

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591741

研究課題名（和文） プロポフォールによるアディポネクチン分泌低下の機序とインスリン抵抗性への関与

研究課題名（英文） Mechanisms of the inhibition effects of propofol on adiponectin secretion and its role of insulin resistance

研究代表者

上村 裕一(KANMURA YUICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30211189

研究成果の概要(和文)：

脂肪細胞から分泌されるホルモンであるアディポネクチンに対する静脈麻酔薬プロポフォールの作用機序を検討した。培養脂肪細胞とラットを用いた実験でプロポフォールがアディポネクチン分泌を抑制することが確認された。さらにその抑制機序を検討し、プロポフォールの麻酔作用機序である GABA 受容体活性化を介することなく、直接脂肪細胞の JNK リン酸化を促進することによりアディポネクチン分泌を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We investigated the effects and mechanisms of propofol, an intravenous anesthetics, on adiponectin, which is the protein hormone secreted from adipose tissue. Propofol dose-dependently inhibited the secretion of adiponectin from cultured adipose cells, and also lowered the concentrations of adiponectin in the rats in vivo. We investigated the mechanisms of this inhibitory effects, and found that propofol directly enhanced the phosphorylation of JNK in adipose cells and inhibited the secretion of adiponectin, not by the activation of GABA receptor, which is the main target of propofol anesthetic action.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学、アディポネクチン、プロポフォール、インスリン

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は単なる余剰なエネルギーの貯蔵組織というだけでなく、さまざまな生理活性を有するホルモン、サイトカイン等を放出する内分泌臓器の一つであることが明らかになってきている。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一つであり、分泌低下によりインスリン抵抗性、血管内皮障害、炎症反応等を惹起すると報告されている。糖代謝においては、アディポネクチンは、骨格筋や肝臓内 MAP キナーゼを活性化することで糖取り込みを促進し、糖新生を抑制すると報告されている。しかしながら、全身麻酔時のアディポネクチン分泌動態の詳細な報告はなく、全身麻酔薬による分泌動態への影響も不明である。

一方で全身麻酔下の手術中には、糖尿病を合併していない患者においても血糖値の上昇を来することがあり、外科的糖尿病として広く知られている。近年、高血糖は炎症時のサイトカイン誘導を促進する nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) や activator protein 1 (AP-1) を活性化させると報告されており、手術侵襲による炎症反応を増悪させる可能性もあるため、術中には積極的な血糖コントロールが必要とされる。術中高血糖の原因としては、手術侵襲による交感神経の賦活化、糖新生ホルモン(グルカゴン、アドレナリン、ステロイド、成長ホルモン)の分泌促進に加え、全身麻酔薬によるインスリン分泌抑制、及びインスリン感受性の低下であるインスリン抵抗性の増強などがある。

プロポフォールは調節性の良さや吸入麻酔薬の環境(手術室、地球汚染)に及ぼす影響などから広く使用されるようになってきており、全身麻酔の主流は従来の吸入麻酔法からプロポフォールを使用した全静脈麻酔法へと変更されつつある。しかしながらプロポフォールの糖代謝への影響については依然として不明な点が多い。申請者らはこれまで *in vivo* 及び *in vitro* の基礎実験系において、プロポフォールがアディポネクチンの分泌を抑制することを確かめた。

手術中に生じる高血糖の一因として、麻酔薬プロポフォールによるアディポネクチン分泌抑制の関与を明らかにすることは、周術期の血糖コントロールを検討していく上で臨床的意義が深い、と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、静脈麻酔薬プロポフォールによるアディポネクチンの分泌抑制がインスリン抵抗性を惹起している可能性を検討するのを目的とした。

また、これまでの知見を基に本研究においては、プロポフォールのアディポネクチン分泌抑制の機序を遺伝子発現レベル、細胞内シグナル及び受容体の関与について検討することとした。また動

物実験系で骨格筋、肝臓といった組織レベルにおいて、アディポネクチン低下がインスリン抵抗性に関与している可能性についても合わせて検討する方針とした。

### 3. 研究の方法

本研究は3年間の研究期間で、培養脂肪細胞を用いた *in vitro* 実験モデル、及び動物を用いた *in vivo* 実験モデルにおいて、プロポフォールによるアディポネクチンの発現及び分泌の抑制、分泌低下の機序における脂肪細胞内伝達シグナルと受容体の関与、分泌低下によって生じる組織内 AMP キナーゼ活性低下のインスリン抵抗性への関与を明らかにするための実験を行った。

#### (1) *in vitro* 実験

##### ①培養脂肪細胞における、プロポフォールのアディポネクチン分泌、発現への影響の検討

ラット由来培養脂肪細胞 3T3L1 を、培養液を用いて増殖させ、細胞増殖後、分化メEDIUMを使用して分化脂肪細胞とした後、細胞内に脂肪滴が充満し成熟脂肪細胞まで、約6~8日間適宜メEDIUM交換を施行しながら維持した。プロポフォール(試薬名;2,6-diisopropylphenol)による濃度依存性のアディポネクチン分泌抑制効果を検討するために、プロポフォール(20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M)を添加し、6時間、12時間、24時間後における培養液上清を採取し、上清中のアディポネクチン濃度をELISA測定キットにて測定し、非プロポフォール添加群(対照群)と比較検討した。

また、培養脂肪細胞上でのアディポネクチン遺伝子発現レベルを検討した。プロポフォール300  $\mu$ M添加群と非添加群において、1時間、2時間後の脂肪細胞を採取し、RT-PCR法を用いてアディポネクチン mRNA の測定を行った。

##### ②アディポネクチン分泌抑制メカニズムにおける細胞内シグナルの関与の検討

前述の方法で培養した成熟脂肪細胞において、プロポフォール300  $\mu$ Mを添加し1時間後、2時間後における脂肪細胞を採取し、ウェスタンブロッティング法を用いて、脂肪細胞内の代表的伝達シグナルであるERK、JNK、P-38のリン酸化を測定し、非添加群(対照群)と比較検討した。プロポフォールによるアディポネクチン分泌低下を、ERK、JNK、P-38の拮抗薬をそれぞれ添加した群と比較し、いずれのシグナルが関与しているかを検討した。

##### ③アディポネクチン分泌抑制メカニズムにおける受容体の関与の検討

プロポフォールは中枢神経系においては、主にGABA受容体を介して麻酔作用を発揮するとされているが、脂肪細胞表面にもGABA受容体が存在していることが近年報告されている。したがって、脂肪細胞においてもプロポフォールがGABA受容体に結合して作用発現している可能性は高く、GABA受容体拮抗薬であるビククリンプロポフ

オールに添加した群とプロポフォル単独群(対照群)との間で、アディポネクチン分泌及び発現を比較し、GABA 受容体の関与を検討した。

具体的には、プロポフォルによるアディポネクチンの分泌低下が、発現レベルで抑制されているのか、分泌レベルで抑制されているのかを検討した。また分泌抑制において細胞内シグナルの関与についても研究した。さらに、これらの一連の反応が脂肪細胞表面の GABA 受容体を介したものであるかについても検討した。

#### (2) in vivo 動物実験

プロポフォル全身投与によりアディポネクチンが分泌低下することで、臓器、組織レベルにおいて糖代謝にどのような影響を及ぼすかを、ラットを用いて検討する。

SD ラットにプロポフォル 100mg/kg を腹腔内投与し、対照群にはイントラリットを同量腹腔内投与する。投与 4 時間、8 時間後におけるラット血清アディポネクチン濃度を測定し、両群間で比較検討する。また同時に骨格筋、脂肪組織、肝臓を摘出し、組織内 AMP キナーゼのリン酸化活性をウエスタンブロッティング法にて、AMP キナーゼ mRNA 発現を RT-PCR 法にて測定する。

#### (3) オレキシシに関する in vivo 動物実験

オレキシシはアディポネクチンと同様に肥満に関係し、また睡眠覚醒サイクルを制御することが知られ、全身麻酔への関与が示唆されている。動物研究において全身麻酔からの覚醒を促進することも報告されているが、ヒトでの作用は明らかではない。オレキシシは多様な機能をもつが、アディポネクチンと同様にインスリン分泌、体温調節にも関与することが報告されている。そこで、本研究ではオレキシシの体温と麻酔覚醒の関係についても検討した。

オレキシシニューロン破壊マウスと野生型マウスにおいて、全身麻酔 100%酸素下 1.5%イソフルラン吸入 30 分間行い、体温と自発運動を連続測定した。体温は腹腔内プローブからテレメトリで、自発運動は赤外線センサで測定した。麻酔導入、覚醒時間は、自発運動の消失、再開で判定した。

### 4. 研究成果

#### (1) in vitro 実験

##### ①培養脂肪細胞における、プロポフォルのアディポネクチン分泌、発現への影響の検討

プロポフォルのアディポネクチンの分泌動態への関与について検討した。培養脂肪細胞 3T3L1 において、プロポフォル 100  $\mu$ M、200  $\mu$ M の添加では培養液中アディポネクチン濃度が有意に低下しており、また PCR 法で測定したアディポネクチン mRNA の発現も有意に低下していた。このことからプロポフォルはアディポネクチンの発現及び分泌を抑制すると考えられた。

##### ②アディポネクチン分泌抑制メカニズムにおける細胞内シグナルの関与の検討

プロポフォル添加 2 時間後の脂肪細胞内の伝達シグナル (ERK, JNK, p-38) のリン酸化をウエスタンブロッティング法を用いて測定したところ、非添加群と比較して有意にリン酸化が促進していた。またプロポフォル添加による培養液中のアディポネクチン濃度低下は、ERK, p-38 の拮抗薬の前投与では抑制されなかったのに対して、JNK の拮抗薬の前投与では抑制された。したがってプロポフォルは脂肪細胞内の抑制系伝達シグナルである ERK, JNK, P-38 のいずれも作用を促進させるが、このなかで JNK のリン酸化がアディポネクチン分泌抑制に強く関与していると考えられた。

##### ③アディポネクチン分泌抑制メカニズムにおける受容体の関与の検討

プロポフォルは主に GABA 受容体を介して麻酔作用を発現するが、GABA 受容体拮抗薬ピククリン添加では、プロポフォルによるアディポネクチン分泌低下は抑制されなかった。したがって、脂肪細胞においては GABA 受容体を介していないと考えられた。アディポネクチンはその分泌低下により、骨格筋、肝臓、脂肪における糖取り込みを低下させるインスリン抵抗性を惹起させると報告されている。また手術中には血糖値は上昇しやすく、高血糖は種々の合併症を誘発すると報告されている。この研究により、全身麻酔薬プロポフォルがアディポネクチン分泌を抑制することが示され、このことが術中高血糖の一因となっている可能性が示された。

#### (2) in vivo 動物実験

プロポフォル全身投与によりアディポネクチンの分泌が低下することが確認されたので、臓器、組織レベルにおいて糖代謝にどのような影響を及ぼすかを、ラットを用いて検討を開始している。SD ラットにプロポフォル 100mg/kg を腹腔内投与し、対照群にはイントラリットを同量腹腔内投与した。投与 4 時間、8 時間後におけるラット血清アディポネクチン濃度を測定し、両群間で比較検討しているが、未だ有意な結果は出ていない。また、今後摘出した骨格筋、脂肪組織、肝臓を用いて、組織内 AMP キナーゼのリン酸化活性、AMP キナーゼ mRNA 発現を検討する予定である。

#### (3) オレキシシに関する in vivo 動物実験

アディポネクチンに関する研究に加え、24 年度はアディポネクチンと同様に肥満に関連した生体内物質であるオレキシシの作用についても研究を開始した。アディポネクチンと同様にオレキシシは体温調節にも関与するが、体温と麻酔からの覚醒に影響を与える可能性について、オレキシシニューロン破壊マウスと野生型マウスを用いて、吸入麻酔下での体温調節、麻酔からの覚醒の差異について、研究を行った。

全身麻酔中体温を維持した場合、オレキシンニューロン破壊マウスと野生型マウスの体温、自発運動、導入、覚醒時間に差は認められなかった。体温変動を許容した場合、オレキシンニューロン破壊マウスにおいて麻酔による体温低下が著明であり長く持続した。覚醒時間もオレキシンニューロン破壊マウスでは著明に延長し、野生型マウスでは延長しなかった。

これらの結果から、オレキシンは体温管理だけでなく麻酔覚醒にも関連していることが見出された。

## 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3件)

(1)Kuroki C., Takahashi Y., Ootsuka Y., Kanmura Y., Kuwaki T. The impact of hypothermia on emergence from isoflurane anesthesia in orexin neuron-ablated mice. *Anesthesia & Analgesia* 2013;116:1001-1005 査読有 doi: 10.1213/ANE.0b013e31828842f0.

(2)Hasegawa-Moriyama M., Ohnou T., Godai K., Kurimoto T., Nakama M., Kanmura Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012;426:76-82 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.039.

(3)Moriyama T., Tsuneyoshi I., Kanmura Y. Effects of a novel benzodiazepine derivative, JM-1232(-), on human gastroepiploic artery in vitro. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2010;25:72-77 査読有 doi:10.1053/j.jvca.2010.03.013.

[学会発表] (計2件)

(1)Yoshikawa, M. Hasegawa-Moriyama, C. Kuroki, K. Godai, K. Enohata, A. Matsunaga, Y. Kanmura Perfusion Index as a Predictive Factor of Postoperative Shivering. Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists, 2012年10月14日、Washington DC, U. S. A

(2)森山孝宏、長野真行、松永明、上村裕一 プロポフォールは脂肪細胞内伝達シグナル JNK のリン酸化を促進しアディポネクチン分泌を抑制する日本麻酔科学会第 57 回学術集会 2010 年 6 月 3 日 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上村裕一 (KANMURA YUICHI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：30211189

### (2) 研究協力者

森山孝宏 (MORIYAMA TAKAHIRO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：20593651