

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10929

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来心筋細胞・肝細胞を用いた高濃度プロポフォールの毒性評価

研究課題名(英文) Cytotoxicity of propofol in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and hepatocytes

研究代表者

木戸 浩司 (Kido, Koji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60772621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プロポフォール注入症候群は、同薬の過量投与で起こる致死的な病態である。そのメカニズムを明らかにするため、ヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来心筋細胞・肝細胞を用いてプロポフォール高用量・長時間曝露による影響を検討した。これらの細胞に対し、プロポフォールを48時間曝露した後、細胞傷害に関する指標、エネルギー代謝関連の指標の測定と関連遺伝子の発現を検索するため、PCR-Arrayを施行した。プロポフォールの高容量・長時間曝露により、心筋細胞および肝細胞において、オートファジー反応の増加を伴う細胞死が認められ、原因の一つとして呼吸鎖タンパク遺伝子の発現低下を伴うミトコンドリア機能の低下が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロポフォール注入症候群は、同薬の過量投与で起こる致死的な病態である。これまで、そのメカニズムは明らかでなかった。本研究では、ヒト人工多能性幹細胞(iPSC)由来心筋細胞・肝細胞を用いて高濃度のプロポフォールが起こす細胞毒性について調べたところ、臨床濃度をはるかに超える高濃度のプロポフォールは、呼吸鎖タンパク遺伝子の発現低下を伴うミトコンドリア機能の低下を引き起こし、細胞の活性を低下につながることを示された。本研究では、コエンザイムQ10など、ミトコンドリア呼吸鎖の機能維持につながる介入をすることで細胞活性の低下が起こりにくいことも示され、治療的アプローチのきっかけになることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Propofol infusion syndrome (PRIS) is a lethal condition caused by propofol overdose. Previous studies suggest that pathophysiological mechanisms underlying PRIS involve mitochondrial dysfunction; however, these mechanisms have not been fully elucidated. This study aimed to establish an experimental model of propofol-induced cytotoxicity using cultured human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocytes to determine the mechanisms behind propofol-induced mitochondrial dysfunction.

Human iPSC-derived cardiomyocytes and hepatocytes were exposed to propofol. High concentrations of propofol induced mitochondrial dysfunction accompanied by downregulation of gene expression of PGC-1alpha and its downstream targets (NDUFS8 and SDHB). Propofol-induced cytotoxicity in human iPSC-derived cardiomyocytes/hepatocytes may be associated with mitochondrial dysfunction via downregulation of PGC-1alpha-regulated genes associated with mitochondrial energy metabolism.

研究分野：麻酔学

キーワード：プロポフォール ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロポフォール注入症候群はプロポフォールの高用量長時間投与により誘発される致死性の合併症であり、心筋・肝臓・筋組織が障害される。その機序は必ずしも明らかでなく、致死的な経過に対して、対症療法でしか対応できず、近年においても死亡例が報告されている。我々は、最近、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞や肝細胞を用いた研究で、高濃度のプロポフォールによって、ATP 産生の減少を伴うミトコンドリア機能の低下が認められることを確認し、プロポフォール注入症候群の in vitro モデルとして活用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、この培養細胞系による実験モデルを確立し、プロポフォール注入症候群の発生機序・誘発因子の解明により、予防・治療的なアプローチのターゲットを見つけ出し、治療法の開発につなげることを目指している。

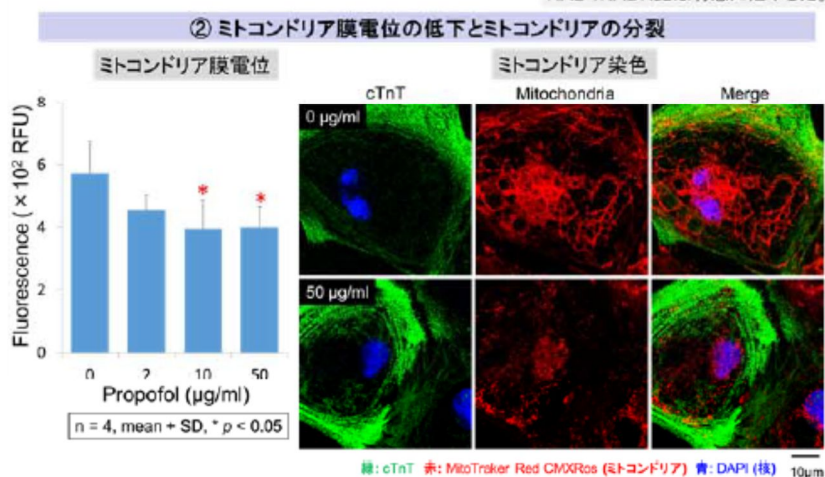
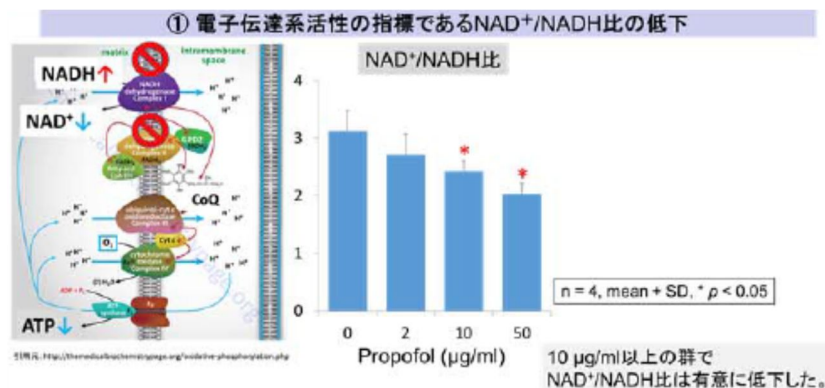
3. 研究の方法

ヒト iPSC 由来心筋細胞 (ReproCardio2[®], ReproCELL Inc) および肝細胞 (ReproHepato[®]ReproCELL Inc.) に対し、プロポフォール (0, 2, 10, 50 μ g/ml) を 48 時間曝露した後、細胞生存率およびミトコンドリア機能 (細胞内 ATP、NAD⁺/NADH 比、ミトコンドリア膜電位) に関して評価した (n = 4)。さらに、共焦点顕微鏡・透過型電子顕微鏡を用いて細胞内の形態を観察した。また、RT-PCR によってエネルギー代謝関連遺伝子の発現を検索した (n = 4-5)。プロポフォール製剤の特徴から、control 群を含む各投与群のトリグリセリド濃度を 500 μ g/mL に統一した。統計学的検討には Dunnett の多重比較検定を行い、P < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞を用いた検討

10 μ g/ml 以上の群において有意に、細胞生存率・ATP 産生・NAD⁺/NADH 比・ミトコンドリア膜電位の低下とオートファジー活性の上昇を認め、50 μ g/ml 群における細胞生存率は 20.7%低下した (P < 0.05)。



・ ミトコンドリア機能の活性を示すミトコンドリア膜電位も 10 μ g/ml 以上有意な低下を認めた。
・ ミトコンドリアを染色し観察すると、0 μ g/ml 群では糸状に伸びた細長いミトコンドリアが多数認められたのに対し、50 μ g/ml 群ではミトコンドリアが断片化し、膜電位の低下を反映して蛍光強度も低下しているように見えた。

また、ミトコンドリア呼吸鎖の構造タンパク遺伝子 (NDUFS8、SDHB) の有意な発現低下を認めた。プロポフォール 50 μ g/ml 群において、共焦点顕微鏡観察では多数のオートファジー空胞を認め、電子顕微鏡所見では、ミトコンドリアの分裂像、オートファゴソーム像、細胞質内の空胞を認めた。

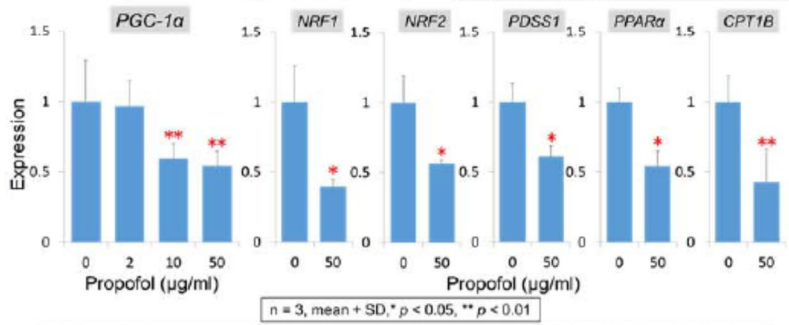
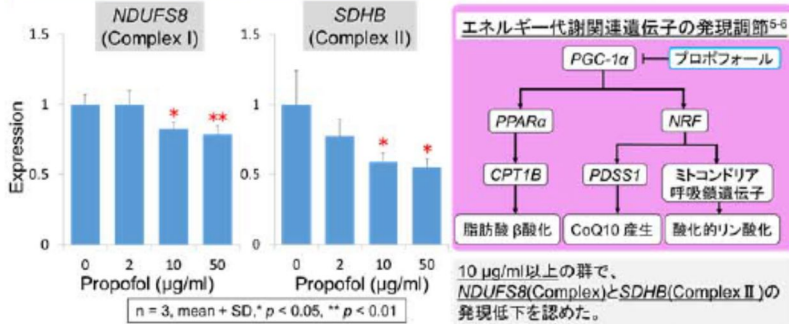
① PCR-Arrayによるミトコンドリア呼吸鎖の遺伝子発現変化のスクリーニング
50 µg/mlのプロポフォール曝露で発現低下したミトコンドリア呼吸鎖の構成蛋白をコードする遺伝子

Complex I	NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB9, NDUFB10, NDUFS3, NDUFS8 , NDUFV2, NDUFV3
Complex II	SDHB , SDHD
Complex III	UQCRC1, UQCRC2, UQCRFS1
Complex IV	COX4I1, COX4I2, COX8C
Complex V	ATP5G1, ATP6V0D2, OXA1L

n = 3, p < 0.05, vs 0 µg/ml

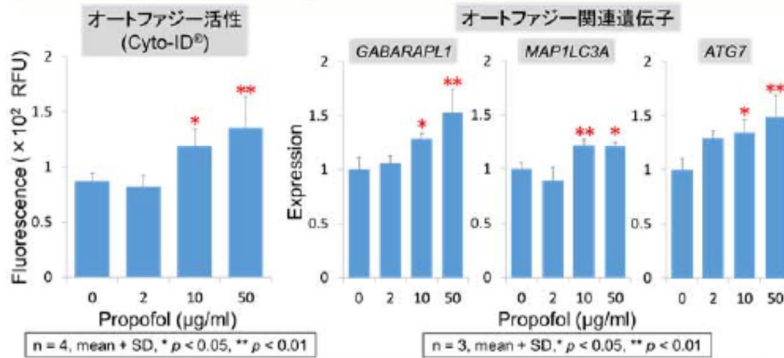
- スクリーニングされた遺伝子のうち、Complex I の *NDUFS8* と Complex II の *SDHB* に着目して、遺伝子発現変化の濃度依存性をリアルタイムPCRで調べることにした。

② リアルタイムPCRによるエネルギー代謝関連遺伝子の発現評価

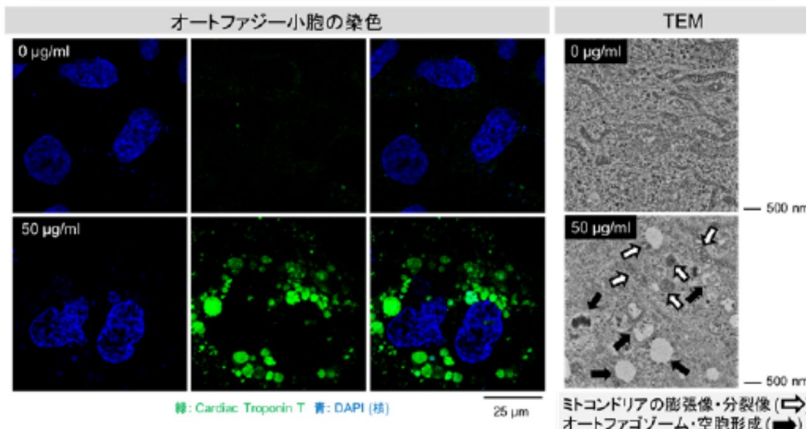


- 10 µg/ml以上の群で、ミトコンドリア呼吸鎖タンパクをコードする遺伝子の転写調節因子である *PGC-1alpha* の発現低下を認めた。
- PGC-1alpha* が調節する脂肪酸β酸化やCoenzyme Q10産生に関わる酵素の遺伝子も、50 µg/mlで発現低下を認めた。

オートファジーの活性化

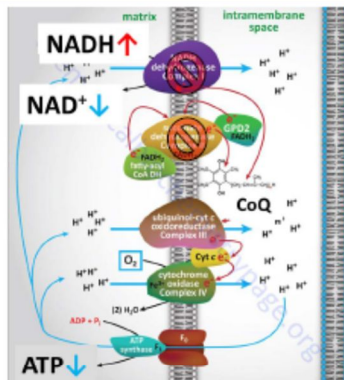
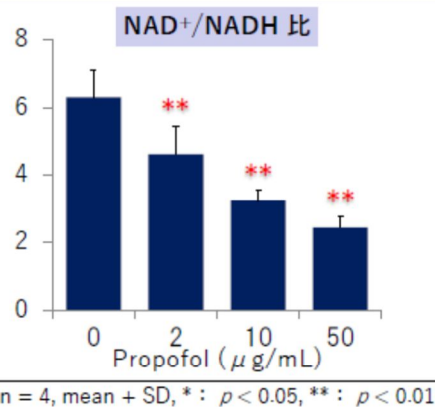


- 10 µg/ml以上の群でオートファジーの活性化が認められた。
- オートファジーは、ATPの低下に伴ってAMP依存性キナーゼ(AMPK)が活性化されることでその反応が進むとされるが、活性型AMPKについてもプロポフォールによる上昇傾向を認めた。
- 一方で、アポトーシスのマーカーであるCaspase 3/7は変化がなかった。



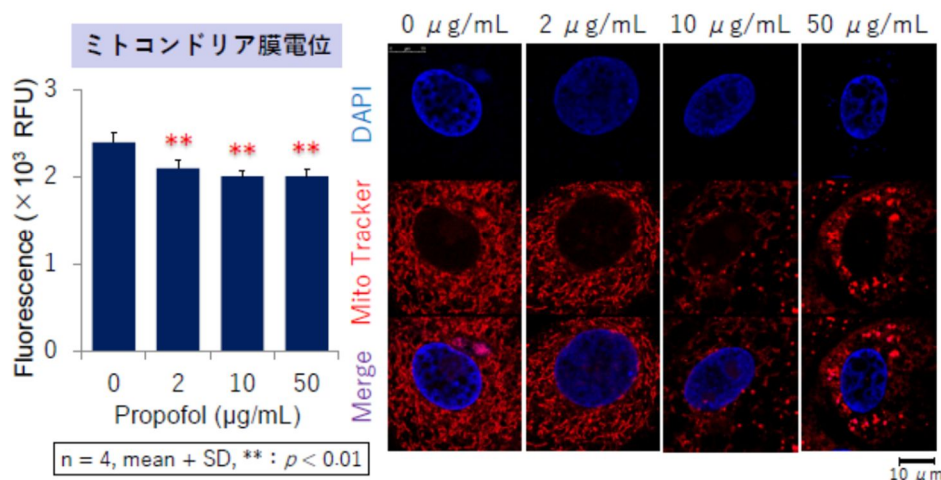
(2)肝細胞を用いた検討、
 2 $\mu\text{g/ml}$ 以上の群において、ATP・NAD⁺/NADH 比・ミトコンドリア膜電位の低下を有意に認め、
 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の群では細胞生存率が低下した。

① 電子伝達系活性の指標である NAD⁺/NADH 比の低下



- NAD⁺/NADH 比は、2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群で有意に低下(50 $\mu\text{g/mL}$ の群で 38.9 % 低下)した。

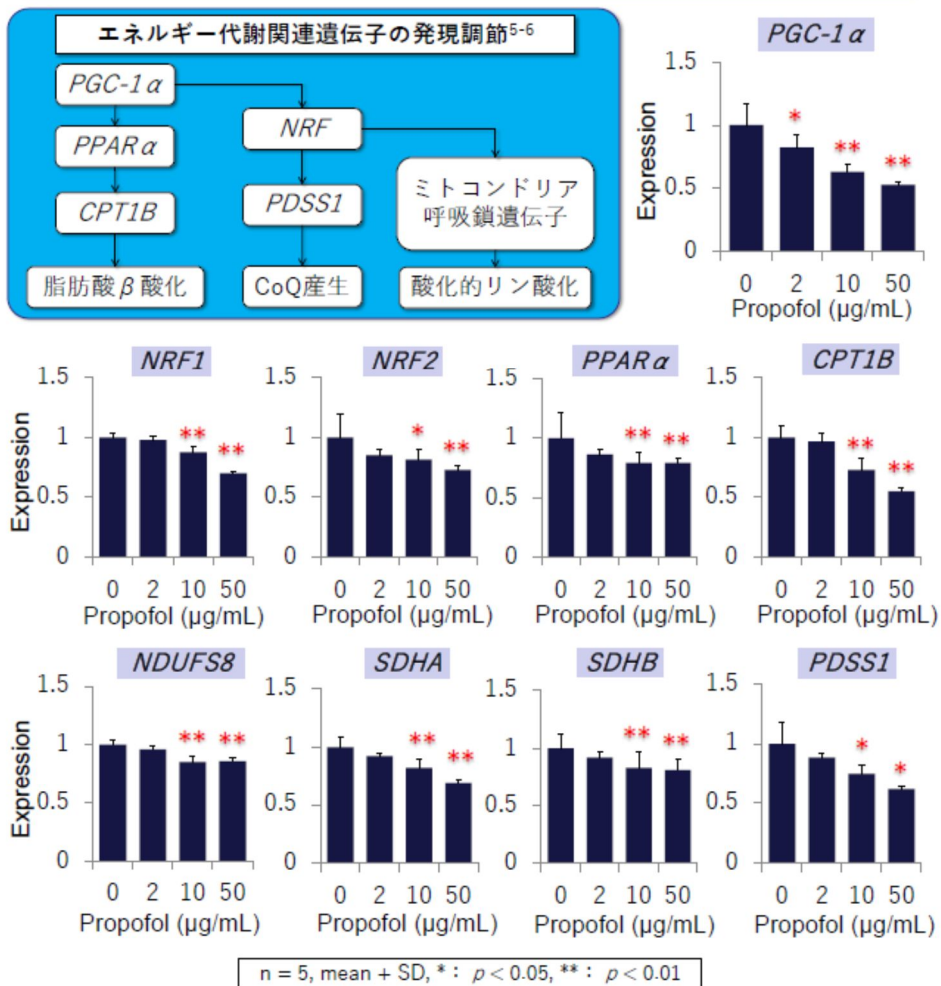
② ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアの分裂



- ミトコンドリア機能の活性を示すミトコンドリア膜電位は、2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の群で有意な低下(50 $\mu\text{g/mL}$ の群で 16.1 % 低下)を認めた。
- ミトコンドリアを染色し観察すると、0 $\mu\text{g/mL}$ 群では糸状に伸びた細長いミトコンドリアが多数認められたのに対し、50 $\mu\text{g/mL}$ 群ではミトコンドリアが断片化し、膜電位の低下を反映して蛍光強度も低下していた。

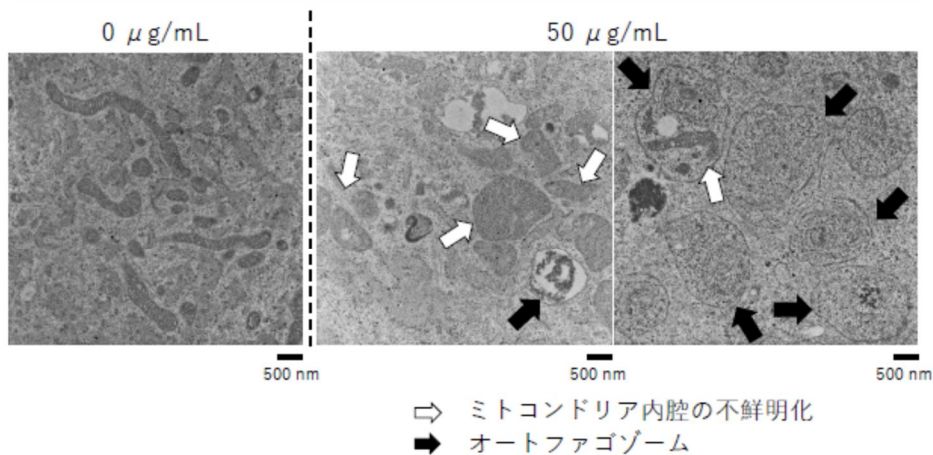
また、ミトコンドリア呼吸鎖の構造タンパク遺伝子(NDUFS8、SDHB)の発現低下を認めた。50 $\mu\text{g/ml}$ 群において、共焦点顕微鏡観察ではミトコンドリアの断片化を認め、電子顕微鏡所見では、ミトコンドリア内腔の不鮮明化やオートファゴソーム像を認めた

リアルタイム PCR によるエネルギー代謝関連遺伝子の発現評価



- 2 μg/mL 以上の群で、エネルギー代謝関連遺伝子の転写調節因子である *PGC-1α* の発現低下を認めた。
- *PGC-1α* が調節している、電子伝達系に関わるタンパクの発現を調節する *NRF* や脂肪酸β酸化に関わる遺伝子、また *NRF* が調節する *Coenzyme Q10* 産生に関わる遺伝子と、ミトコンドリア呼吸鎖タンパクをコードする遺伝子においては、10 μg/mL 以上の群で有意な発現低下を認めた。

オートファゴソームの形成



電子顕微鏡所見では、50 μg/mL の群において、control の群には見られない、ミトコンドリア内腔の不鮮明化やオートファゴソーム像を認めた。

プロポフォールの高用量・長時間曝露により、オートファジー反応の増加を伴う心筋細胞死が認められ、原因の一つとして呼吸鎖タンパク遺伝子の発現低下を伴うミトコンドリア機能の低下が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kido Koji, Ito Hiroyuki, Yamamoto Yudai, Makita Koshi, Uchida Tokujiro	4. 巻 32
2. 論文標題 Cytotoxicity of propofol in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 120 ~ 131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-017-2441-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本 始、木戸 浩司、内田 篤治郎、山本 雄大
2. 発表標題 ヒト人工多能性幹細胞由来肝細胞を用いた高濃度プロポフォル長時間投与の毒性評価
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木戸 浩司、内田 篤治郎、山本 雄大、榎田 浩史
2. 発表標題 プロポフォル高用量・長時間曝露によるヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞での毒性評価：プロポフォル注入症候群の病態機序の解明にむけて
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koji Kido., Hiroyuki Ito., Tokujiro Uchida
2. 発表標題 Protective Effects of Coenzyme Q10 on Cytotoxicity of Propofol in Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes
3. 学会等名 Anesthesiology 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Springer Link
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00540-017-2441-0>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	榎田 浩史 (Makita Koshi) (20199657)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	内田 篤治郎 (Uchida Tokujiro) (40262183)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	