

特 集

グリコーゲン脱分枝酵素阻害薬 *N*-methyl-1-deoxynojirimycin による虚血心筋保護のメカニズム

荒井正純*, 湊口信也*, 熊田裕一*, 宇野嘉弘*
西田佳雄*, 王寧元*, 橋本和明*, 藤原久義*

要 旨

α -1,6-glucosidase 阻害薬である *N*-methyl-1-deoxynojirimycin (MOR-14) は、虚血中の嫌気性糖代謝を抑制し心筋梗塞サイズを ischemic preconditioning と同程度に減少させる。本研究において著者らは、MOR-14の心筋保護のメカニズムを詳細に検討するため、ischemic preconditioning における主要な mediator である protein kinase C (PKC) の関与について検討した。ウサギを、control 群 (n=10), MOR-14を虚血10分前に投与した MOR-14群 (n=10), PKC の blocker である staurosporine を MOR-14の10分前に投与した staurosporine+MOR-14群 (n=10) に分け、冠動脈を30分結紮-48時間再灌流した後 TTC 染色で梗塞を定量した。area at risk に占める梗塞域の割合は、各々46±5%, 17±2%, 47±4%であり、staurosporine により MOR-14の梗塞縮小効果は完全にブロックされた。また、ウサギの Langendorff 灌流心を用いた実験で、MOR-14は虚血20及び30分における membrane 分画の、また、虚血30分における cytosol 分画の PKC- ϵ の蛋白量を、非投与群に比して有意に増加させた。以上の結果から MOR-14による心筋保護のメカニズムに PKC の細胞内分布の変化が関与していると考えられた。

緒 言

長時間の虚血に先行する短時間の虚血-再灌

流、即ち ischemic preconditioning は動物種を越えて強力に虚血心筋保護作用を有する。心筋保護の研究における現在の大きなテーマは、この ischemic preconditioning の機序を解明しそれを薬理的に応用することで心筋の虚血傷害を ischemic preconditioning なみに軽減することである。著者らは、ischemic preconditioning された心筋では sustained ischemia 中に嫌気性糖代謝の抑制が生じていることに着目し、グリコーゲン脱分枝酵素の α -1,6-glucosidase に対し阻害作用を有する *N*-methyl-1-deoxynojirimycin (MOR-14) の虚血前投与が虚血中に生ずるグリコーゲン分解や乳酸蓄積を抑制し著明な心筋梗塞縮小効果を発揮することを見出した¹⁾。

しかし近年の研究により、嫌気性糖代謝の抑制は ischemic preconditioning の心筋保護の機序の一つではあるが^{2,3)}、その他にも細胞内情報伝達を介する多くの mediator が存在することが明らかにされてきた。ischemic preconditioning の心筋保護効果は、PKC の阻害薬により完全にブロックされ^{4,5)}、PKC の activator により mimic される^{4~6)}。また、adenosine A1⁷⁾、 α -adrenergic⁸⁾、bradykinin B2⁹⁾受容体などの PKC と couple する受容体の刺激により ischemic preconditioning 同様の心筋保護効果が得られる。これらの事実から PKC を介するシグナル伝達が、ischemic preconditioning の心筋保護のメカニズムにおいて中心的な役割を果たしていると考えられる。

一方で嫌気性糖代謝の抑制と PKC の関連について、最近興味深い知見が示されている。Armstrong¹⁰⁾らは代謝の抑制による虚血心筋細胞傷害の

*岐阜大学医学部第二内科

軽減が PKC の選択的な阻害薬である calphostin C によりキャンセルされることを報告した. このことは, 嫌気性糖代謝の抑制と PKC がそれぞれ別々に作用するのではなく, リンクしたかたちで ischemic preconditioning 効果に関与しているということを示唆している.

本研究において著者らは, 絶大なる虚血心筋保護効果を有する MOR-14 の作用メカニズムをより明らかにする目的で PKC の関与について検討した.

方 法

1) MOR-14 の梗塞縮小効果及びグリコーゲン代謝抑制作用に対する PKC inhibitor の影響 心筋梗塞サイズ

ウサギを以下の4群, 即ち 1) saline を虚血開始10分前に投与した saline 群 (n=10), 2) MOR-14 (100 mg/kg) を虚血開始10分前に投与した MOR-14 群 (n=10), saline や MOR-14 の投与10分前 (虚血前20分) に staurosporine (50 μg/kg) を投与した各々 3) staurosporin + saline 群 (n=10), 4) staurosporine + MOR-14 群 (n=10), に分け, 冠動脈を30分間閉塞48時間再灌流させ TTC 染色で梗塞量を測定した¹¹⁾.

グリコーゲン代謝

上記の control 群 (n=11), MOR-14 群 (n=11), staurosporine + MOR-14 群 (n=9) の3群について, 虚血30分の時点での心筋グリコーゲン及び乳酸含量について酵素反応を用いて評価した.

2) MOR-14 による虚血中の PKC-ε の細胞内分布に対する影響

Langendorff 灌流

ウサギの心臓を素早く取り出し Langendorff 装置にて100 cmH₂O の圧で灌流した. 20分の stabilize perfusion の後, MOR-14 群では 2 mmol/l の MOR-14 を, saline 群では同量の saline を10分間 Krebs-Henseleit solution に加え灌流した. 各々のグループについて, 虚血の開始時点及び虚血開始後10, 20, 30分の各時点で心筋を素早く凍結した.

Subcellular Fractionation

凍結サンプルを300 mM sucrose 溶液でホモジナ

イズした後1000 gで遠沈した. こうして得られた上清を105000 gで1時間遠沈し, 得られた上清を soluble (cytosol) 分画, pellet を membrane 分画とした. particulate (membrane) 分画は0.5% TritonX-100を含む Tris buffer に溶解した.

Western Blotting

ウサギの心臓に存在する幾つかの PKC isoform のなかで代表的であるとされる PKC-ε について, その cytosol 及び membrane 分画の蛋白量を通常の SDS-PAGE Western immunoblotting 法を用いて評価した. 一次抗体には抗ヒト PKC-ε モノクローナル抗体 (Transduction Laboratories, 1:100 dilution) を使用した. Band の発光には ECL を用いた.

結 果

area at risk に占める梗塞領域の割合は, staurosporine + MOR-14 群で 47 ± 4% であり, saline 群 (46 ± 5%) と差はなく MOR-14 群 (17 ± 2%) に比し有意に高値であった (図1). staurosporine 単独では梗塞サイズに影響を及ぼさなかった (図1). 虚血中の血圧と心拍数, 及び左室に対する area at risk の大きさには, 4群間で差は認められなかった.

虚血30分の時点での虚血領域中心部の心筋グリコーゲン量 (mg/g wet wt) は, MOR-14 群では 1.6 ± 0.1 であり saline 群 (0.6 ± 0.1) に比し有意

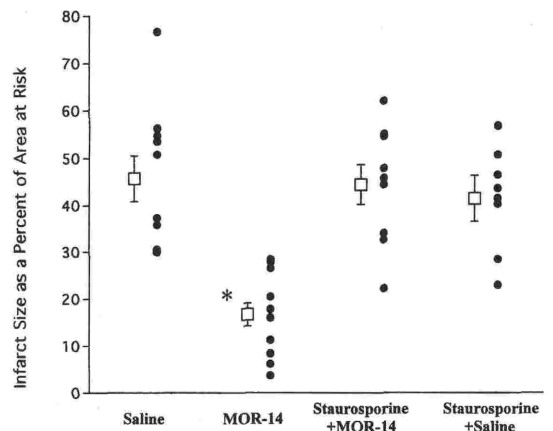


図1 Area at risk に対する梗塞の割合 (%)

*p < 0.05 vs. saline group. Bars: means ± SEM.

に高値を示した。staurosporine+MOR-14群におけるこの指標は 1.6 ± 0.2 であり、staurosporineの投与下でもMOR-14の持つグリコーゲン分解抑制作用は保持された(図2)。

一方虚血30分の時点での虚血領域中心部の心筋乳酸量(mg/g wet wt)は、MOR-14群(2.4 ± 0.2)

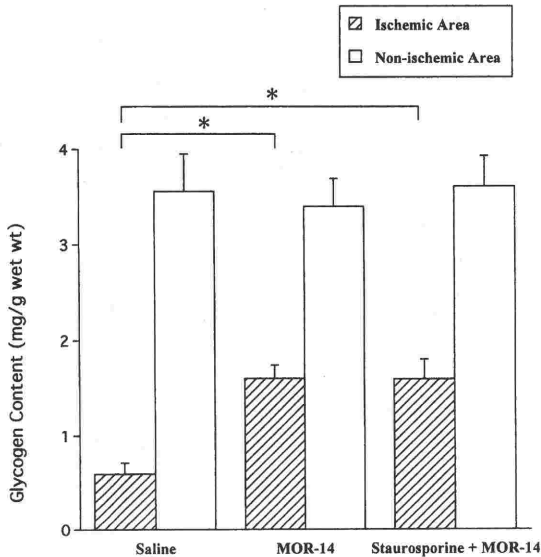


図2 虚血領域、非虚血領域の虚血30分の時点での心筋グリコーゲン量

* $p < 0.05$. Bars: means \pm SEM.

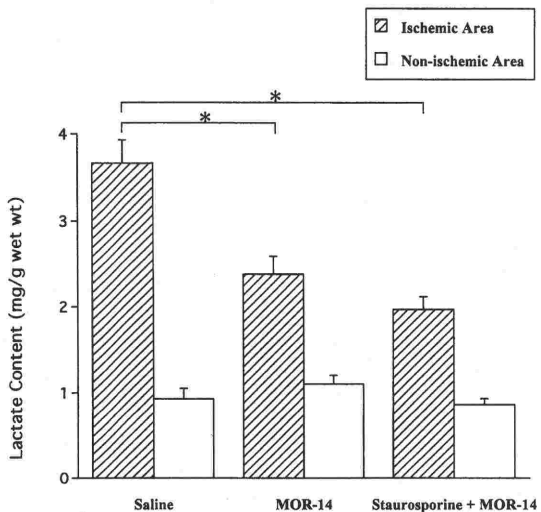


図3 虚血領域、非虚血領域の虚血30分の時点での心筋乳酸量

* $p < 0.05$. Bars: means \pm SEM.

と staurosporine+MOR-14群 (2.4 ± 0.2) で差はなく、これらは共に saline 群 (3.7 ± 0.3) に比し有意に低値であった(図3)。

PKC- ϵ の蛋白量は、saline 群及びMOR-14群共に、虚血の開始にともない、membrane 分画では虚血20分をピークに増加し、cytosol 分画では虚血30分まで漸減するパターンを示した。虚血20分及び30分での membrane 分画における PKC- ϵ は、stable perfusion 後に比較し各々 3.6 ± 0.6 倍、 1.9 ± 0.2 倍であり saline 群(各々 2.3 ± 0.5 倍、 0.8 ± 0.1 倍)に対し蛋白レベルで有意に増加していた(図4)。一方 cytosol 分画においても PKC- ϵ は、虚血30分でMOR-14群において saline 群に対し有意に保持されていた(stable perfusion 後に比較し各々 0.3 ± 0.1 倍、 0.1 ± 0.1 倍)(図5)。

考 案

MOR-14の持つ心筋梗塞縮小効果はPKCの inhibitorである staurosporine の前投与により完全にブロックされた。この結果について著者らは、MOR-14の嫌気性糖代謝に対する抑制効果がPKCに依存しているのではないかと考え、staurosporine 存在下でのMOR-14の糖代謝に対する作用を評価した。しかし、MOR-14の持つ虚血中のグリコーゲン分解や乳酸蓄積を抑制する効果は、staurosporine によりPKCを阻害しても完全に保

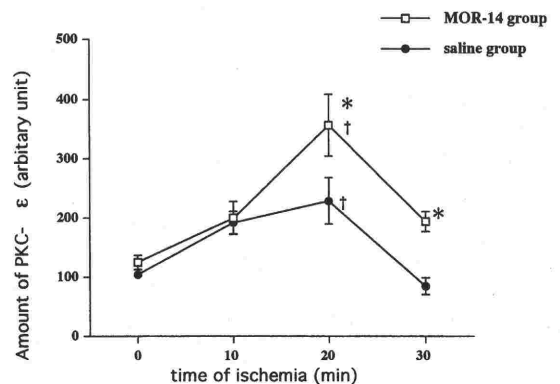


図4 membrane 分画における PKC- ϵ の経時的变化

各時点の PKC- ϵ の蛋白量は、20分の定常灌流後の PKC- ϵ 量を100として表した。

* $p < 0.05$ vs. 同一時点での saline 群の PKC- ϵ 量
† $p < 0.05$ vs. 各群の虚血開始時点の PKC- ϵ 量
Bars: means \pm SEM.

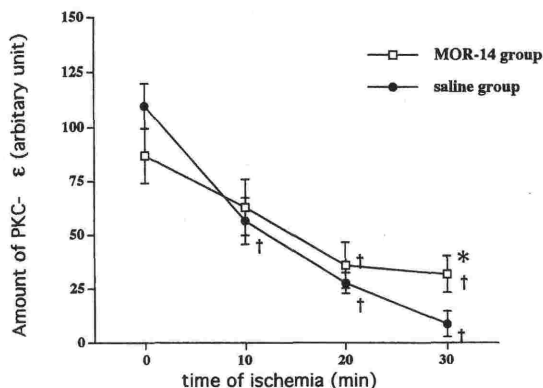


図5 cytosol 分画における PKC- ϵ の経時的変化
各時点の PKC- ϵ の蛋白量は、20分の定常灌流後の PKC- ϵ 量を100として表した。
* $p < 0.05$ vs. 同一時点での saline 群の PKC- ϵ 量
† $p < 0.05$ vs. 各群の虚血開始時点の PKC- ϵ 量
Bars: means \pm SEM.

持された。このことは、MOR-14による梗塞縮小のメカニズムにおいて、嫌気性糖代謝の抑制が少なくとも直接的な mediator ではなく、むしろ代謝の抑制が何らかの形で PKC を介して心筋保護効果を発揮していることを示唆する。ただしこれらの結果だけで PKC が MOR-14 による虚血心筋保護の mediator であることを結論づけることはできない。なぜなら、staurosporine が selective な PKC の inhibitor ではないからである。そのため我々は、PKC の関与をより明確にするために、ischemic preconditioning において見られるように、MOR-14 の投与により PKC の細胞内 translocation が生じるか否かを検討した。その結果ウサギにおいて主要な PKC の isoform である PKC- ϵ が、MOR-14 投与群で membrane 分画においては虚血20分と30分で、cytosol 分画においては虚血30分の時点で、蛋白レベルで非投与群より多く distribution していた。

PKC- ϵ は虚血により活性化され細胞質から細胞膜に translocation した後虚血時間の延長に伴い分解される¹²⁾。本実験で MOR-14 群の membrane 分画で PKC- ϵ が saline 群に対し多く存在していた理由としては、translocation の亢進より分解の抑制が考えられる。なぜなら cytosol 分画でも虚血30分において MOR-14 群で saline 群より PKC- ϵ が保持されているからである。translocation の

亢進ではこのことは説明できない。Yoshida ら¹³⁾ は PKC の分解には calpain が主にあずかることを示している。calpain は虚血中に Ca^{2+} により活性化される。MOR-14 は、嫌気性糖代謝を抑制することで虚血中の細胞内 H^+ の蓄積を減少させ、それが Na^+-H^+ 及び Na^+-Ca^{2+} 交換系を介して細胞内 Ca^{2+} の蓄積を抑制させることにより、calpain の活性化を防ぎ PKC 分解を抑制していると考えられる。このことに関しては今後実際の細胞内 Ca^{2+} や calpain 活性を測定する必要があると考えられる。

結 論

MOR-14 の心筋梗塞縮小効果は、PKC の inhibitor である staurosporine により完全にブロックされることから、何らかの形で PKC を介することが示された。MOR-14 による嫌気性糖代謝の抑制が、虚血中の PKC 分解の軽減を生じ心筋保護効果が発揮される可能性が示唆された。

文 献

- 1) Arai M, Minatoguchi S, Takemura G, et al : *N*-methyl-1-deoxyojirimycin (MOR-14), an α -1,6-glucosidase inhibitor, markedly reduced infarct size in rabbit hearts. *Circulation* 97 : 1290-1297, 1998
- 2) Jennings RB, Murry CE, Reimer KA : Energy metabolism in preconditioned and control myocardium: effect of total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 23 : 1449-1458, 1991
- 3) Asimakis GK, Inners-McBride K, Medellin G, et al : Ischemic preconditioning attenuates acidosis and post-ischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol* 263 : H887-H894, 1992
- 4) Ytrehus k, Liu Y, Downey JM : Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 266 : H1145-H1152, 1994
- 5) Mitchell MB, Meng X, Ao L, et al : Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 76 : 73-81, 1995
- 6) Hu K, Nattel S : Mechanisms of ischemic preconditioning in rat hearts. Involvement of α 1B-adrenoceptors, pertussis toxin-sensitive G proteins, and protein kinase C. *Circulation* 92 : 2259-2265, 1995
- 7) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al : Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit hearts. *Circulation* 84 : 350-356, 1991
- 8) Tsuchida A, Liu Y, Liu GS, et al : α 1-Adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circ Res* 75 : 576-585, 1994

- 9) Wall TM, Sheehy R, Hartman JC : Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 270 : 681-689, 1994
- 10) Armstrong S, Downey JM, Ganote CE : Preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: induction by metabolic stress and blockade by the adenosine antagonist SPT and calphostin C, a protein kinase C inhibitor. *Cardiovasc Res* 28 : 72-77, 1994
- 11) Fishbein M, Meerbaum S, Rit J, et al : Early phase of acute myocardial infarct size quantification: Validation of tri-phenyl-tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 101 : 593-600, 1981
- 12) Yoshida K, Hirata T, Mizukami Y, et al : Translocation of protein kinase C- α , β and ϵ isoforms in ischemic rat heart. *Biochim Biophys Acta* 1317 : 36-44, 1996
- 13) Yoshida K, Sorimachi Y, Kawashima S, et al : Calpain activity alters in rat myocardial subfractions after ischemia or reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1182 : 215-230, 1993

Mechanisms of Cardioprotection Afforded by *N*-Methyl-1-Deoxynojirimycin, an α -1,6-Glucosidase Inhibitor: Involvement of Protein Kinase C

Masazumi Arai*, Shinya Minatoguchi*, Hirokazu Kumada*, Yoshihiro Uno*, Yoshio Nishida*, Ningyuan Wang*, Kazuaki Hashimoto*, Hisayoshi Fujiwara*

*The Second Department of Internal Medicine, Gifu, Japan

We previously demonstrated that preischemic treatment with *N*-methyl-1-deoxynojirimycin (MOR-14) attenuates anaerobic glycolysis by inhibiting α -1,6-glucosidase activity of glycogen debranching enzyme and markedly reduces infarct size. However, it is unknown whether the beneficial effect is due to direct protection against cytotoxicity of accumulated products of anaerobic glycolysis. To further clarify the precise mechanism, we investigated whether the cardioprotective effect is dependent on protein kinase C (PKC), a main mediator of ischemic preconditioning. Rabbits were subjected to 30 min ischemia followed by 48 hrs reperfusion. The infarct size-limiting effect of MOR-14 was completely blunted when 50 μ g/kg of staurosporine, a PKC inhibitor, was

administered 10 min prior to MOR-14 injection although staurosporine alone did not alter the infarct size. However, after 30 min of ischemia, glycogen and lactate levels in the staurosporine + MOR-14 group were similar to those in MOR-14 alone group and significantly different from those in the control group. Immunoblot analysis of PKC- was performed using Langendorff-perfused rabbit hearts. Ischemia caused translocation of PKC- ϵ from the cytosol to the membrane fraction, peaking at 20 min of ischemia. At 20 and 30 min of ischemia, the amount of PKC- ϵ in the membrane fraction were significantly more than those in the control group. These data suggest that PKC, rather than glycogenolytic inhibition, is the main mechanism of cardioprotection afforded by MOR-14.

Key words : *N*-methyl-1-deoxynojirimycin, Protein kinase C, Anaerobic glycolysis, Preconditioning

(Circ Cont 21 : 5 ~ 9, 2000)