



| | |
|--------------|---|
| Title | Myonephropathic Metabolic Syndrome (MNMS)発症におけるCa ²⁺ 依存性中性プロテアーゼ(Calpain)の関与 |
| Author(s) | 辻, 嘉文; 上林, 純一; 岩本, 典子 他 |
| Citation | 日本血管外科学会雑誌. 1992, 1(1), p. 49-54 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/3065 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Myonephrothic Metabolic Syndrome (MNMS) 発症における Ca²⁺ 依存性中性プロテアーゼ (Calpain) の関与

辻 嘉文 上林 純一 岩本 典子 渋谷 卓
左近 賢人 芝 英一 川崎 富夫 森 武貞

要 旨: 急性動脈閉塞血行再灌流に伴う重篤な合併症として myonephrothic metabolic syndrome (MNMS) が知られているがその原因や治療法については未だ十分解明されていない。われわれは、Ca²⁺ 依存性中性プロテアーゼ (カルパイン) が MNMS の発症に関与している可能性を考え検討を行った。家兎大動脈を下腸間膜動脈 (IMA) 直下で 300 分間遮断の後、再灌流し 180 分間にわたり血圧、血漿中 NAG (p-NAG) およびミオグロビン尿の有無を経時的に観察し、カルパインの特異的阻害剤であるカルペプチンの影響を検討した。MNMS 群では再灌流後ミオグロビン尿を認め、p-NAG は再灌流とともに急激に上昇した。虚血直前にカルペプチンを投与した群ではミオグロビン尿は認められず、また p-NAG の上昇も軽度で有意な改善が認められたことより (p<0.05)、MNMS におけるカルパインの関与が示唆された。(日血外会誌 1: 49-54, 1992)

索引用語: MNMS, N-acetyl-β-D-glucosaminidase, ミオグロビン尿, カルパイン, カルペプチン

目 的

急性動脈閉塞症における血行再灌流に伴う重篤な合併症として myonephrothic metabolic syndrome (MNMS) が知られているがその原因や治療法については未だ十分解明されていない¹⁾。一方、ischemia reperfusion injury (IRI) の原因として虚血器官において細胞レベルでは、細胞内遊離カルシウム ([Ca²⁺]_i) の上昇が報告されており^{2,3)}、Ca²⁺ によって活性化される Ca²⁺ 依存性中性プロテアーゼであるカルパイン⁴⁾ の活性化が IRI しいては MNMS に関与している可能性を考えた。そこでわれわれは家兎を用いた MNMS モデルを作製し、以下の検討を行った。

方 法 (図 1, 2)

雄性日本白色家兎 (2.2~2.7kg) をペントバルビタール麻酔下に腹部正中切開の後、腹部大動脈を露出し血圧測定・カルペプチン投与用として下腸間膜動脈 (IMA) に、採尿用として下大動脈 (IVC) に、採尿用として膀胱内にそれぞれカテーテルを留置した。図 1 のごとく側副血行路を遮断し、ヘパリン 50u/kg i. v. した後、SUGITA clip (fording force 65g) にて IMA 直下大動脈を遮断し虚血を開始した。虚血時間を 300 分間とし再灌流の後 180 分間、図 2 に示すようなスケジュールで、

IRI 群: ischemia reperfusion injury

IRI+Calpeptin 群: aorta clamp 直前にカルペプチン 12mg/kg を IMA より bolus i. a. 施行の 2 群について検討した。

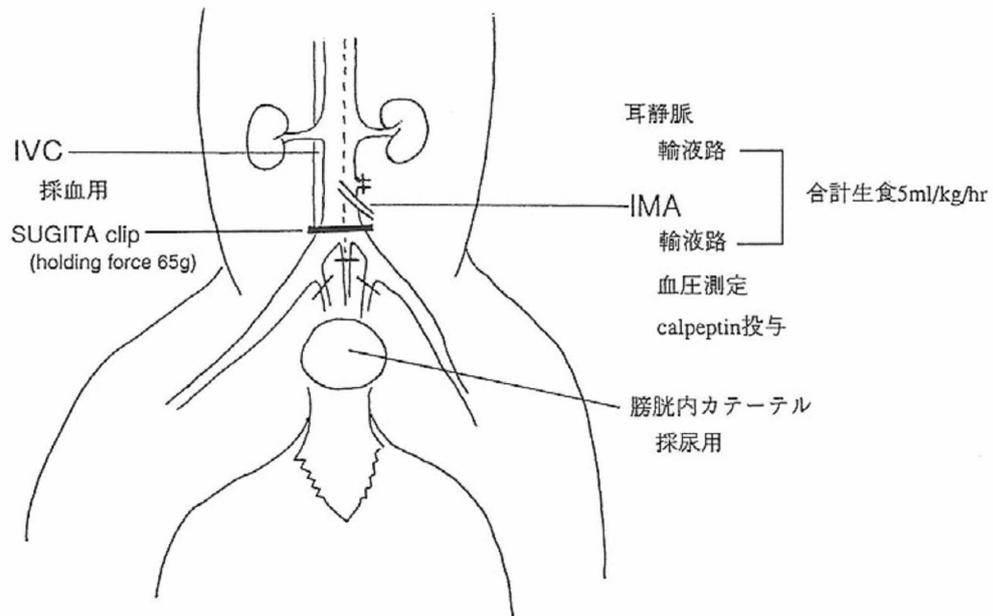
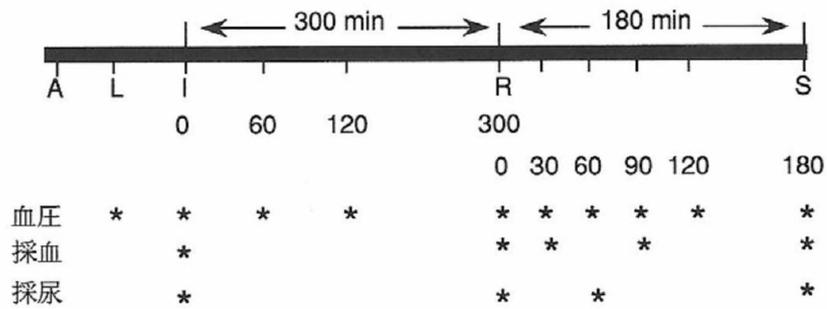


図1 家兔 MNMS モデル
IVC : 下大静脈, IMA : 下腸間膜動脈



IRI (ischemia reperfusion injury) 群: n=10

IRI + calpeptin 群: n=3

(bolus intra-IMA administration of calpeptin[12mg/kg] prior to aortic clamping)

A : anesthesia with i.v. pentobarbiturate

L : laparotomy

I : ischemia-clamping of abdominal aorta

R : reperfusion

S : sacrifice

測定項目

WBC,Plt,RBC,Ht,Hb: 自動血球計

plasma-NAG(N-acetyl-β-D-glucosaminidase): 比色法

myoglobinuria: 硫酸塩析法

図2 Experimental procedure

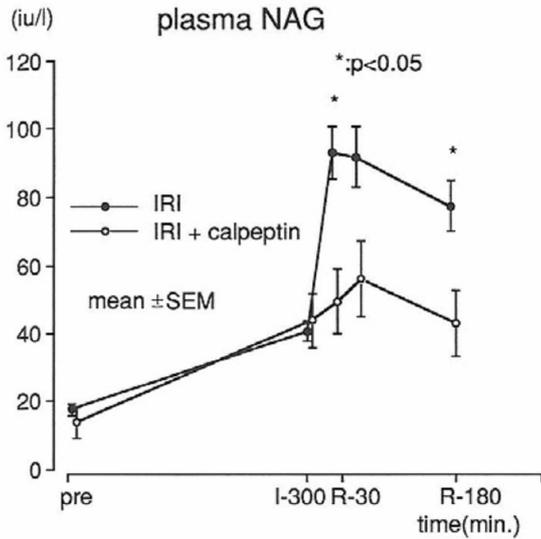


図3 血漿中-NAGの変化

pre: 虚血前, I-300: 虚血 300 分後,
R-30: 再灌流 30 分後, R-180: 再灌流 180 分後.

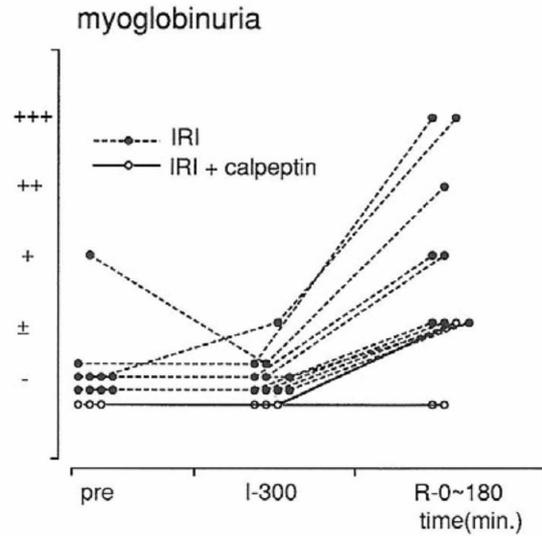


図4 ミオグロビン尿の変化

pre: 虚血前, I-300: 虚血 300 分後,
R-0~180: 再灌流 0~180 分間.

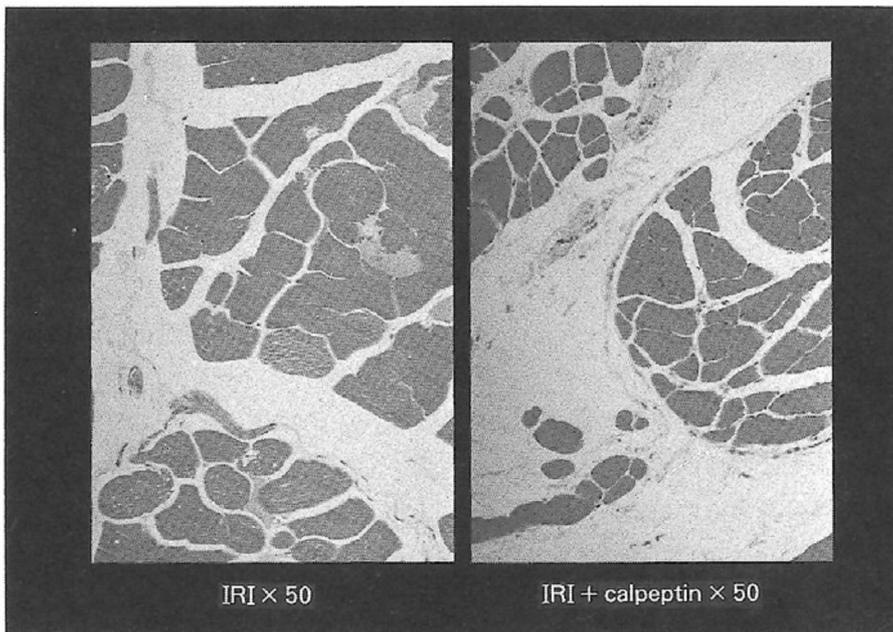


図5 再灌流 180 分後の後肢骨格筋 HE 染色光顕像 (x50)

RBC・WBC・Plt・Ht・Hb は自動血球計, 血漿中-NAG (N-acetyl-β-D-glucosaminidase) は比色法, ミオグロビン尿は硫酸塩析法にて測定した.

結 果

1. 血 圧

IRI 群では再灌流とともに急激に低下し以後 180 分後まで徐々に低下したが ($p < 0.01$), カルペプチン投与群では血圧の低下は軽度であった.

2. 血小板数

IRI 群・カルペプチン投与群ともに, 再灌流後減少し 180 分後には有意な減少を示した ($p < 0.05$).

3. 血漿中 NAG (図3)

IRI 群では虚血のみで軽度上昇し, 再灌流とともに急激に上昇する傾向を認めたが, カルペプチン投与群では虚血時の上昇は IRI 群と同様であるが再灌流後の上昇は極軽度で IRI 群との間に有意な改善を認めた ($p < 0.05$).

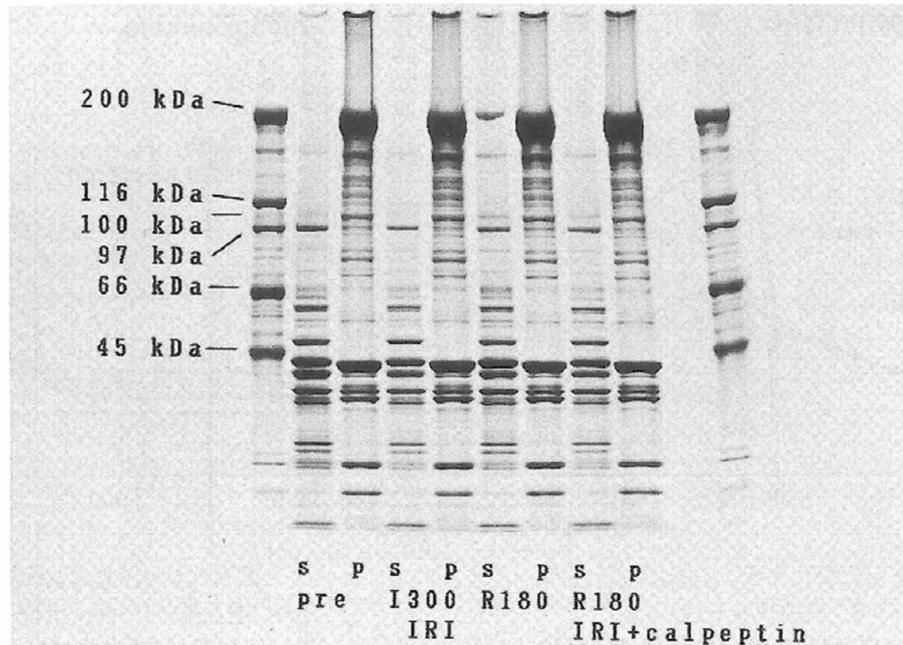


図6 後肢骨格筋の蛋白電気泳動像

sは上清, pは沈殿。両端はマーカ。pre:前, I-300:虚血300分後, R-180:再灌流180分後, IRI+calpeptin:カルペプチン投与群である。

4. ミオグロビン尿 (図4)

IRI群では再灌流後全例が偽陽性～強陽性となったがカルペプチン投与群では1例が偽陽性を示したのみで2例は陰性でありカルペプチン投与によりミオグロビン尿は明らかに抑制された。

5. 組織学的所見 (図5)

IRI群では、筋原線維の断裂・線維間浮腫が認められたが、カルペプチン投与群では筋原線維の断裂はほとんどなく、線維間浮腫が軽度認められたのみで組織学的な改善が認められた。

6. 蛋白電気泳動: SDS-PAGE (図6)

経時的に採取した筋肉をBuffer中でホモジナイズした後10,000×g20分間遠心し、上清(s)・沈殿(p)に分離しSDS蛋白電気泳動を施行したところ、100kDaのバンドは前・虚血300分後のsではみられないが、再灌流180分後ではみられ、カルペプチン投与群では、IRI群に比べ明らかな抑制が認められた。

考 案

急性動脈閉塞血行再灌流に伴う重篤な合併症としてMNMSが知られているがその原因や治療法については未だ十分解明されていない。一方 reperfusion-injuryの原因として虚血器官における細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇

が報告されており^{2,3)}、その機序として、 Na^+-Ca^{2+} 交換系や細胞膜障害による細胞内への Ca^{2+} の流入が考えられている²⁾。

カルパインは、1) あらゆる動物細胞に存在し、 Ca^{2+} 濃度によって活性が制御される至適pHが7.0の中性プロテアーゼである。2) Ca^{2+} 感受性によってカルパインI(μ -CANP)とカルパインII(m-CANP)の2種類のアイソザイムが存在する。3) カルパインの基質として筋蛋白・酵素蛋白・細胞骨格蛋白・血液凝固因子などが同定されているが^{4,5)}、その生理的な意義や疾病との関連は未だ明らかでない。4) 細胞内では不活性型の前駆体として存在し Ca^{2+} の存在下で、自己消化(autolysis)がおこり活性型カルパインとなりプロテアーゼの作用を発揮する。またカルペプチン[BOC-LEU-nLEU-H]は、私達が開発した細胞膜透過性のカルパインに特異的な阻害剤である⁶⁾。

SDS-PAGE上の100kDaはまだ検討できていないが、in vitroの系ではカルパインが骨格筋Z帯の構成蛋白である α -アクチニンを消失させることがすでに知られており^{7,8)}、その可能性も示唆された。

NAGは分子量13~14万のライソゾーム水解酵素の1つでムコ多糖体や糖蛋白などの分解に関与することが知られており、動物組織に広く分布する。阻血な

どによる組織障害がおこるとこのライソゾーム膜が破壊され血中に放出されることにより、組織障害の程度を反映すると考えられ今回私達は虚血後肢骨格筋障害の指標として測定した。

結 語

1. 家兔後肢骨格筋を用いて MNMS モデルを確立した。

2. Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ (カルパイン) の特異的阻害剤であるカルペプチン投与により骨格筋障害の指標とした血漿中 NAG の減少・ミオグロビン尿の抑制・組織学的所見の改善・さらに SDS-PAGE により筋蛋白融解の抑制が確認されたことより MNMS におけるカルパインの関与、すなわち $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が骨格筋に存在するカルパインを活性化することにより、筋崩壊・rhabdomyolysis・ミオグロビン循環しいては MNMS が発症し、カルパインによる筋崩壊を抑制することによる MNMS 発症予防の可能性が示唆された。

文 献

1) Haimovici, H.: Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria. *Surgery*, **47**: 739-747, 1960.

- 2) 目野 宏, 金出英夫: カルシウム過剰負荷と心筋細胞障害. *蛋白質核酸酵素*, **35**: 1845-1853, 1990.
- 3) Smith, A., Hayes, G., Frcsc, A. R. et al.: The role of extracellular calcium in ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J. Surg. Res.*, **49**: 153-156, 1990.
- 4) Kambayashi, J. and Sakon, M.: Calcium dependent proteases and their inhibitors in human-platelets. *Methods in Enzymology*, **169**: 442-455, 1989.
- 5) 上林純一, 左近賢人, 芝 英一他: 血小板カルパインとカルパスタチン. *日本血栓止血学会誌*, **1**: 183-202, 1990.
- 6) Tsujinaka, T., Kajiwara, Y., Kambayashi, J. et al.: Synthesis of a new cell penetrating calpain inhibitor (calpeptin). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**: 1201-1208, 1988.
- 7) Bullard, B., Sainsbury, G. and Miller, N.: Digestion of proteins associated with the Z-disc by calpain. *J. Muscle Res. Cell Motility*, **11**: 271-279, 1990.
- 8) Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I. et al.: Studies of the α -Actinin/Actin interaction in Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.*, **266**: 8501-8510, 1991.

Abstract

**Involvement of Calpain in the Occurrence of
Myoneuropathic Metabolic Syndrome**

Yoshifumi Tsuji, Jun-ichi Kambayashi, Noriko Iwamoto, Takashi Shibuya,
Masato Sakon, Eiichi Shiba, Tomio Kawasaki and Takesada Mori

Department of Surgery II, Osaka University Medical School

Key words : MNMS, NAG, Myoglobinuria, Calpain, Calpeptin

Myoneuropathic metabolic syndrome (MNMS) is one of most serious ischemia reperfusion injury with characteristic acute renal failure and carries a very high mortality rate. The exact pathogenesis of MNMS has not been fully elucidated yet, nor the effective treatment. Acute renal failure is thought to be caused by certain mediator released by the result of ischemia induced rhabdomyolysis such as myoglobin. We have postulated that this lysis is caused by calpain activated by ischemia-induced rise in the cytosolic calcium concentration and this possible involvement was studied in MNMS animal model employing a cell permeable calpain antagonist calpeptin. Male rabbits were subjected to bilateral hind leg ischemia for 5 hours by clamping the distal aorta after separating all the distal collateral branches, followed by reperfusion by declamping for 3 hours. Blood pressure, plasma N-acetyl- β -D-glycosaminidase (NAG) and the presence of myoglobinuria were serially determined. Blood pressure remained constant during the ischemic period but it dropped about 25% immediately after reperfusion, which was not significantly altered by administration of calpeptin. As shown below, NAG gradually increased during ischemia and shortly after reperfusion the value increased two-fold. Administration of calpeptin (12mg/kg) via inferior mesenteric artery significantly ($p < 0.05$) prevented the reperfusion associated rise of NAG. Myoglobinuria, detected by salting-out method, appeared immediately after reperfusion, which was also prevented by the administration of calpeptin. These observations suggest that activation of calpain in skeletal muscle is important etiologic factor of MNMS and that the occurrence of MNMS may be prevented by administration of calpain antagonist. (Jpn. J. Vasc. Surg., 1: 49-54, 1992)