

Remote ischemic preconditioning reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through unacylated ghrelin induced-activation of the JAK/STAT pathway

Basic Res Cardiol. 2020; 115(4): 50. doi: 10.1007/s00395-020-0809-z

Sawashita Y, Hirata N, Yoshikawa Y, Terada H, Tokinaga Y, Yamakage M

要旨 遠隔虚血プレコンディショニングの心臓虚血再灌流傷害に対する心保護戦略とされているが、その機序には液性保護因子や神経系の関与が指摘されているが全容解明に至っていない。本研究では遠隔虚血プレコンディショニングの液性保護因子の1つとして、非アシル化グレリンの分泌がJAK/STAT経路の活性化に関与し心臓虚血再灌流傷害の減弱に寄与している可能性がある。

1. 背景

心臓再灌流傷害 (Ischemia Reperfusion Injury ; IRI) に対する心保護戦略は、虚血性心疾患 (Ischemia Heart Disease ; IHD) 罹患者の長期生存率の改善や周術期の予後改善に影響を与える¹⁾。心臓 IRI に対する心保護戦略の1つに遠隔虚血プレコンディショニング (Limb remote ischemic preconditioning ; RPC) が存在する。RPCとは、非侵襲的に四肢を短時間の虚血と再灌流を数回施すことによって、遠隔臓器の IRI に対する保護効果を示すことである。現在、RPCの機序は神経系の関与、液性保護因子の関与、それらの相互関係が関わり合い、細胞内のタンパク質合成酵素や転写因子の発現により臓器保護効果が得られると考えられているが、RPCの機序は未だ全容解明には至っていない。基礎研究では、RPCの臓器保護効果は迷走神経切断 (胃後枝) で抑制されることが示されている²⁾。臨床研究では、小児の開心術におけるRPCの心臓 IRI に対する心保護効果は示されているが、合併症を有する成人の開心術においては議論の余地がある。また、成長ホルモン分泌促進物質であるグレリンは、胃から産生されるペプチドホルモンであり、体内でアシル化型 (AG) と非アシル化型 (UAG) の2つで存在し共にさまざまな細胞内シグナル伝達を介して心臓 IRI に対する心保護効果を有するとされている。そのシグナル経路は、RPCのシグナル経路と重なる点が多いが、RPCの機序においてグレリンの関与は未知である。本研究では、RPC手技自体が体内のグレリン産生に関与する可能性の探索および、RPCがグレリンを介して心臓 IRI に対し心保護効果の有無について検証する。

2. 研究の目的

RPCの機序に関する基礎研究では、既知の液性保護因子としてアデノシン、オピオイド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、一酸化窒素らが報告されている³⁾。その他に、RPCの心保護効果の減弱の原因として、高齢であること、迷走神経切断 (胃後枝)、プロポフォールの使用などが報告されているが、その機序は未解明である^{2,4)}。また他の先行研究では、液性因子の特徴には12-14kDa未満であること、水溶性で凍結乾燥が可能であり熱に不安定であることからペプチドあるいはタンパクではないかという推測されている⁵⁻⁸⁾。グレリンとは胃から分泌されるペプチドホルモンの1つで、成長ホルモン放出ホルモンであり、食欲亢進作用を示すが、心保護作用も報告されてい

る⁹⁾。以上の点から、本研究では、RPC手技自体が体内のグレリン産生に関与する可能性の探索および、RPCがグレリンを介して心臓 IRI に対し心保護効果の有無について検証する。

3. 研究の方法

雄性 Wistar ラットを用い、in vivoでの冠動脈前下行枝を30分間虚血と120分間再灌流させる心臓 IRI モデルを誘導し、5群に分類した (図1)。RPC手技はラットの上下肢に血圧カフを装着し200mmHgで5分間駆血と再灌流させるサイクルとして3回施行とした。UAG投与量は0.5mcg/kg、ヤヌスキナーゼおよびシグナル伝達兼転写活性化因子 (JAK/STAT) 経路の拮抗薬の1つであるAG490の投与量は3 mg/kgをそれぞれ静脈内投与した。

血清AG値およびUAG値の測定は、RPC手技前後で測定した。全ての個体でArea at riskとInfarct size (IS) を測定し、さらにRPCの保護経路の1つとされるJAK2/STAT3経路の活性化を検討するためにSTAT3のリン酸化をウェスタンブロット法により測定した。

4. 研究結果

対照 (CON) 群に比較しRPC群およびUAG群で、ISが有意に減少した (図2)。しかしAG490を投与することによってRPCとUAGの心保護効果が棄却された。血中UAG値については、CON群のUAG値は有意な増減は認めなかったが、RPC群で血清UAG値が有意に増加した (図3)。血中AG値については、CON群とRPC群で有意な増減は認めなかった (図4)。STAT3のリン酸化の割合については、RPC群、UAG群ではプレコンディショニング後に比べて再灌流10分後で有意に増加した (図5)。RPC群とUAG群の再灌流10分後のSTAT3のリン酸化の割合において有意にRPC群で高い結果となった。RPCおよびUAGの心保護効果はAG490投与によりSTAT3のリン酸化が阻害されることによって棄却された。

5. 考察

推測されるRPCによるUAG分泌の機序として、四肢を駆血と再灌流を複数回施行することで末梢組織からの一酸化窒素 (NO) が放出される¹⁰⁾。そのNOが節前線維のNO-cGMP経路を介してアセチルコリンを放出させ、そのアセチルコリンが胃壁細胞に作用

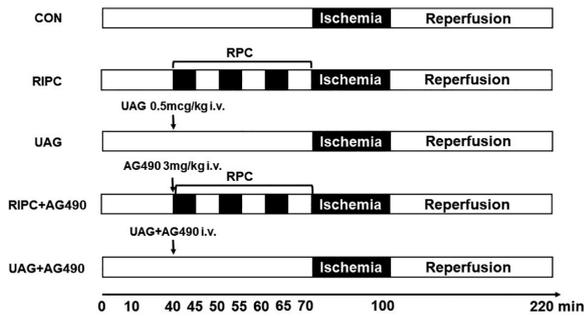


図1 実験プロトコール

CON群: LADの虚血再灌のみ施行. RIPC群: LAD遮断前にRPC手技を施行. UAG群: LAD遮断30分前にUAG 0.5mcg/kgを静脈内に投与. RIPC+AG490群: RPC手技前にAG490 3mg/kgを静脈内に投与. UAG+AG490群: UAG, AG490を静脈内に投与. n=8-10, each group

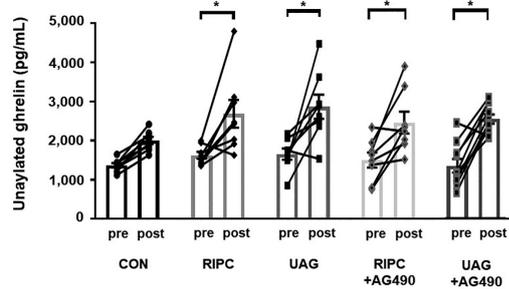


図3 結果 (血中 UAG 値)

n=8-10, each group

*: $P < 0.05$ vs. the 'pre' period, each group

し UAG を放出させたのではないかと考えられる¹¹⁾. 他の先行研究では, 迷走神経切断あるいはムスカリン受容体拮抗薬を投与することでグレリンの分泌が減少することが報告されている¹²⁾.

6. 結論

本研究の結果から, RIPCによってAGではなくUAGの分泌が有意に増加し, 増加したUAGはJAK2/STAT3経路を活性化させ心保護効果を示した. UAGがRIPCの液性因子の1つである可能性が示唆された.

文献

- Jennings RB. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2013; 113: 428-438.
- Mastitskaya S, Basalay M, Hosford PS, Ramage AG, Gourine A, Gourine AV. Identifying the source of a humoral factor of remote (pre) conditioning cardioprotection. *PLoS One* 2016; 11: e0150108. doi: 10.1371/journal.pone.0150108.
- Gassanov N, Nia AM, Caglayan E, Er F. Remote ischemic preconditioning and renoprotection: From myth to a novel therapeutic option? *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 216-224.
- Behmenburg F, Heinen A, Bruch LV, Hollmann MW, Huhn R. Cardioprotection by remote ischemic preconditioning is blocked in the aged rat heart in vivo. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2017; 31: 1223-1226.
- Hildebrandt HA, Kreienkamp V, Gent S, Kahlert P, Heusch G, Kleinbongard P. Kinetics and signal activation properties of circulating factor(s) from healthy volunteers undergoing remote ischemic pre-Conditioning. *JACC Basic Transl Sci* 2016; 1: 3-13.
- Lang SC, Elsässer A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, Kübler W, Katus HA, Vogt AM. Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning-identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 149-158.
- Staes E, Absil PA, Lins L, Brasseur R, Deleu M, Lecouturier N, Fievez V, Rieux Ad, Mingot-Leclercq MP, Raussens V, Prétat V. Acylated and unacylated ghrelin

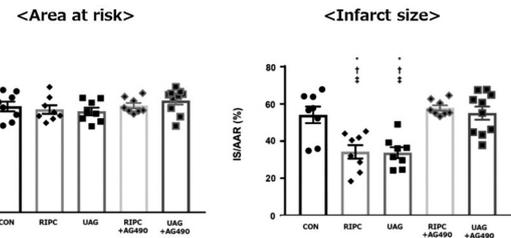


図2 結果 (Area at risk と Infarct size)

n=8-10, each group, *: $P < 0.05$ vs. CON, †: $P < 0.05$ vs. RIPC+AG490, ‡: $P < 0.05$ vs. UAG+AG490, by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

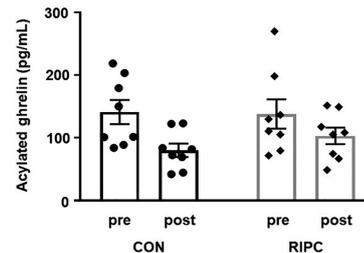


図4 結果 (血中 AG 値)

n=8, each group

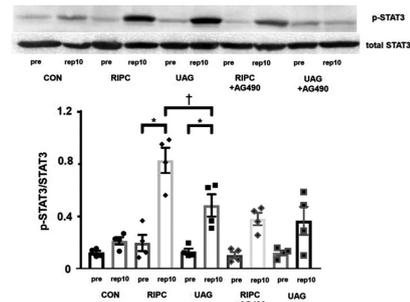


図5 結果 (STAT3_{tyr705} のリン酸化)

n = 4 per group

*: $P < 0.05$ vs pre in each group, †: $P = 0.0112$, by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

binding to membranes and to ghrelin receptor: towards a better understanding of the underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1798: 2102-2113.

- Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, Li J, Gross G, Wilson GJ, Callahan J, Redington AN. Transient limb ischemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)* 2009; 117: 191-200.
- Labarthe A, Fiquet O, Hassouna R, Zizzari P, Lanfumey L, Ramoz N, Grouselle D, Epelbaum J, Tolle V. Ghrelin-derived peptides: a link between appetite/reward, GH axis, and psychiatric disorders? *Front endocrinol* 2014; 5: 163. doi: 10.3389/fendo.2014.00163. eCollection 2014.
- Shahid M, Tauseef M, Sharma KK, Fahim M. Brief femoral artery ischaemia provides protection against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats: the possible mechanisms. *Exp Physiol* 2008; 93: 954-968.
- Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ Res* 2014; 114: 1601-1610.
- Herring N, Paterson DJ. Nitric oxide-cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro. *J Physiol* 2001; 535: 507-518.

澤下 泰明

略歴

2021年3月 札幌医科大学大学院卒業