine (○), disopyramide (●), lidocaine (△), mexiletine (▲), flecainide (□), pilsicainide (■) and procainamide (◇) at different concentrations ranging from 3 to 300 μ M. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 5 to 6 experiments. There was a significant relationship between the LVDP recovery and both the tissue Na content and the tissue Ca content ($r = -0.914$ and $r = -0.930$, respectively; $n = 17$).

⊗ 11