

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20058

研究課題名(和文) NMBAsの中枢神経への影響の解析

研究課題名(英文) Effects of NMBAs on central nervous system

研究代表者

新城 武明 (Shinjo, Takeaki)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70624914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当初予定していたNMBAsが中枢神経系に及ぼす影響の評価の研究は有意なデータが得られなかったため、新たな実験系を追加した。酸化ストレスによる細胞障害に対して麻酔鎮静薬であるプロポフォールが保護作用を持ち、その保護作用がもたらされる細胞内シグナルを解明する研究に変更した。プロポフォール処理でHO-1遺伝子発現を調節するNrf2の発現が上昇し、さらにNrf2の核における局在が促進された。ラット心臓H9c2細胞において、プロポフォールは、Nrf2の発現を亢進し、核への移行を促進することで抗酸化酵素の発現量を上昇させ、酸化ストレスから細胞を保護することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We changed to a study to elucidate that propofol, an anesthetic sedative, protects against cell damage due to oxidative stress and protective intracellular signal. Propofol has been proposed to protect cells or tissues against oxidative stress. In the present study, we employed an in vitro oxidative injury model, in which rat cardiac H9c2 cells were treated with H2O2, and investigated roles of propofol against oxidative stress. Propofol treatment reduced H2O2-induced apoptotic cell death. While H2O2 induced expression of the antioxidant enzyme HO-1, propofol further increased HO-1 mRNA and protein levels. Propofol also promoted nuclear localization of Nrf2 in the presence of H2O2. Knockdown of Nrf2 suppressed the propofol-induced cytoprotection. These results suggest that propofol exerts antioxidative effects by inducing nuclear localization of Nrf2 and expression of its downstream enzyme in cardiac cells.

研究分野：麻酔

キーワード：酸化ストレス プロポフォール 抗酸化酵素 細胞保護効果

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、組織虚血、神経障害、癌、高血圧、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、特発性肺線維症および喘息を含む多くの病的状態に寄与する。酸化ストレスは、反応性が高く、炭水化物、脂質、核酸およびタンパク質を含む細胞成分に損傷を与え、それらの機能を変える可能性がある反応性酸素種 (ROS) などの酸化剤の過剰を引き起こす。心臓の場合酸化ストレスは、心筋細胞虚血およびその後の心不全をもたらす心筋虚血 - 再灌流損傷において主要な役割を果たす。プロポフォール (2,6-ジイソプロピルフェノール) は、手術中に患者を鎮静させるために使用される。プロポフォールの麻酔効果は、GABA A 受容体の活性化、およびその結果としてのチャネル閉鎖時間の遅延に起因する。プロポフォールはナトリウムチャネル遮断薬としても作用する。麻酔作用に加えて、プロポフォールは、細胞または組織を酸化ストレスから保護すると報告されている。この有益な効果の根底にあるメカニズムは解明されていない。しかしながら、プロポフォールが細胞傷害作用を示す報告もある。これらの相違は、細胞型の違いおよび/または実験のパラダイムに起因する可能性がある。プロポフォールは、人体が侵襲的ストレスを受ける外科手術において一般的に使用されるため、プロポフォールが特定の細胞タイプまたは組織に有益な効果を及ぼすか、有害な効果をもたらすかは臨床的に重要である。Heme oxygenase-1 (HO-1) は、酸化ストレスによって誘発される。心臓特異的 HO-1 過剰発現は、心筋虚血および再灌流損傷を防ぎ、動物モデルにおいて心機能を改善する。HO-1 発現は、転写因子である NF-E2 関連因子 α (Nrf2) によって調節される。Nrf2 は、抗酸化酵素の媒介による抗酸化物質応答を調節する主要な転写因子であることが報告されている。

プロポフォールによる Nrf2 / HO-1 の活性化はラット肝臓移植モデルで報告されているが、Nrf2 / HO-1 カスケードとプロポフォールとの関係については心筋細胞モデルからはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、ラット心臓 H9c2 細胞における ROS に対するプロポフォールの役割を直接調べるために、過酸化水素誘導酸化ストレスモデルを用いた。

3. 研究の方法

- (1) H9c2 細胞に 250 μ M の過酸化水素を投与して細胞死を誘発する酸化ストレスモデルを作成した。培養 H9c2 細胞に 100 μ M のプロポフォールを投与し、その 30 分後に 250 μ M の過酸化水素を投与した。過酸化水素投与後 24 時間で H9c2 細胞を回収して各種検討を行った。
- (2) 過酸化水素の細胞毒性を調べるためにトリパンブルー染色および TUNEL 染色を用いて検討した。
- (3) 抗酸化作用を持つ酵素である HO-1 とその上流因子である Nrf2 の細胞内発現について western blotting、RT-PCR、免疫染色を用いて検討した。
- (4) 酸化ストレス状態で Nrf2 の発現を siRNA で抑制し、Nrf2 の下流因子で抗酸化酵素である HO-1 および Nqo-1 の発現量を検討した。また H9c2 細胞から放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定した。

4. 研究成果

- (1) 培養 H9c2 細胞に 250 μ M の過酸化水素を

曝露させると細胞死が見られる。過酸化水素曝露30分前に100 μ Mのプロポフォールで処理すると過酸化水素誘導性の細胞死が減少することがトリパンブルー染色で明らかになった。また、TUNEL染色によりその細胞死はアポトーシスであることがわかった。

- (2) western blotting および RT-PCR を用いて検討した結果、250 μ M 過酸化水素の曝露により H0-1 の発現が誘導された。過酸化水素の曝露前に 100 μ M プロポフォールで処理すると有意に H0-1 の発現量が増加した。
- (3) H0-1 の上流因子である Nrf2 の発現について検討した。western blotting および RT-PCR を用いて検討した結果、100 μ M プロポフォールの処理により有意差は出ないものの、Nrf2 の発現が誘導される傾向にあった。さらに細胞質と核内における Nrf2 の発現を別々に検討した。その結果、100 μ M プロポフォールの処理により、細胞質では Nrf2 の発現は亢進しないが核における Nrf2 の局在が促進された。免疫染色を用いて検討した結果、250 μ M 過酸化水素の曝露30分前に100 μ M プロポフォールで処理すると Nrf2 の核での発現が亢進していることが分かった。
- (4) siRNA を用いて Nrf2 の発現をノックダウンして RT-PCR を用いて検討した。Nrf2 の発現をノックダウンしない場合、100 μ M プロポフォールにより Nrf2 の下流因子である H0-1 および Nqo-1 の発現の上昇がみとめられたが、Nrf2 の発現をノックダウンすると H0-1 および Nqo-1 の発現は上昇しなかった。さらに Nrf2 の発現をノックダウンした時の乳

酸脱水素酵素(LDH)の活性を測定した。ノックダウンしない場合は100 μ M プロポフォールにより LDH の上昇が抑制されるが、ノックダウンすると100 μ M プロポフォールで処理しても control 群と同程度の LDH の上昇が見られた。従ってプロポフォールによる細胞保護効果は Nrf2 が関係していることが示唆された。

- (5) 以上の結果から、本研究では以下のことが判明した。

プロポフォールは過酸化水素によるアポトーシスから細胞を保護する作用を持つ。

プロポフォールにより核内での Nrf2 の発現が亢進する。

プロポフォールにより Nrf2 の下流因子である H0-1 および Nqo-1 の発現も亢進する。

プロポフォールの細胞保護効果は Nrf2 が関与していることが示唆される。

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 1 件)

Propofol induces nuclear localization of Nrf2 under conditions of oxidative stress in cardiac H9c2 cells

Takeaki Shinjo, Tatsuhide Tanaka, Hiroaki Okuda, Akira T. Kawaguchi, Kentaro Ohhashi, Yuki Terada¹, Ayami Isonishi, Shoko Morita-Takemura, Kouko Tatsumi, Masahiko Kawaguchi, Akio Wanaka
PLoS One. 2018 Apr 24;13(4)

[学会発表](計 1 件)

プロポフォールは、酸化ストレス条件下で Nrf2 の発現および核局在を誘導する

新城 武明、田中 達英、寺田 雄紀、川口 昌彦、和中 明生

日本麻酔科学会 第 65 回学術集会 (2018)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新城 武明 (SHINJO, TAKEAKI)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：70624914

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()