

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	相 沢 圭
学 位 論 文 題 目			
Protein Kinase C- $\epsilon$ Primes the Cardiac Sarcolemmal Adenosine Triphosphate-sensitive Potassium channel to Modulation by Isoflurane (プロテインキナーゼC- $\epsilon$ のイソフルレンに対する心筋細胞膜ATP感受性カリウムチャネル活性修飾作用)			
共 著 者 名			
Turner LA, Weihrauch D, Bosnjak ZJ, Kwok WM			
Anesthesiology 2004; 101: 381-9			
研究目的			
<p>吸入麻酔薬は心筋細胞に作用し、虚血耐性を獲得(プレコンディショニング)させる。<sup>1)</sup> その機序としてATP感受性カリウム (KATP) チャネルが注目されてきたが、詳細は今だ不明である。KATPチャネルは存在部位から2種類に大別されており、それぞれ、細胞膜に存在するタイプ(sarcKATPチャネル)、とミトコンドリア内膜に存在するタイプ(mitoKATPチャネル)である。近年、mitoKATPチャネルがプレコンディショニング作用の開始点であると報告され、その下流の反応として種々の細胞内伝達経路の活性化が起こり、結果としてsarcKATPチャネルが活性化される<sup>2)</sup>と考えられている。本研究では、sarcKATPチャネル活性化にいたる経路として、プロテインキナーゼC (PKC) のアイソザイムの関与に注目した。12種あるPKCアイソザイムのうち、PKC-<math>\epsilon</math>がsarcKATPチャネル活性化により関与しているとされている。<sup>3)</sup> 一方でPKC-<math>\delta</math>に関しては、報告により意見が分かれていることから、本研究では、PKC-<math>\epsilon</math>と<math>\delta</math>の特異的アクチベーターを用い、それらの活性化が吸入麻酔薬イソフルラン(Iso)刺激によるKATPチャネル活性に影響を与えるかを調べた。</p>			
材料・方法			
<p>心筋細胞を、モルモット(体重150~300g)からランゲンドルフ回路を用いて型どおりに分離し、室温(22°C)保存した。PKC-<math>\epsilon</math>、<math>\delta</math>の活性を図るために、細胞膜透過性PKC-<math>\epsilon</math>、<math>\delta</math>アクチベーターペプチドを使用した。Isoの濃度は、モルモットの1.5 minimum alveolar concentration (MAC) に相当する<math>0.88 \pm 0.05</math> mMとした。</p>			

sarcKATPチャンネルを介した電流(IKATP)は、パッチクランプ全細胞記録法、電圧固定法を用いて測定した。IKATPは固定電圧-40mVから0mV(100ms)へのステップパルスにより誘発した。ピペット内のATP濃度は0.5mMとし、細胞内ATP希釈時間を25分間とした。記録された全細胞IKATPは、細胞の表面積で除して標準化した (pA/pF)。いずれの電流も記録されなかった場合、sarcKATPチャンネルの活性があることを確認する目的に、Pinacidil 20 $\mu$ Mを使用した。また、電流が測定された場合は、それがIKATPであることを確認する目的に、Glibenclamide 500nMを使用した。

モルモットへのIso暴露により実際にPKC- $\epsilon$ 、 $\delta$ のトランスロケーションがおこることを確認する目的に、免疫染色法を用いた。

データは平均 $\pm$ 標準偏差で表示され、Kruskal-Wallis testにより群間の有為差を評価した。

#### 成績

- PKC- $\epsilon$  の作用

過去の報告にもあるとおり、細胞内ATP濃度を0.5mMとした細胞において、IsoはIKATPを誘発しなかった。一方、PKC- $\epsilon$ アゴニスト (PP106) で前処置を行った細胞の場合、同濃度のIsoはIKATPを誘発した ( $40.4 \pm 18.2$  pA/pF, n = 7)。

IsoによるIKATP誘発が、PKC- $\epsilon$ のトランスロケーションによるものであることを確認するために、PKC- $\epsilon$ のトランスロケーション阻害ペプチド (PP93) をPP106投与に先立って使用したところ、IsoによるIKATP誘発は見られなかった (n = 7)。また、PP106のスクランブルペプチド (PP105)で前処置した場合も同様であった (n = 7)。

- PKC- $\delta$  の作用

KATPチャンネル感受性変化関与について意見が二分しているPKC- $\delta$ についても検討した。PKC- $\delta$ アクチベーター (PP114) で前処置を行った8検体のうち、Iso投与により6検体のIKATPは反応しなかったが、2検体ではチャンネル電流の誘発が見られた ( $12.5 \pm 22.1$  pA/pF)。前処置のPP114濃度を2倍にして同様の実験を行ったところ、7検体のうち、4検体でIsoによるIKATP誘発が見られた ( $5.7 \pm 4.1$  pA/pF)。いずれの濃度においても、記録されたIKATP密度はPP106を用いた場合と比べ、有為に小さいものであった。

また、この場合においても、IsoによるIKATP誘発が、PKC- $\delta$ のトランスロケーションによるものであることを確認するために、PKC- $\delta$ のトランスロケーション阻害ペプチド (PP101) を先立って投与したところ、IsoによるIKATP誘発は見られなかった (n = 7)。

- mitoKATP チャンネル阻害による影響

プレコンディショニング効果獲得過程の初期変化として、mitoKATPチャンネルの活性

化が注目されているが、mitoKATPチャンネルもまた、PKCにより影響を受けることが知られている。そこで、本研究で見られたPKC- $\epsilon$ によるsarcKATPチャンネルのIso感受性変化に、mitoKATPチャンネルが関与しているかを調べた。mitoKATPチャンネル特異的阻害薬である5-hydroxydecanoate (5-HD)の存在下で、PP106による前処置を行った細胞にIsoを投与したところ、7検体全てでIKATP誘発が見られた ( $4.8 \pm 2.9$  pA/pF)が、5-HD非投与時と比較し、有為に小さいものであった。

- PKC- $\epsilon$  と PKC- $\delta$  のトランスロケーション

実際にPKC- $\epsilon$ とPKC- $\delta$ が心筋細胞内組織にトランスロケーションしているかを確認するために、コントロール群とIso (1MAC) 暴露群のモルモット心臓に対し、免疫組織化学的検査を行った。Iso暴露群では、モルモットに1.2% (1MAC) のIsoを30分間吸入させた後、30分間空気吸入させてIsoを洗い流したのちに、すみやかに心臓を摘出した。その結果、コントロール群ではPKCの明確なトランスロケーションは見られなかったが、Iso暴露群では、PKC- $\epsilon$ が細胞膜に、PKC- $\delta$ が細胞内組織にトランスロケーションすることが確認された。

#### 考案

本研究では、PKC- $\epsilon$ がPKC- $\delta$ に比し、よりsarcKATPチャンネルのIsoに対する感受性を増加させることが確認された。これまでの研究で、12種あるPKCアイソザイムのうち、 $\delta$ と $\epsilon$ がプレコンディショニング作用発現機所において重要な役割を占めることが示されている。過去の報告でプレコンディショニング関連アイソザイムが様々に報告されている理由として、プレコンディショニング誘発方法の違い(虚血モデル、誘発薬剤の違い)や、実験対象の違い(ラット、マウス、ヒト)、が挙げられるであろう。本研究では、ヒト心筋細胞と似た電気生理学的性質を持つモルモットの心筋を用い、かつ臨床使用濃度の吸入麻酔薬を用いた。本研究の結果は、臨床で使用される吸入麻酔薬による心筋プレコンディショニング作用の下流経路として、PKC- $\epsilon$ が重要な役割を担うことを示唆していると考えられる。

#### 結論

PKCアイソザイムのうち $\epsilon$ は、sarcKATPチャンネルのイソフルレン感受性を変化させる作用を持つことが示された。PKC- $\delta$ も同様の作用を持つが、PKC- $\epsilon$ に比し、その作用は小さいものである。

#### 引 用 文 献

- 1 Wartier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT: Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. ANESTHESIOLOGY 1988; 69: 552-65
- 2 Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion Injury in mice. J Clin Invest. 2002 Feb;109(4):509-16
- 3 Additive protection of the ischemic heart ex vivo by combined treatment with delta-protein kinase C inhibitor and epsilon-protein kinase C activator. Circulation 2003 Aug 19; 108(7):869-75.

#### 参 考 论 文

- 1 Biphasic effects of isoflurane on the cardiac action potential: an ionic basis for anesthetic-induced changes in cardiac electrophysiology.  
Suzuki A, Gassmayr S, Bosnjak ZJ, Kwok WM. と共著  
Anesthesiology. 2002 Nov;97(5):1209-17.
- 2 Stress-Free Tracheal Tube Exchange Using Pentax-AWS (Airway Scope).  
Suzuki A, Kunisawa T, Sasakawa T, Takahata O, Iwasaki H と共著  
J Cardiothorac Vasc Anesth. 2008 Dec.5 掲載予定.

## 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	相 沢 圭
<p>審査委員長 <u>長谷部 直 幸</u></p> <p>審査委員 <u>高 井 章</u></p> <p>審査委員 <u>岩 崎 寛</u></p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Protein Kinase C-<math>\epsilon</math> Primes the Cardiac Sarcolemmal Adenosine Triphosphate-sensitive Potassium Channel to Modulation by Isoflurane</b></p> <p>(プロテインキナーゼC-<math>\epsilon</math>のイソフルレンに対する心筋細胞膜 ATP 感受性カリウムチャネル活性修飾作用)</p>			
<p>虚血心筋保護の強力な内因性機序である <b>ischemic preconditioning</b> 効果がある種の吸入麻酔薬が誘導することが知られているが、その機序の詳細は不明である。短時間虚血負荷による古典的な <b>preconditioning</b> 効果と同様に、心筋細胞内 <b>PKC</b> の活性化を介する <b>ATP 感受性カリウムチャネル (KATP チャンネル)</b> の開口が重要な役割を果たすものと想定されているが、いまだ未解明の点が多く残されている。</p> <p>論文提出者らは、ヒト心筋細胞に類似した電氣的性質を有するモルモット単離心筋細胞を用いて、<b>KATP</b> チャンネルの活性化を指標として、虚血 <b>preconditioning</b> 効果におよぼすイソフルレンの作用機序を検討した。すなわち、パッチクランプ法により細胞膜 <b>KATP</b> チャンネルを介する電流 (<b>IKATP</b>) 測定を行い、<b>PKC</b> の二つのアイソザイム (<math>\epsilon</math> および <math>\delta</math>) の活性修飾下に、イソフルレンの効果を検討した。</p> <p>イソフルレン単独では <b>IKATP</b> を誘発しないが、<b>PKC-<math>\epsilon</math></b> の刺激下で</p>			

は明らかな誘発作用を示し、その作用は PKC- $\epsilon$  のトランスロケーション阻害ペプチドの投与により抑制された。一方同じ PKC でも PKC- $\delta$  の刺激ないし阻害操作では、イソフルレンによる IKATP の誘発効果は軽微に修飾されるのみであった。

また、虚血 preconditioning 機序のもうひとつの key player であるミトコンドリア KATP チャンネルの阻害下では、PKC- $\epsilon$  の刺激時に見られたイソフルレンによる IKATP の誘発効果は有意に減弱することが示された。

免疫組織染色を用いて、モルモット心筋細胞の PKC の局在変化を検討したところ、イソフルレン吸入暴露により、PKC- $\epsilon$  は細胞膜にトランスロケーションし、PKC- $\delta$  は細胞内組織に集積することが確認された。

以上より、吸入麻酔薬イソフルレンの虚血 preconditioning 効果の獲得機序として、PKC アイソザイムの中でも特に PKC- $\epsilon$  を介する細胞膜 KATP チャンネルの活性化が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、今後臨床的に虚血心筋保護を図る上で貴重な知見を提供する研究と考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的な回答が得られ、提出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した。