麻酔薬を用いた心筋保護におけるミトコンドリアの役割

三尾 寧*

〔要旨〕 ミトコンドリアは心筋に対する麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニングのメカニズムにおいて中心的な役割を担っている。ミトコンドリアはこれら心筋保護効果において、トリガーの一部になるだけでなく、細胞死を防ぐ方向性を持った細胞内シグナリングの最終ターゲットにもなっている。麻酔薬によりミトコンドリア膜透過性遷移孔(mitochondrial permeability transition pore : mPTP)の開口が阻害され、ミトコンドリアのATP産生機能が維持される。その結果ATPを用いた細胞内カルシウム濃度の恒常性を保つ機能が保持され心筋細胞が保護される。

キーワード：心筋保護，ミトコンドリア，麻酔薬

はじめに

現在、周術期における虚血性心疾患などの心イベント発生を軽減させるための手段として、いくつかの方法が知られている。1997年Kerstenらはイヌを用いた実験において、イソフルランを投与した後に60分間冠動脈左前下行枝を結紮すると、単純に60分間冠動脈を結紮した群に比べ、虚血再灌流後の心筋梗塞範囲が減少したことを報告した¹⁾。この虚血再灌流前の麻酔薬投与が心筋保護効果を示す現象は麻酔薬プレコンディショニングと呼ばれている。一方、1997年Schlackらは、ウサギを用いた実験において冠動脈左前下行枝を30分間結紮後、ハロタンを再灌流3分前から15分後まで投与すると再灌流120分後の心筋梗塞範囲が縮小したことを報告し²⁾、2005年にはChiariらが同様の実験において、30分間冠動脈結紮後、5分間のイソフルラン投与が引き続く180分間の再灌流後の心筋梗塞範囲を減少させ

たことを示した³⁾。これら虚血後再灌流早期の麻酔薬投与が心筋保護効果を示す現象は麻酔薬ポストコンディショニングと呼ばれている。麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニングは周術期心イベント発生を軽減させることを目的とした薬理学的な心筋保護法の代表であり、心臓手術麻酔のみならず心疾患を合併した患者に対する非心臓手術麻酔に際した有力な心筋保護手段として⁴⁾、メカニズムの解明や臨床応用に関して研究が進んでいる。

近年、これらプレ・ポスト両コンディショニングにおいて、ミトコンドリアが保護効果発現のトリガーの一つでもありターゲットでもあるということが報告され^{5), 6)}、心筋保護メカニズムにおける中心的な役割を担っていることが明らかになってきた。本稿では麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニング作用におけるミトコンドリアの関与をさまざまな実験の結果をもとに解説していく。

*東京慈恵会医科大学麻酔科学講座

著者連絡先 三尾 寧
〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8
東京慈恵会医科大学麻酔科学講座

I トリガーとしてのミトコンドリア

麻酔薬プレコンディショニング効果発現のためのトリガーはいくつかの系が明らかになっているが、その一つにミトコンドリアで産生される reactive oxygen species (ROS) があげられる。Tanaka らはウサギを用いた実験においてイソフルランによるプレコンディショニング処置中に ROS 除去薬を併用すると、非併用群と比べプレコンディショニングによる虚血再灌流後の心筋梗塞巣縮小効果が減弱したことを報告した⁷⁾。麻酔薬プレコンディショニング適応中にミトコンドリアから発生する ROS がその後の保護効果発現に必要であることを示しており、このイソフルラン投与により発生する ROS は dihydroethidium という色素を用いた心筋染色標本においても組織学的に確認されている⁷⁾。虚血再灌流といった障害が加わったとき、大量の ROS がミトコンドリアから放出され細胞は障害を受けるが、プレコンディショニング適応時に発生する ROS は少量で、これがトリガーとなりその後のさまざまな反応を惹起させる⁵⁾。麻酔薬プレコンディショニングのトリガーとなる ROS は麻酔薬がミトコンドリア電子伝達系の複合体 I を阻害し電子のリークが生じることで産生されると考えられている⁶⁾。

一方、麻酔薬ポストコンディショニングにおいても、トリガーとしてミトコンドリアが関与している。ラット心臓より分離心筋細胞を単離、ミトコンドリア内 pH 指示薬である SNARF-1 を心筋細胞に導入し共焦点顕微鏡下のチャンバーにそれらを留置した後、窒素バブリング灌流液と通常の生理的な灌流液を用いることにより低酸素・再酸素化刺激を加えた、イソフルランを添加した灌流液を再酸素化早期に用いることでポストコンディショニングを適応したところ、ポストコンディショニング適応中からミトコンドリア内の pH は低下した⁸⁾。通常より pH の高い灌流液を用いるとポストコンディショニング適応によるミトコンドリア内 pH 低下作用は消失し、さら

には心筋細胞保護効果も減弱したことより、ミトコンドリア内の pH が低下することが麻酔薬ポストコンディショニングにおけるトリガーの一つであるといえる。このミトコンドリア内 pH 低下作用は、麻酔薬による酸化的リン酸化の抑制、ATP 産生を伴わない水素イオンのミトコンドリア内流入作用が機序として考えられている⁸⁾。

II ターゲットとしてのミトコンドリア

心筋細胞には細胞死を防ぐ方向性を持った pro-survival signaling pathways と呼ばれる細胞内情報伝達経路が存在する。その一つに phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt (protein kinase B) 経路と呼ばれるものがある。PI3K-Akt 経路においては細胞膜上のアデノシン A₁/A₃ 受容体刺激による G₁ タンパク活性化がトリガーとなり、まず Akt がそのリン酸化によって活性化される。Akt の活性化は glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) をリン酸化することによりその活性を抑制する。麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニングにおいては、この PI3K-Akt 経路の関与が明らかになっている^{3), 9)}。Akt の活性化は GSK-3 β のリン酸化を促進するだけでなく、他の細胞死を防ぐタンパクを活性化させ、細胞死を促進するタンパクを抑制し、また内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase : eNOS) を活性化させ一酸化窒素 (nitric oxide : NO) の産生を促進する。麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニング効果が NO 合成阻害薬の投与や eNOS ノックアウトマウスにおいて打ち消されることが報告されており^{10), 11)}、NO 産生が麻酔薬コンディショニングの作用機序の一つであることを示している。

このように麻酔薬プレ・ポストコンディショニングにおいては pro-survival signaling pathway の活性化による GSK-3 β のリン酸化、NO の産生促進が心筋細胞障害を軽減させることに関与しているが、これら細胞内シグナリングの変化と細胞死の軽減を介在しているのがミトコンドリアに存在するミトコン

ドリア膜透過性遷移孔(mitochondrial permeability transition pore: mPTP)である。mPTPは、その構造に関しては諸説が混在しているが、ミトコンドリア外膜に存在する voltage-dependent anion channel(VDAC), 内膜に存在する adenine nucleotide translocator(ANT), 内部(マトリックス)に存在する cyclophilin D などからなる構造物でマトリックスからのカルシウム流出系の一つになっている¹²⁾。mPTPは通常は閉じているが過剰な細胞内カルシウム負荷, 酸化ストレス(大量のROS), 低ATP状態などによって開口し¹²⁾, 開口はミトコンドリアの機能停止, すなわち心筋細胞死を意味する。数々の実験から GSK-3 β のリン酸化(活性抑制), NO 産生の促進, 麻酔薬ポストコンディショニングのトリガーとしてとらえられるミトコンドリア内pHの低下はすべてmPTPの開口を防ぐ作用を持つことが明らかになっている^{13)~15)}。以上より, 麻酔薬プレ・ポストコンディショニングにおける最終ターゲットはミトコンドリアに存在するmPTPであり, 最終作用はmPTPの開口を防ぐことにあるといえる。麻酔薬コンディショニングにおいてはPI3K-Akt経路以外のシグナリング機構の関与も明らかになっているが, 多くの最終標的は同様にmPTPであり, シグナリングの活性化はmPTPの開口阻害につながっている。

III ATP感受性カリウムチャンネルとミトコンドリア

ATP感受性カリウムチャンネル(K_{ATP}チャンネル)はATP濃度によって開閉が決まるカリウムチャンネルで,細胞膜上に存在する sarcolemmal K_{ATP}(sarcK_{ATP})チャンネルとミトコンドリアの内膜に存在する mitochondrial K_{ATP}(mitoK_{ATP})チャンネルの2種類がある。sarcK_{ATP}, mitoK_{ATP}両チャンネル拮抗薬を使用した実験結果などから, sarcK_{ATP}チャンネルの開口は麻酔薬プレコンディショニング作用の発現に, mitoK_{ATP}チャンネルの開口は麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニング作用の発現に関与しているとさ

れている^{16), 17)}。このうち sarcK_{ATP}チャンネルの開口が細胞保護につながる機序としては, sarcK_{ATP}チャンネルの開口によって細胞膜の過分極と活動電位期間の短縮が起こり, カルシウムの細胞内過流入が防止されるためと考えられている¹⁸⁾。一方, mitoK_{ATP}チャンネルの開口が細胞保護につながるメカニズムは明らかになっていない。sarcK_{ATP}チャンネルの開口と同様に mitoK_{ATP}チャンネルの開口によりミトコンドリア内にカリウムが流入し, それに伴いミトコンドリア内への過剰なカルシウム流入が防止されるため, mitoK_{ATP}チャンネルの開口がコンディショニング効果発現のトリガーである少量のROS産生を促進するため, mitoK_{ATP}チャンネルの開口によりミトコンドリアが軽度膨化しmPTPを構成するVDACやANTが低い透過性の状態で維持されるため¹⁸⁾, などの仮説があげられている。麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニングにおける mitoK_{ATP}チャンネルの関与を解明するためにはその開口薬の diazoxide や pinacidil, 阻害薬の 5-HD などを用いた実験を行う必要があるが, diazoxide や pinacidil は電子伝達系に, 5-HD は脂肪酸の酸化にそれぞれ影響を及ぼすことが報告された⁵⁾。これら開口薬・阻害薬の mitoK_{ATP}チャンネルに対する特異性の低さがコンディショニング効果における mitoK_{ATP}チャンネルの関与について議論の分かれる要因となっている。

IV ミトコンドリア保護と心筋保護

以上述べたように prosurvival signaling pathway の活性化, ミトコンドリア内pHの低下, さらには mitoK_{ATP}チャンネルが関与するなんらかの機序などによって引き起こされる mPTP の開口阻害が麻酔薬によるプレ・ポスト両コンディショニングのメカニズムにおいて重要な役割を担っている。mPTPが開口しない, つまりミトコンドリアが生存し続けるということは, 細胞内環境の恒常性維持につながり, それが細胞生存に寄与している。

ラットに対し in vivo でプレコンディショニング

図1 麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニングのメカニズムとミトコンドリア
 灰色の部分にはミトコンドリアの関与を示す。
 APC：麻酔薬プレコンディショニング，APoC：麻酔薬ポストコンディショニング

を適応し心臓を摘出，ミトコンドリアを単離しATP産生能を低酸素・再酸素化刺激後に測定したところ，プレコンディショニングラットミトコンドリアは非プレコンディショニングのそれと比べATP産生能が保持されていた¹⁹⁾。分離ミトコンドリアに対しin vitroで低酸素・再酸素化刺激，ポストコンディショニングを適応すると，同様にポストコンディショニングミトコンドリアにおいてATP産生能が保持されていた⁸⁾。さらに，in vivoでラットにプレ・ポスト両コンディショニングを適応した後ミトコンドリアを分離，ミトコンドリア溶液にミトコンドリア膜電位測定用薬rhodamine 123を加え蛍光分光光度計を用いてカルシウム負荷に対するミトコンドリア膜電位の変化を測定したところ，コンディショニングラットから単離したミトコンドリアは非コンディショニングミトコンドリアに比べ，mPTPの開口，つまりミトコンドリアの崩壊・機能停止を意味する膜電位の低下を引き起こすのにより高いカルシウム濃度を必要とした^{8), 9)}。さらに，ラット心臓より単離した心筋細胞に細胞内カルシウム指示薬である fluo-4AM を導入し，低酸素・再酸素

化刺激とイソフルランによるポストコンディショニングを適応し，細胞内カルシウム濃度の経時的变化を観察したところ，再酸素化約30分後より，非ポストコンディショニング心筋細胞と比べポストコンディショニングラット心筋細胞において細胞内カルシウム濃度は低値となり，50分以降では有意差をもって低値を示した⁸⁾。虚血再灌流時は細胞内カルシウムの過負荷が心筋障害の一因になっているが²⁰⁾，これらATP産生能の保持，高カルシウムに対するmPTPの開口耐性，細胞内カルシウム濃度の上昇抑制が麻酔薬コンディショニングによって引き起こされたという結果から，麻酔薬コンディショニングによるmPTPの開口阻害によってミトコンドリア機能・ATP産生能が保持され，細胞膜や小胞体に存在するカルシウムATPaseの活性が温存，細胞内カルシウム濃度の恒常性が保たれ，その結果心筋保護効果が発現すると考えられる。

まとめ

数々の動物実験から，麻酔薬プレ・ポスト両コンディショニングにおいてミトコンドリアは中心的な

役割を担っていることが明らかになった。ミトコンドリアは保護効果発現のトリガーの一つであるばかりでなく、mPTPの開口を防止するといった形で最終標的にもなっている。mPTPの開口防止はミトコンドリアの機能が保持されることにつながり、その結果産生されるATPによって細胞内カルシウム濃度の恒常性が保たれ再灌流後の細胞障害が軽減される(図1)。

麻酔薬プレコンディショニングに関しては有用性を示す臨床研究が散見されるが²¹⁾、麻酔薬ポストコンディショニングにはまだ明らかな有用性を示す臨床研究はない。しかしながら虚血ポストコンディショニングに関しては臨床上の有益さを示す報告がなされており²²⁾、虚血と麻酔薬コンディショニングではいくつかのメカニズムが共通していることから、麻酔薬ポストコンディショニングも発生してしまった予期せぬ心筋虚血に対する保護手段となる可能性がある。保護効果に関するミトコンドリアの関与がより一層明らかになれば、麻酔薬に限らずミトコンドリアを標的とした薬理的な心筋保護法に関する研究が進むと考えられ今後の発展が期待される。

参考文献

- 1) Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, et al. : Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K_{ATP} channels : reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 87 : 361-370, 1997
- 2) Schlack W, Preckel B, Barthel H, et al. : Halothane reduces reperfusion injury after regional ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth* 79 : 88-96, 1997
- 3) Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, et al. : Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction : evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 102 : 102-109, 2005
- 4) Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA, et al. : ACC/AHA 2007 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Care for Noncardiac Surgery : Executive Summary : A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery) : Developed in Collaboration With the American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Heart Rhythm Society, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, and Society for Vascular Surgery. *Circulation* 116 : 1971-1996, 2007
- 5) Bienengraeber MW, Weihrauch D, Kersten JR, et al. : Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul Pharmacol* 42 : 243-252, 2005
- 6) Burwell LS, Nadtochiy SM, Brookes PS : Cardioprotection by metabolic shut-down and gradual wake-up. *J Mol Cell Cardiol* 46 : 804-810, 2009
- 7) Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, et al. : Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits : a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* 97 : 1485-1490, 2002
- 8) Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, et al. : Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion. *Br J Pharmacol* 160 : 220-232, 2010
- 9) Mio Y, Shim YH, Richards E, et al. : Xenon preconditioning : the role of prosurvival signaling, mitochondrial permeability transition and bioenergetics in rats. *Anesth Analg* 108 : 858-866, 2009
- 10) Chiari PC, Bienengraeber MW, Weihrauch D, et al. : Role of endothelial nitric oxide synthase as a trigger and mediator of isoflurane-induced delayed preconditioning in rabbit myocardium. *Anesthesiology* 103 : 74-83, 2005
- 11) Ge ZD, Pravdic D, Bienengraeber M, et al. : Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Anesthesiology* 112 : 73-85, 2010
- 12) Rasola A, Bernardi P : The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12 : 815-833, 2007
- 13) Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. : Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113 : 1535-1549, 2004
- 14) Rakhit RD, Mojet MH, Marber MS, et al. : Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated

- neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 103 : 2617-2623, 2001
- 15) Halestrap AP : Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* 278 : 715-719, 1991
 - 16) Toller WG, Gross ER, Kersten JR, et al. : Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels : mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 92 : 1731-1739, 2000
 - 17) Krolikowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, et al. : Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion : the role of mitochondrial K_{ATP} channels. *Anesth Analg* 101 : 1590-1596, 2005
 - 18) Stadnicka A, Marinovic J, Ljubkovic M, et al. : Volatile anesthetic-induced cardiac preconditioning. *J Anesth* 21 : 212-219, 2007
 - 19) Ljubkovic M, Mio Y, Marinovic J, et al. : Isoflurane preconditioning uncouples mitochondria and protects against hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Cell Physiol* 292 : C1583-C1590, 2007
 - 20) Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, et al. : Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 100 : 179-190, 2005
 - 21) Garcia C, Julier K, Bestmann L, et al. : Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br J Anaesth* 94 : 159-165, 2005
 - 22) Thibault H, Piot C, Staat P, et al. : Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 117 : 1037-1044, 2008

Cardioprotection with Anesthetics – The Role of Mitochondria –

Yasushi MIO

Department of Anesthesiology, Jikei University School of Medicine

The volatile anesthetics protect the myocardium against ischemia/reperfusion injury when applied both before ischemia(anesthetic preconditioning)and at the onset of reperfusion(anesthetic postconditioning). Mitochondria play a central role in anesthetic pre- and postconditioning. Production of small quantities of reactive oxygen species from mitochondria and mildly acidotic mitochondrial pH induced by anesthetics are triggers for pre- and postconditioning. Furthermore, mitochondria are end effectors for various prosurvival signaling pathways. The activation of prosurvival signaling pathways with anesthetics is responsible for inhibition of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. The inhibition of mPTP opening leads to preservation of ATP synthesis, prevention of intracellular calcium accumulation and protection of myocardium.

Key Words : Cardioprotection, Mitochondria, Anesthetic