

Title	Role of Phasic Dynamism of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Ischemic Preconditioning of the Canine Heart
Author(s)	真田, 昌爾
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43766
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	真田昌爾
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16809号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Role of Phasic Dynamism of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Ischemic Preconditioning of the Canine Heart. (イヌ心での虚血プレコンディショニングにおける p38MAP キナーゼ相性活性化の意義)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 松田 暉 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

虚血プレコンディショニング (IP) とは、短時間虚血が先行すると合計虚血時間の延長にも拘らず、逆に引き続く長時間虚血・再灌流に伴う心筋壊死が遅延または縮小する現象である。1986年に *in vivo* 急性心筋梗塞モデルで実験的に初めて証明され、IP の概念が確立された。IP は心筋壊死 (ネクロシス) 以外にも、アポトーシスや可逆性虚血障害 (心筋スタニング)、リモデリングや心筋収縮機能障害も改善する事等が報告され、IP は強力な総合的心筋障害縮小現象として、そのメカニズムが種々研究されている。一方細胞内情報伝達物質の一種 P38MAPK (P38) は、虚血等各種ストレス刺激で活性化され、虚血/再灌流障害の病態生理上重要な役割を担う。従来 P38 は虚血・細胞死の過程でアポトーシスを惹起し細胞障害性に働くと考えられるが、IP を惹起する短時間虚血もまた P38 を活性化する。然るにこの P38 活性化と IP による心筋保護効果の連関、さらに P38 活性化を巡る心筋保護メカニズムは明らかでなかった。

そこで我々は、麻酔開胸犬による冠動脈虚血・再灌流モデルを用い、1) IP の心筋保護作用を確認し、2) IP による P38 活性化の時間的動態変化及びその両者の連関、さらに 3) P38 の下流で保護的に作用するとされる HSP27 の動態を検討した。

【方法】

1) *In Vivo* 心筋梗塞モデルにおける心筋梗塞サイズの検討

ペントバルビタール麻酔下に雌ビーグル成犬を開胸、ヘパリン投与下に頸動脈から冠動脈左前下行枝 (LAD) にバイパスを作製し、その先端から虚血前 (及び IP 中) 5 分間×5 回間欠投与・虚血中投与・再灌流後60分間投与を組合わせた様々なタイミングで LAD に P38 阻害剤 SB203580 約 1 μ M を注入した。さらにバイパス5分閉塞・5分再疎通×4回 (IP) 施行・非施行群で、90分閉塞+360分再灌流後に心臓を摘出、梗塞サイズを TTC+Evans Blue の2重染色で検討した。また虚血中の側副血流量をマイクロスフェア法にて求めた。

2) 同 *In Vivo* モデルにおける、*In Vitro* P38MAPK/HSP27 アッセイ

同モデルにて、IP 中・IP 後・長時間虚血開始15分後の心筋組織サンプルにて P38 活性化を *In Vitro* 酵素アッセイにて (IP 後においてはさらに HSP27 リン酸化を特異抗体によるウェスタンブロットにて、細胞内転移を P1 (筋原

線維・核)・P2(膜)・S(細胞質)3分画のウェスタンブロットにて)検討した。さらに、虚血前及び虚血中のSB203580投与による虚血開始後のP38活性変化も、P38の内因性基質であるMAPKAPK-2活性測定により検討した。

【結果】

1) In Vivoにて、梗塞サイズ(リスク領域比)は、IP施行群(9%)で対照群(36%)より著明に縮小した。かかる効果は虚血中SB203580投与(10%)では影響されなかったが、IP中のSB203580投与(38%)では完全に消去された。一方溶媒単独投与では対照と不変であった。SB203580単独では、虚血中投与群(27%)のみ、対照より有意に梗塞サイズを縮小したが、他は不変であった。側副血流量で正規化した梗塞サイズも全く同じ傾向を示した。

2) P38活性はIP中に著明に上昇(9倍)したが、虚血開始時(IP終了時)には対照レベルに復し、虚血中には逆に対照より有意に抑制されていた。このプロトコルにて、虚血中(開始20分後)のMAPKAPK-2活性がSB203580で抑制されていた為、確かに本研究でのSB203580用法で当モデルのP38活性が抑えられている事が裏付けられた。

3) HSP27は、対照群では細胞質分画に多量に存在するが、IPにて筋原線維及び核分画優位に変化した。また同時にIPによりHSP27のリン酸化も亢進した。それらの変化はSB203580投与により全て消去された。SB203580単独投与では変化はなかった。これら全ての変化に於いて、HSP27総蛋白量は不変であった。

【総括及び考察】

本研究にて、IPによる梗塞サイズ縮小効果は、1)長時間虚血直前のP38活性化と、2)虚血中のP38活性化抑制という、同一物質で時間的に異なる2つの事象により媒介される事が示唆された。次の問題は、1)いずれがより重要か、2)P38の2相性動態が如何に惹起されるか、さらに3)IPの作用におけるP38の上流・下流の物質は何か、である。1)は、前者を遮断するとIPの効果が完全に消去される一方、SB203580投与で後者を惹起しても同一モデルで心筋保護効果再現は部分的なことから、前者がより優勢と考えられる。In Vitroにて、P38活性化剤Anisomycinを虚血前に一時的に作用させると虚血細胞障害が軽減し、虚血中は逆にSB203580投与で細胞保護効果が惹起されるという報告があり、本研究の結果と共にP38の虚血前活性化の重要性を示唆している。2)は、全く未解明だが、P38活性化により遅延して活性化されるP38抑制蛋白の存在が現在示唆されている。さらに3)は、他にもいくつか報告があるが、今回アクチン線維安定化作用、カスパーゼ3型活性化抑制作用等が報告されているHSP27がその有力な候補として示唆された。

臨床応用に向けての課題は、P38を一過性且つ安全・有効に心臓で活性化させる手段、及びHSP27の安全な外的導入または内的誘導手段の開発である。また、HSP27の遺伝子導入療法や、現在心筋保護作用が臨床的に応用されつつあるアデノシン・ATP感受性カリウムチャネル開口剤等との併用も、さらにその心筋保護作用を増幅できる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

当該論文は、現在の虚血心筋保護において最も確実な、しかし逆説的な保護作用を持つ生体防御機構である虚血プレコンディショニング現象による心筋梗塞サイズ縮小効果に関する、学位申請者を中心とする研究成果である。その中で、虚血プレコンディショニング現象が、P38MAPキナーゼ活性について時相的に相反する2つの事象を惹起することを初めて見出し、各々の事象の心筋保護における位置付けを提示したこと、また、新たな臨床治療手段の方向性を見出した業績は高く評価される。よって、これをもって博士(医学)の学位授与に値する。