

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18256

研究課題名（和文）ミトコンドリア機能解析を基軸としたプロポフォールの細胞毒性機構の分子生物学

研究課題名（英文）Molecular biology of the cytotoxic mechanism of propofol based on the analysis of mitochondrial function

研究代表者

角 千里 (SUMI, Chisato)

関西医科大学・医学部・研究医員

研究者番号：00580466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア電子伝達系の各複合体活性に依存した酸素消費量へのプロポフォールの影響を詳しく検討した。プロポフォールは細胞内の酸素消費を抑制し、細胞外の乳酸を増加させることが、また複合体I, II, IIIに依存した酸素消費を抑制するが複合体IV依存の酸素消費には影響を与えない事を確認した。プロポフォールの標的となる蛋白質の同定には至らなかったがミトコンドリア電子伝達系は細胞障害においてプロポフォールの標的となる事を示す実験的なエビデンスは得られた。

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 (PRIS) の病態の分子機序の解明は麻酔科学の大きな課題の一つである。病態生理学から推察されるように細胞の代謝異常や細胞死が発症の細胞学的基盤にあると考えられるが、いまだに病態の分子機構の詳細や発症予測因子・治療法の同定には至っていない。疫学的に頻度は低いものの患者予後に甚大な悪影響を及ぼすPRISの病態生理の解明は麻酔・集中治療学の研究分野が克服すべき課題の一つであり研究の波及効果は大きい社会的意義も同時にある。

研究成果の概要（英文）：We found that propofol suppressed intracellular oxygen consumption and increased extracellular lactate. In addition, it inhibits complex I, II, and III dependent oxygen consumption but does not affect complex IV dependent oxygen consumption. Although we were not able to identify the target proteins of propofol, we obtained experimental evidence that the mitochondrial electron transport system is a target of propofol in cytotoxicity.

研究分野：麻酔科学

キーワード：プロポフォール プロポフォール注入症候群 ミトコンドリア ROS 低酸素誘導性因子1 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロポフォル(propofol, 2,6-diisopropylphenol)は患者管理に必須な薬剤であるが PRIS(プロポフォル注入症候群, propofol infusion syndrome)と呼ばれる致死性な副作用をまれに惹起することが知られており臨床使用上の問題となっている。病態生理学から推察されるように細胞の代謝異常や細胞死が発症の細胞学的基盤にあると考えられるが、いまだに病態の分子機構の詳細や発症予測因子・治療法の同定には至っていない。報告者はこれまでプロポフォルの細胞毒性の研究を行ってきて、プロポフォルがミトコンドリアを標的として作用して細胞内酸素代謝を攪乱して細胞死を引き起こすことを筋肉を含む複数の組織由来の細胞を用いて明らかにしてきた。特筆すべきは様々なタイプのミトコンドリア遺伝子の変異体を細胞質移植法を用いて細胞に導入した transmitochondrial cybrids 細胞(Cybrids 細胞)を用いてプロポフォルが細胞の有酸素・無酸素代謝のモード変換に与える影響と細胞の生死に与える影響を明らかにした事でありこれによりプロポフォルの細胞毒性がミトコンドリアの電子伝達系に依存する事が証明された。さらに細胞内のエネルギー代謝を司る転写因子 HIF-1(hypoxia-inducible factor 1)の強制的な活性化がミトコンドリア機能の調節を介してプロポフォル毒性を軽減する事を示した。

この成果に立脚し研究を前進させ、プロポフォルの細胞毒性発揮に関わる分子機序の追究・細胞障害時の標的分子の同定を視野に入れ本研究の research question とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子生物学的な手法を用いてミトコンドリア内のプロポフォルの標的分子を明らかにする事、酸素代謝・エネルギー代謝を司るミトコンドリア機能へのプロポフォルの影響を細胞内の ATP 動態を細胞質、核、ミトコンドリアなどの各コンパートメント別に可視化と共に明らかにする事であった。

この目的の達成のため、細胞外フラックスアナライザー、共焦点レーザー走査型顕微鏡を援用した生細胞内の ATP 濃度をリアルタイムに可視化できる蛍光プローブ ATeam、RNA 干渉法、CRISPR-Cas9 システムを含んだ遺伝子発現制御法を駆使して研究を遂行する。具体的には以下の項目である。

- (1) プロポフォルが酸素代謝・エネルギー代謝へ及ぼす影響の検討
- (2) プロポフォルによる細胞障害のハイスループットアッセイ法の確立
- (3) プロポフォルの標的となる蛋白質の同定と発現調節による酸素代謝・エネルギー代謝への影響の検討

3. 研究の方法

- (1) フローサイトメトリー(FACS)やカスパーゼ活性を用いた細胞死の測定系
 - (2) 細胞外フラックスアナライザー(XFp Agilent Technologies 社製 研究機関に配備済み)を用いた細胞酸素消費量測定(oxygen consumption rate, OCR)、細胞外酸性化速度測定(extracellular acidification rate, ECAR)(乳酸産生の代理マーカー)系
 - (3) Ateam を持った細胞内 ATP 濃度のライブ測定系
 - (4) プロポフォルが酸素代謝・エネルギー代謝へ及ぼす影響の検討: 細胞内 ATP 濃度とその分布、細胞酸素消費量、細胞外の乳酸・ビルビン酸を測定
 - (5) プロポフォルによる細胞障害のハイスループットアッセイ法の確立
- プロポフォルは用量依存的にアポトーシスとネクローシスを惹起することが判明している。25-50 μM のプロポフォルは caspase9, caspase3/7 の活性化を介してアポトーシスを引き起こす。このアポトーシスを効率よく検出する実験系を構築する。カスパーゼ 3/7 の酵素活性化を蛍光で検出する測定系(蛍光プレートリーダー-Enspire は研究機関に配備済み)を用いて 96well で効率よくアッセイする。この方法で検出したアポトーシスはフローサイトメトリー(FACSCalibur ベクトンディッキンソン社, 研究機関に配備済み)を用いて蛍光標識した annexin-V との結合で初期アポトーシスの検出、同時に propidium iodide を用いて後期アポトーシスまたはネクローシスの検出を行い確認する。
- (6) プロポフォルの標的となる蛋白質の同定と発現調節による酸素代謝・エネルギー代謝への影響の検討

報告者らの先行研究によりプロポフォルがミトコンドリア機能、特に電子伝達系を抑制することが明らかになっている。本検討でその標的分子の同定を試みる。

ミトコンドリア蛋白質はミトコンドリア DNA 由来のものと核 DNA 由来のものに分類される。核 DNA 由来の電子伝達系の各複合体の構成遺伝子を選択して siRNA(RNA 干渉法)を用いた発現抑

制を行う。

4．研究成果

細胞外フラックスアナライザーと神経由来の細胞株を用いて細胞の酸素代謝、ブドウ糖代謝をアッセイする実験系を確立した。この実験系を用いてミトコンドリア電子伝達系の各複合体活性にプロポフォルが及ぼす影響を検討した。ポジティブコントロールとして各複合体特異的な阻害薬を用いた。この結果プロポフォルは複合体 I, II, III に依存した酸素消費を抑制するが複合体 IV 依存の酸素消費には影響を与えないことが判明した。さらにこの観察事実はミトコンドリア DNA 変異を持つ transmitochondrial cybrids 細胞を用いた実験でも確認できた。さらに細胞内の ATP 動態を細胞質、核、ミトコンドリアなどの各コンパートメント別に可視化と共に明らかにする目的で生細胞内の ATP 濃度をリアルタイムに可視化できる蛍光プローブ ATeam を構成的に発現する細胞株を樹立した。しかしこの実験系では最終的に確実な研究成果が得られなかった。今後の課題となる。

プロポフォルの標的となる蛋白質の同定には至らなかった。これらによりミトコンドリア電子伝達系は細胞障害の文脈においてプロポフォルの標的となる事を示す実験的なエビデンスは得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 T. Shoji, M. Hayashi, C. Sumi, M. Kusunoki, T. Uba, Y. Matsuo, H. Kimura, K. Hirota	4. 巻 9
2. 論文標題 Pharmacological polysulfide suppresses glucose-stimulated insulin secretion in an ATP-sensitive potassium channel-dependent manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 19377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55848-7	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 -

1. 著者名 M. Kusunoki, M. Hayashi, T. Shoji, T. Uba, H. Tanaka, C. Sumi, Y. Matsuo, K. Hirota	4. 巻 7
2. 論文標題 Propofol inhibits stromatocystin-1-sensitive voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta-cells and enhances insulin secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e8157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.8157	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 -

1. 著者名 C. Sumi, Y. Matsuo, M. Kusunoki, T. Shoji, T. Uba, T. Iwai, H. Bono, K. Hirota	4. 巻 14
2. 論文標題 Cancerous phenotypes associated with hypoxia-inducible factors are not influenced by the volatile anesthetic isoflurane in renal cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0215072	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角 千里、岡本 明久、楠 宗矩、正司 智洋、右馬 猛生、廣田 喜一
2. 発表標題 プロポフォールはミトコンドリアの電子伝達系を介して代謝を解糖系にシフトさせ細胞死を誘導する
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------