

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06448

研究課題名（和文）吸入麻酔薬とGLP-1の心筋保護相互作用とオートファジーの役割

研究課題名（英文）Volatile anesthetic and GLP-1 induced cardiac protection synergism is dependent on the activation of autophagy.

研究代表者

笠井 飛鳥（KASAI, Asuka）

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：90756892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの心筋虚血再灌流モデルを用いて、心筋梗塞サイズを測定することで、吸入麻酔薬イソフルランおよびグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）にプレコンディショニング刺激による心筋保護作用が存在することを確認した。また、これらの心筋保護作用に相互作用があることも明らかになった。さらに、これらの心筋保護作用にオートファジーが関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that volatile anesthetic-induced and GLP-1-induced cardiac preconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in mice. Additionally, our results show that volatile anesthetic and GLP-1 induced cardiac protection synergism is dependent on the activation of autophagy.

研究分野：麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 イソフルラン オートファジー 心筋保護 虚血再灌流障害 GLP-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 1986年、短時間の虚血再灌流がその後の長時間の虚血に対する心筋梗塞サイズを減少させるという報告がなされた(Murry CE et al., *Circulation* 74:1124-1136, 1986) (図1)。短期虚血によるプレコンディショニング(IPC)と呼ばれ、臨床的に有用性の極めて高い発見であった。しかしながら、IPC作用のメカニズムなど全容は未だ明らかではない。

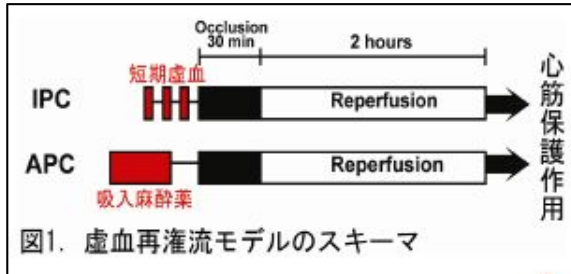


図1. 虚血再灌流モデルのスキーマ

(2) 近年、吸入麻酔薬、GLP-1、オピオイドやアデノシンなど IPC 様作用をあらわす様々な薬物が報告されており注目を浴びてきた。これらは、IPC のメカニズムと類似した部分が多く、心筋保護作用に対して共通の経路を有するものと考えられている。申請者も吸入麻酔薬の前投与によるプレコンディショニング(APC)心筋保護作用(図1)や、新しい糖尿病治療薬として注目を浴びている GLP-1 による心筋保護作用を報告しており、さらには、これらの相互作用についても明らかにしてきた。

(3) オートファジーは自食作用と呼ばれ、細胞内タンパク分解機構であり、一般的には栄養飢餓などで誘導され、タンパクを分解して再利用することで細胞や組織に保護的に働くシステムである。また、不要なタンパク質やダメージを受けた器官を除去して細胞を正常に保つ働きも行っており、近年の研究によると、虚血再灌流時にオートファジーの誘導が心筋に対し保護的に作用することが示唆されている(*Autophagy* 2:305-306, 2006)。しかしながら、虚血再灌流障害に対して APC や GLP-1、それらの相互作用による心筋保護作用が、オートファジーの誘導にどのように作用しているかは明らかではない。

2. 研究の目的

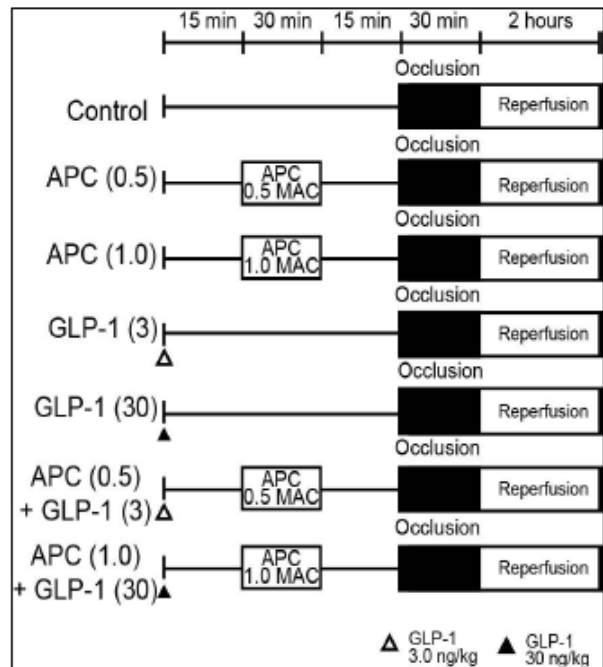
プレコンディショニング作用がある様々な薬物が研究されているが、臨床応用に至っている薬物は少ない。申請者の研究グループは、早くから吸入麻酔薬の心筋保護作用に注目し、その経路を明らかにしてきた。また、GLP-1 受容体作動薬は、近年本邦においても臨床承認され糖尿病患者に対して広く使用されている。そのため、周術期患者においても GLP-1 と吸入麻酔薬との相互作用を明らかにすることは、臨床的にも極めて重要であると思われる。さらに、これらの薬物の相互

作用をオートファジーと関連付けた報告は、国内外を含め知る限りにおいて存在しない。そこで申請者は以下の仮説を立てた。吸入麻酔薬または GLP-1 の前投与によってオートファジーが誘導され、心筋保護効果が発現する。さらに、吸入麻酔薬と GLP-1 の相加作用による心筋保護作用はオートファジーが誘導されることで発現する。

これらの仮説を検証するため以下の実験を行なう。

実験 1.

マウス *in vivo* 虚血再灌流モデルを用いて対照群、APC 群、GLP-1 群、APC+GLP-1 群において心筋梗塞サイズを測定比較する。



実験 2.

同様のモデルを使用しオートファジーの心筋保護作用への関与を明らかにする。

実験 3.

各群においてオートファジーの誘導を免疫ブロットング法にて確認する。

3. 研究の方法

実験 1.

マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定しながら、APC (イソフルラン 1.0 minimum alveolar concentration [MAC])・GLP-1 (受容体作動薬 Exendin-4 を 30 ng/kg iv) 刺激を行う。心臓冠動脈を 30 分間閉塞後、2 時間再灌流し、再び冠動脈を閉塞、Evans Blue を注入し心臓を取り出す。心臓をスライスし、TTC にて再染色を行い心筋梗塞サイズを測定する。コントロール群、APC 群、GLP-1 群において心筋梗塞サイズを測定比較する

実験 2.

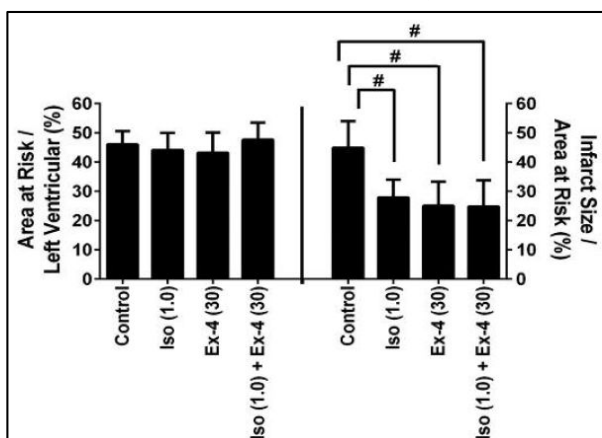
オートファジー抑制剤(3-メチルアデニン:

3-MA)を刺激前に投与し、同様の虚血再灌流実験を行う。これにより、オートファジーのAPC、GLP-1による心保護作用に対する影響を明らかにする。

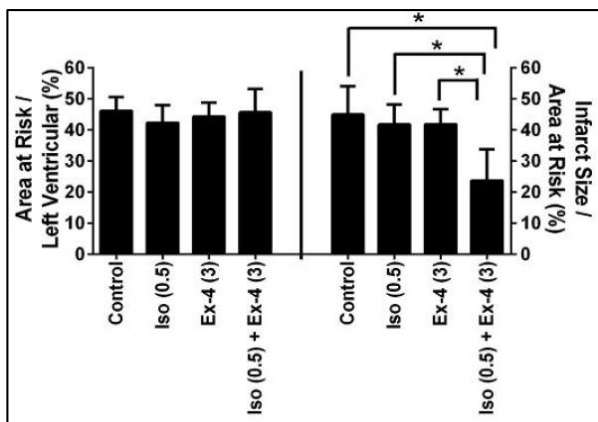
実験3. 実験1.及び実験2.の各群のマウスの摘出心を用い、関連タンパクについてイムノプロット法にて比較する(LC3-I/LC3-II、Beclin1など)。

4. 研究成果

(1) プレコンディショニング刺激としてAPC(イソフルラン 1.0 minimum alveolar concentration [MAC]を30分吸入)・GLP-1(受容体作動薬 Exendin-4 を30 ng/kg iv)刺激を虚血再灌流の負荷前に行い Iso (1.0)群・Ex-4 (30)群を作成した。その後虚血再灌流実験(30分の虚血と2時間の再灌流)を行い、再灌流2時間後に心臓を染色、顕微鏡を用いて心筋梗塞サイズを測定した。何も刺激しない虚血再灌流群(コントロール群)と比較すると、Iso (1.0)群・Ex-4 (30)群においては心筋梗塞サイズが縮小し、心筋保護作用があることが明らかになった。



一方、イソフルラン 0.5 MAC を吸入した場合 Iso (0.5)群、Exendin-4 を3 ng/kg 投与した場合 Ex-4 (3)群、はこれらの心筋保護作用は認められなかった。しかしながら低濃度刺激を両方行った場合は心筋保護作用が現れた。



(2) 実験1で見られた心筋保護作用はオート

ファジーまた、この各群にオートファジー抑制剤(3-メチルアデニン: 3-MA)をAPC刺激・GLP-1刺激前に投与し、同様の虚血再灌流実験を行った結果、コントロール群においては梗塞領域に変化がなかったが、APC刺激による心筋保護作用・GLP-1刺激による心筋保護作用がともに棄却された。これにより、オートファジーのAPC刺激、GLP-1刺激による心筋保護作用に対する影響が明らかとなった。

(3) 各群のマウスの摘出心をホモジナイズし、タンパク定量を行い、同量のタンパクに対しイムノプロット法にて、オートファジーの関連抗体について検討を加えた(LC3-I/LC3-II、Beclin1など)。その結果APC刺激を加えた心臓およびGLP-1刺激を加えた心臓ともにオートファジーが活性化されていることが分かり、オートファジーの誘導が認められた。

これら上記のことより、吸入麻酔薬イソフルラン・GLP-1のプレコンディショニング刺激による心筋保護作用におけるオートファジーの役割が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Siho Satomi, Asuka Kasai, Eisuke Hamaguchi, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuya Tanaka. Normothermic cardiopulmonary bypass in patient with Waldenström's macroglobulinemia and cryoglobulinemia: Case report. *A&A Case Reports*. 2017 印刷中 査読有
 Michiko Kinoshita, Yasuo M. Tsutsumi, Kohei Fukuta, Asuka Kasai, and Katsuya Tanaka. Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels. *Journal of Medical Investigation* 63: 80-84, 2016. 査読有
http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol63/pdf/v63_n1-2_p080.pdf
 Eisuke Hamaguchi, Katsuya Tanaka, Rie Tsutsumi, Yoko Sakai, Kouhei Fukuta, Asuka Kasai, Yasuo M. Tsutsumi. Exendin-4, glucagon-like peptide-1 receptor agonist, enhances isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction via caveolin-3 expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 19:1285-1290, 2015. 査読有
<http://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/1285-1290.pdf>

[学会発表](計2件)

里見志帆、東島祥代、笠井飛鳥、角田奈美、堤保夫、田中克哉 クリオグロブリン血症を合併したマクログロブリン血症患者における開心術の麻酔経験 第53回日本麻酔科学会中国・四国支部学術集会 2016年9月10日 岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

堤保夫、香留希実子、笠井飛鳥、瀧口英佑、酒井陽子、田中克哉 侵襲時の代謝破綻と糖負荷の影響 日本麻酔科学会第63回学術集会 2016年5月26日 マリンメッセ福岡（福岡県・博多市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

笠井 飛鳥 (KASAI, Asuka)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：9 0 7 5 6 8 9 2