

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20063

研究課題名(和文)代謝モード解析を基軸とした麻酔薬が膵細胞のインスリン分泌へ与える影響の研究

研究課題名(英文) Study of the influence that the anesthetic which assumed metabolism mode analysis a key gives to the insulin secretion of pancreas beta cell

研究代表者

鈴木 堅悟 (Suzuki, Kengo)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90734658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔薬がglucose stimulated insulin secretion(GSIS)を抑制するメカニズムを明らかにするために行われた。マウスインスリンノーマ細胞株のMIN6を使用してGSISを確認する実験系を確立した。ブドウ糖の消費による低酸素はイソフルランとセボフルランにより抑制された。ミトコンドリアが酸素消費すると細胞内低酸素になり、HIF-1が活性化します。HIF-1の活性化もイソフルランとセボフルランにより抑制された。それにより細胞内のATPの上昇が抑制され、インスリンの分泌が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Several animal and human studies have indicated that volatile anesthetics impair glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Isoflurane and sevoflurane inhibited GSIS significantly in a concentration-dependent manner. Oxygen consumption rate in MIN6 cells but to a lesser extent than the mitochondrial uncoupler, CCCP (5 M). Isoflurane and sevoflurane significantly suppressed glucose-induced HIF-1alpha protein expression in MIN6 cells. HIF-1alpha protein expression, which was not affected by isoflurane. Inhibition of HIF-1 activity by YC-1 treatment and RNA interference-mediated knockdown of HIF-1alpha expression significantly suppressed GSIS in MIN6 cells. Both the anesthetics inhibited the glucose-induced increase of ATP, which is dependent on intracellular hypoxia-induced HIF-1 activity, and suppressed GSIS at a clinically relevant dose in MIN6 cells.

研究分野：麻酔

キーワード：HIF-1 インスリン セボフルラン イソフルラン

## 様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身麻酔は患者の耐糖能に影響を及ぼすことが知られている。従来、その機序はヒトや実験動物を主に用いて検証されてきたが、インスリン分泌細胞である膵細胞への麻酔薬の作用以外の様々な要因を除外できないなどグルコース応答性インスリン分泌反応 (glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) の基礎的な機序の解明のためには問題点を抱えていた。適切な樹立細胞株を用いれば研究遂行上の困難が克服されると考えられる。グルコース刺激にตอบสนองしてミトコンドリアにおける酸素消費量が高まり細胞内低酸素状態に陥りこれにตอบสนองして低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) が活性化して細胞内の代謝モードが好氣的なものから嫌氣的へとリプログラミングされるといふ現象が報告されている。以上からマウスインスリンノーマ由来樹立細胞株 MIN6 細胞を使用し、*in vitro* における膵細胞のインスリン分泌機構に対する麻酔薬の作用を解析する実験系の確立を目指し、GSIS のプロセスのうち ATP 産生における細胞内代謝リプログラミングに麻酔薬が HIF-1 を介していかに関与しているかを分子生物学的手法で検証するという研究を着想した。

### 2. 研究の目的

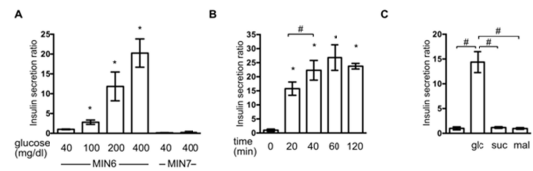
マウスインスリンノーマ由来樹立細胞株 MIN6 細胞を使用し、*in vitro* における膵細胞のインスリン分泌機構に対する麻酔薬の作用を解析する実験系の確立を目指し、GSIS のプロセスのうち ATP 産生における細胞内代謝リプログラミングに麻酔薬が HIF-1 を介していかに関与しているかを分子生物学的手法で検証する

### 3. 研究の方法

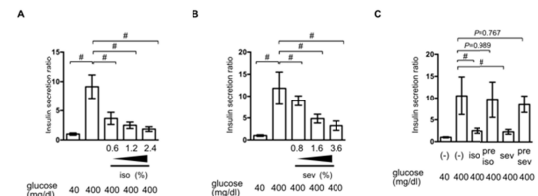
MIN6 におけるグルコース応答性インスリン分泌反応 (glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)) 実験系の確立。  
インスリンは ELISA 法で測定。HIF-1 は Western Blot 法で測定。酸素消費量は Oxytherm electrode unit で測定。RNA は rt-PCR 法で測定。  
各種周術期使用薬剤が GSIS に与える影響の検討。

GSIS における酸素代謝・HIF-1 活性化の変化の検討。

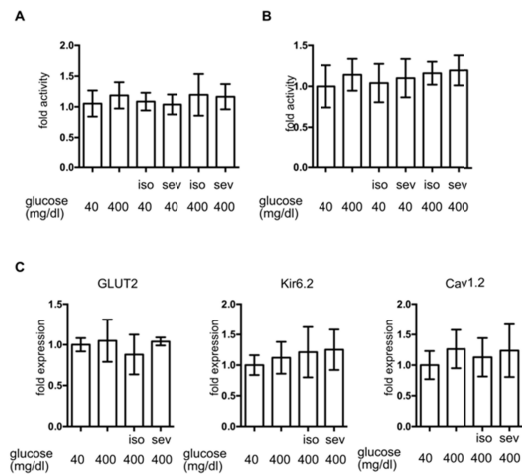
### 4. 研究成果



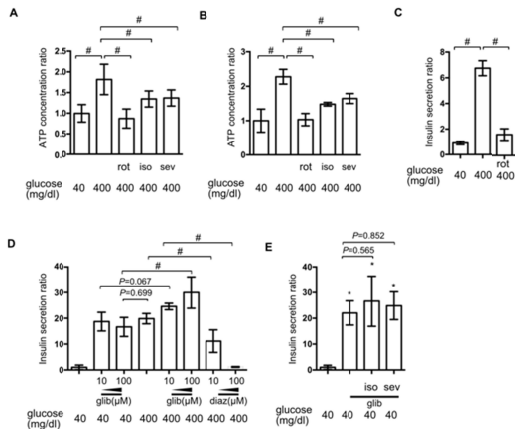
グルコース濃度依存性にインスリン分泌量が増加した。インスリンは 40 分後に分泌量が最大となった。多糖類ではインスリン分泌量は増加しなかった。



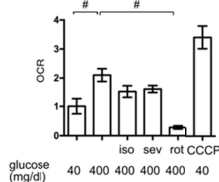
セボフルランとイソフルランは濃度依存性に GSIS を抑制した。また、セボフルランとイソフルランを除去すれば GSIS は回復することを示唆した。



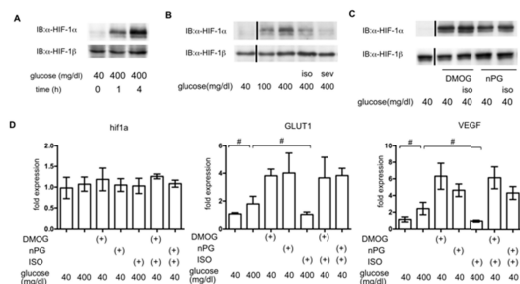
セボフルランとイソフルランは細胞死や細胞増殖を引き起こす効果がないことを示した。GSIS とセボフルランとイソフルランは GLUT2、Kir6.2、Cav1.2 の mRNA の発現に影響を与えなかった。



セボフルランとイソフルランは細胞内 ATP 濃度を減少させることを示した。電子伝達系阻害薬ロテノンの投与でも GSIS は抑制された。ATP の細胞内濃度上昇を感知して K-ATP チャンネルが閉じて細胞膜の脱分極が起き、Ca<sup>2+</sup> チャンネル開いて Ca<sup>2+</sup> イオンが細胞内に流入し、インスリン分泌が起きることが先行論文で示されている。K-ATP チャンネルクローザーのグリベンクラミドを投与するとインスリン分泌が起きることが確認された。セボフルランとイソフルランはグリベンクラミドによるインスリン分泌反応を抑制しなかった。

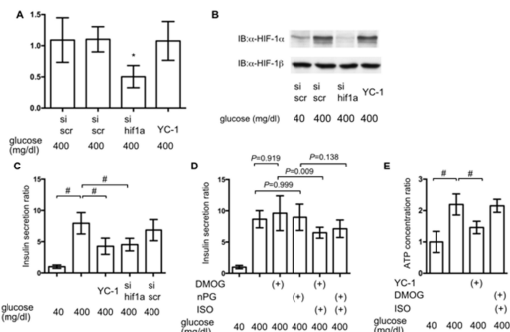


GSIS は酸素消費量を増加させる。セボフルランとイソフルランは GSIS の酸素消費量を抑制する。

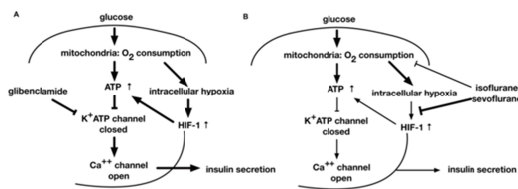


GSIS により、HIF-1 タンパクが蓄積されることが示された。セボフルランとイソフルランは GSIS による HIF-1 タンパクの発現を抑制した。また、セボ

フルランとイソフルランは GSIS による HIF-1 の下流遺伝子である GLUT1 や VEGF の mRNA の発現を抑制した。



HIF-1 阻害剤の YC-1、HIF-1 siRNA でインスリンの分泌量は減少した。HIF-1 分解阻害剤の DMOG、nPG を添加するとイソフルランはインスリンの分泌を抑制しなかった。HIF-1 分解阻害剤の DMOG、nPG を添加するとイソフルランは HIF-1 の発現を抑制しなかった。



グルコース刺激による HIF-1 の活性化を抑制することでセボフルランとイソフルランが膵細胞の GSIS を抑制するパスウェイの存在が示された。

## 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 1 件)

Volatile anesthetics suppress glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells by inhibiting glucose-induced activation of hypoxia-inducible factor 1

Kengo Suzuki, Yoshifumi Sato, Shinichi Kai, Kenichiro Nishi, Takehiko Adachi, Yoshiyuki Matsuo and Kiichi Hirota

査読あり

発行年: 2015 年 12 月 10 日

doi: 10.7717/peerj.1498

研究者番号：

〔学会発表〕（計 1 件）  
イソフルランはグルコース刺激による細胞内低酸素依存性の HIF-1 の活性化を抑制することで膵細胞の glucose-stimulated insulin secretion を抑制する Isoflurane suppresses glucose-stimulated insulin secretion of the pancreatic beta cells MIN6 by inhibiting HIF-1 activation elicited by intracellular hypoxia following high glucose stimulation

鈴木堅悟  
日本麻酔科学会第 62 回学術集会、神戸国際展示場、2015 年 5 月 29 日

〔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

鈴木 堅悟 (SUZUKI KENGO)  
京都大学・医学研究科 助教  
研究者番号：90734658

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )