

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20035

研究課題名(和文) 虚血および麻酔プレコンディショニングにおけるmPTP開口抑制のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of mPTP opening in the context of ischemic and/or anesthetic preconditioning

研究代表者

藤井 優佳 (Fujii, Yuka)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20646682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心筋保護作用が知られているSTAT3と、心筋障害に関与していることが知られているCyclophilinD (CypD)の心筋細胞内での関係について検討した。STAT3の種々のリン酸化変異型を作成しCypDとの結合を調べたところ、すべての変異型とCypDは結合を認めた。心筋細胞株虚血再灌流モデルにおいてプロポフォルおよびその溶媒脂肪乳剤添加の虚血または虚血再灌流による心筋細胞死への効果を検討したところプロポフォルおよび脂肪乳剤は細胞死を抑制することがわかった。虚血時にプロポフォルおよび脂肪乳剤がCypDのたんぱく質発現を減少させ心筋障害を減少している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cyclophilin D (CypD) is a known to a constituent of mitochondrial permeability transition pore (mPTP). mPTP opening is a crucial step in ischemia in the heart. We could not show any correlation between phosphorylation of STAT3 and expression of CypD in H9C2 cells as opposed to our hypothesis. I constructed several mutants of STAT3 and conducted pulldown assay but, I could not see any differences in their binding affinity to CypD. I also conducted LDL assay and the result shows propofol and lipid emulsion, which is a solvent of propofol, has inhibitory effect on ischemic cell death of H9C2 cells. Protein expression level of CypD was also decreased in H9C2 cells treated in propofol and lipid emulsion when exposed to hypoxia, but not with hypoxia-reperfusion. These results suggest that propofol and lipid emulsion have a cardio-protective effect by decreasing the expression of CypD with ischemic insult, but not with ischemia-reperfusion injury.

研究分野：Anesthesiology

キーワード：mitochondria mPTP ischemia cardiomyocyte

## 1. 研究開始当初の背景

臓器、組織に虚血がおこったのち、血液の再灌流が起きた際、その臓器・組織内の微小循環において種々の毒性物質の産生が惹起され引きおこされる障害を「虚血再灌流障害」という。そして、短時間の虚血に暴露することにより、その後におこる虚血再灌流障害が軽減される現象を「Ischemic Preconditioning (IPC)」という。虚血まゝに、麻酔薬を投与することにより、このIPCと同様に障害が軽減される現象を「Anesthetic Preconditioning (APC)」と呼ぶ。APC および IPC の制御機構や作用機序を明らかにすることは、心臓手術時の虚血再灌流障害の予防、人工心肺時の心筋障害の予防など手術に係る心筋障害のみならず、心筋梗塞、狭心症そのものにおける心筋障害の発生機序の解明、治療への応用も期待される。「mPTP の開口が虚血再灌流障害の主な原因であり、mPTP を介した Preconditioning の分子機構を明らかにすれば、心筋障害の低減、回避が可能となる」と考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

虚血再灌流が惹起する細胞障害には、ミトコンドリアの二重膜に存在する mitochondria permeability transition pore (mPTP) が深く関与している。mPTP とはチャネルの一種で、普段は閉じているが、細胞内カルシウム過負荷、活性酸素の産生増大、無機リン酸の増加、細胞内アシドーシスの解除、細胞内 ATP の低下などの誘因によって開口し、1.5kDa 以下の分子を非選択的に通す。虚血再灌流時には mPTP が開口することによってミトコンドリアの膨化、膜電位の消失から心筋細胞の膨化、壊死、障害が起こる。

mPTP は様々なたんぱく質の複合体であり、ミトコンドリア外膜 (outer

mitochondrial membrane: OMM) に存在する VDAC (Voltage dependent anion channel)、内膜 (inner mitochondrial membrane: IMM) に存在する ANT (adenine nucleotide translocator)、PiC (phosphate carrier)、CypD (cyclophilin D) などから構成されていると考えられている。ノックアウトマウス解析から、いずれの分子も mPTP の機能に必須ではなく、**いまだ mPTP の中核的な機能分子は明らかとはなっていない**。また、mPTP の機能を制御するシグナル伝達機構は、 $\alpha$ 、 $\beta$  adrenoreceptor や  $\delta$ -1 opioid receptor など G protein coupled receptor の下流で、活性酸素産生や protein kinase C (PKC) や NF- $\kappa$ B の活性化、あるいは growth factor receptor の下流で、PI3K, MEK1/2, HIF1 $\alpha$  などの活性化などが示唆されているが、その全貌は未だ明らかとはなっていない。

mPTP を介した Preconditioning の分子機構の解明を目的とし、虚血再灌流に起因する細胞障害発生の分子メカニズムの実体に迫ることを目指す。

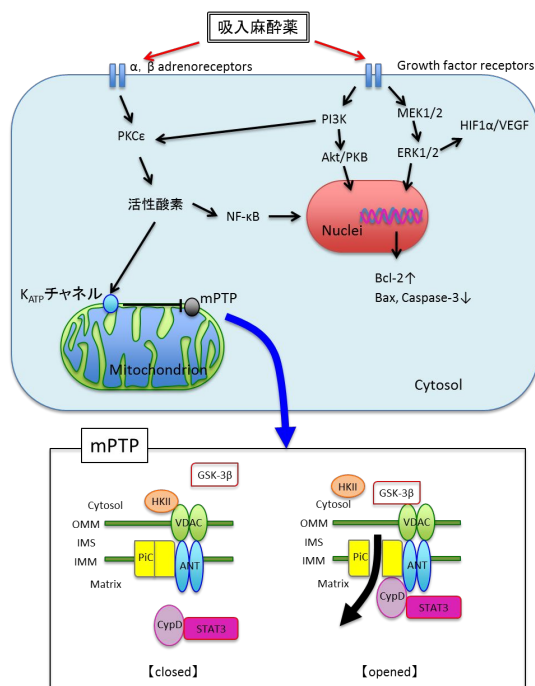
## 3. 研究の方法

麻酔薬や虚血による Preconditioning には mPTP 開口抑制が深く関与していることがわかっている。本研究では以下について研究を遂行する。

- A) 虚血再灌流障害モデルマウスにおける Preconditioning による mPTP の変化を明らかにする。
- B) 細胞レベルで低酸素侵襲に対する APC による mPTP の変化を明らかにする。
- C) mPTP 開口抑制への関与が疑われる因子と、CypD や STAT3 との相関を明らかにする。
- D) 心筋細胞、血管内皮細胞でのそれらの因子の機能解析を行う。

以上の解析から、臓器保護治療への応用を

目的とし、虚血再灌流障害に対する Preconditioning による心筋保護作用の分子基盤を明らかにする。



図：麻酔薬によるプレコンディショニングの分子機構

#### 4. 研究成果

STAT3 のリン酸化に関与していると考えていた PKCε は心筋細胞株においては、その発現と STAT3 のリン酸化には相関は認められなかった。STAT3 の種々のリン酸化変異型を作成しプルダウンアッセイを行い CypD との結合の有無について検討を行ったが、CypD は STAT3 の恒常的リン酸化型または非リン酸化変異型にかかわらず結合が認められた。むしろ、予想に反してセリンの非リン酸化型において CypD との結合が強い傾向が認められた。次に、心筋細胞株虚血再灌流モデルにおいてプロポフォルおよび溶媒コントロールとして脂肪乳剤添加を行い、虚血による細胞死に対する効果を検討した。LDH アッセイによりプロポフォルおよび脂肪乳剤の添加が細胞死を抑制することがわかった。つぎに、細胞内のたんぱく質発現について検討した。プロポフォルを添加した心筋細胞では虚血にともなって CypD のたんぱく質発現が低

下しているのが認められた。脂肪乳剤添加では虚血再灌流にともないプロポフォルよりも CypD たんぱく質発現の低下がより強く認められた。プロポフォルの心筋保護効果は脂肪乳剤によるものである可能性が高いと考えられた。また、虚血プレコンディショニングを行ったものにおいては CypD のたんぱく質発現にコントロールと比べ大きな差は認められなかった。

今回は mPTP 構成要素である CypD と STAT3 という分子を中心に、麻酔薬とくにプロポフォルに注目して麻酔プレコンディショニングと虚血プレコンディショニングを比較し機序について解析を行った。これら二つの機序がまったく異なる可能性が示唆された。

プロポフォルによるプレコンディショニングはおもに脂肪乳剤によるものである可能性が高いと考えられた。さらに、STAT3 たんぱく質が虚血心筋ミトコンドリア内の DNA 転写制御において重要な役割を果たしている可能性を検討する予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 優佳 (FUJII, YUKA)  
金沢大学・医学系・協力研究員  
研究者番号：20646682

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )