

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 24 年 05 月 10 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791428
 研究課題名（和文）周術期使用薬剤が細胞の酸素代謝に及ぼす影響の細胞生物学・分子生物学的解析
 研究課題名（英文）Cellular and molecular biological analysis of the impact of drugs used during periorerative period on cellular oxygen metabolism
 研究代表者
 高淵 聡史（TAKABUCHI SATOSHI）
 京都大学・医学研究科・研究員
 研究者番号：90402841

研究成果の概要（和文）：

転写因子低酸素誘導性因子1を介した遺伝子発現、糖代謝におけるエネルギー需給バランス、細胞の酸素代謝の三者の相互関係に対して麻酔薬を含む周術期使用薬剤が及ぼす影響を培養細胞、臓器を用いて検討した。結果として高グルコース暴露は、膵β細胞においてインスリン分泌を促し、細胞内酸素消費量の増大、細胞内低酸素を誘導してHIF-1の活性化をもたらす。この反応を揮発性吸入麻酔薬、デクスメデトミジンが臨床使用濃度で有意な抑制することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) elicited by 400 mg/dL glucose was inhibited by treatment with isoflurane and sevoflurane. Taken together experimental evidence that glibenclamide-stimulated insulin secretion was not affected by either isoflurane or sevoflurane and that treatment with isoflurane or sevoflurane significantly suppress glucose-induced intracellular ATP elevation, it is suggested that isoflurane and sevoflurane affect mitochondria ETC and suppresses GSIS. Our finding may delineate the molecular mechanism behind the glucose tolerance established by volatile anesthetics.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：薬理学，麻酔薬，低酸素応答，細胞生物学，分子生物学

1. 研究開始当初の背景

周術期における生体の低酸素応答は大き

く2つに分類できる。ひとつは、頸動脈小体の興奮、肺血管の低酸素性収縮など、

イオンチャネルの活性変化を介する反応で、これまで数多くの検討がなされている。もうひとつは、転写因子を介する遺伝子応答を本体とする反応であり、麻酔科学上の知見はこれまで多くなかったし、気体である酸素についての研究を近代的な細胞生物学的、分子生物学的な手法と結びつけて行う試みはうまくいかなかった。酸素はエネルギー代謝に直接関与する分子である故低酸素を直接的な影響と間接的または二次的な影響に分けてそれに対する生体応答として解析することが困難だったのである。

低酸素誘導性転写因子 1

(Hypoxia-Inducible Factor 1, HIF-1)は、ブドウ糖代謝、細胞増殖、血管新生など多岐にわたる生理的現象に関わる遺伝子の発現を誘導し、細胞の機能維持に寄与している重要な転写因子であり、1993年、Semenza博士らによって、蛋白精製およびcDNAクローニングされて以来、生理学的、あるいは、病理学的に果たす役割について多くの検討が加えられてきた。申請者はこのHIF-1に着目してこれまで周術期使用薬剤が低酸素誘導性のHIF-1の活性化過程にいかなる影響を与えるかの検討を継続してきた。

その結果、その結果、すでに報告のあった吸入麻酔薬のハロタンに加え、静脈麻酔薬のプロポフォールまたバルビツレートがHIF-1の活性を酸素濃度依存的に抑制すること、局所麻酔薬はHIF-1の活性に影響を及ぼさないこと、亜硝酸薬のうちニトロプルシドナトリウムは、ニトログリセリン等と異なり、HIF-1の活性を抑制すること、オピオイド受容体の刺激はHIF-1の活性に影響を及ぼさないこと等を報告してきた。このHIF-1はブドウ糖代謝においては、大部

分の解糖系酵素やグルコーストランスポーターの誘導に関わり、細胞内のエネルギー供給が、酸化的リン酸化から解糖系へとシフト(パスツール効果)に働く複数の遺伝子発現をHIF-1が誘導することが明らかになっている。生体では正常状態で酸素消費量を上回る酸素が供給されておりさらに酸素供給量が増加しても酸素消費量への変化は観察されない。また急性心不全や、出血などにより酸素供給量が減少しても生体は酸素摂取率を上昇させて対処するため酸素消費量は一定となる。一方敗血症患者などでは酸素消費量が正常範囲にあっても酸素供給量の増加により酸素消費量が増加する現象が

(supply-dependent oxygen consumption)を認めるとの報告があるがこの現象の分子機構、麻酔薬を含んだ周術期使用薬剤、または“麻酔状態”がこれらの過程に与える影響そのものまたその分子機序は未だ明らかになっていない。

これらの事実を背景として申請者は、細胞また臓器の酸素消費量に周術期使用薬剤がいかなる影響を与えるかをHIF-1の活性化、ブドウ糖・脂肪代謝、臓器内酸素分圧・酸素分布の解析を細胞・臓器レベルで分子生物学的な手法を援用して研究することを着想した。

2. 研究の目的

麻酔薬をふくむ周術期使用薬剤の薬理作用の追究は麻酔科学研究のメインストリームの一つである。神経系への作用、呼吸・循環系への作用への研究はいままで大きな成果を挙げてきた。最近では細胞生物学・分子生物学を駆使して標的分子を明らかにする研究も行われてきている。

一方、周術期における患者管理の要諦は、麻酔技術を駆使して手術侵襲を受ける生体の

ホメオスタシス、とくに細胞レベルにおける酸素需給バランス、すなわちエネルギー需給バランスを保つことにある。この観点に立ち、周術期使用薬剤が、細胞のエネルギーバランスにどのような影響を及ぼすかについて明らかにするという全体構想の中で、本研究課題の具体的な目的は、HIF-1を介した遺伝子発現、糖代謝におけるエネルギー需給バランス、細胞の酸素代謝の三者の相互関係について培養細胞、臓器を用いて周術期使用薬剤の影響を検討し、よりよい周術期管理法の開発のための基礎的なデータを得ることであった。

3. 研究の方法

本研究は、研究代表者 高淵聡史に加えて京都大学大学院医学研究科 広田喜一、また所属の大学院生二人（大条鈺樹、甲斐慎一）を研究協力者として加えて期間二年で研究を遂行された。

4. 研究成果

(1) 細胞酸素消費量のアッセイ系の確立

クラーク電極を用いた実験装置を用いて樹立細胞株、マウス肝臓由来初代培養系において酸素消費量をアッセイする実験系を確立した。この実験系を用いて、数種類の静脈麻酔薬、局所麻酔薬が細胞の酸素消費量に直接与える影響を検討した。

(2) レポーター細胞の樹立

HRE（転写因子HIF-1の結合部位）を用いて作成したレポータープラスミドを安定的に組み込んだ樹立培養細胞を確立した。

(3) ミトコンドリア電子伝達系に着目した

HIF-1活性の検討

細胞に供給された酸素の細胞内濃度は細胞での酸素消費つまりミトコンドリアの電子伝達系での酸素利用の程度によって決定されるはずである。このため様々なミトコンド

リアの電子伝達系の阻害剤(Rotenone, antimycin, シアン化合物など)を用いHIF-1の活性化への影響を検討した。

(4) オピオイド受容体作動薬がHIF-1の活性に与える影響の検討

フェンタニル、塩酸モルヒネ、レミフェンタニルがオピオイド受容体依存的にHIF-1の活性化を20%酸素環境下でももたらす事を見いだして成果を公刊した。

(5) 膵β細胞のブドウ糖刺激性インスリン分泌に周術期使用薬剤が与える影響の検討

マウス膵β細胞由来の樹立細胞株MIN6は、細胞外液のグルコース濃度の上昇に反応してインスリンを細胞外へ分泌する性質を持つ。高グルコース暴露は、インスリン分泌を促し、細胞内酸素消費量の増大、細胞内低酸素を誘導してHIF-1の活性化をもたらす。この反応を揮発性吸入麻酔薬イソフルレンとセボフルレンは用量依存的に抑制すること。さらにミダゾラム、プロポフォールにはこの抑制作用は見られないがデクスメデトミジンには臨床使用濃度で有意な抑制作用が観察されることを見いだした。

(6) 揮発性吸入麻酔薬イソフルレンが中枢神経の低酸素誘導性のエリスロポエチン産生に与える影響の検討

イソフルレンの吸入はマウス10%酸素吸入モデルにおいて脳、脊髄のエリスロポエチン産生を抑制するが肝臓、腎臓におけるエリスロポエチン産生には影響を与えないことを見いだした。

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 Kai, S., Tanaka, T., Daijo, H., Harada, H., Kishimoto, S., Suzuki, K., Takabuchi, S., Takenaga, K., Fukuda, K., and Hirota, K. (2012). Hydrogen sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau- and mitochondria-dependent manner. *Antioxidants & redox signaling* 16, 203-216. (査読有り) DOI: 10.1089/ars.2011.3882

② Daijo, H., Kai, S., Tanaka, T., Wakamatsu, T., Kishimoto, S., Suzuki, K., Harada, H., Takabuchi, S., Adachi, T., Fukuda, K., Hirota, K. (2011). Fentanyl activates hypoxia-inducible factor 1 in neuronal SH-SY5Y cells and mice under non-hypoxic conditions in a mu-opioid receptor-dependent manner. *European journal of pharmacology* 667, 144-152. (査読有り) DOI:10.1016/j.ejphar.2011.06.014

③ Tanaka, T., Takabuchi, S., Nishi, K., Oda, S., Wakamatsu, T., Daijo, H., Fukuda, K., and Hirota, K. (2010). The intravenous anesthetic propofol inhibits lipopolysaccharide-induced hypoxia-inducible factor 1 activation and suppresses the glucose metabolism in macrophages. *J Anesth* 24, 54-60.(査読有り) DOI: 10.1007/s00540-009-0829-1

[学会発表] (計 2 件)

① Differential role of prostaglandin E-type receptors in activation of hypoxia-inducible factor 1 by prostaglandin E1 in vascular-derived cells under non-hypoxic conditions.

Kengo Suzuki, Satoshi Takabuchi, Hiroki Daijo, Shinichi Kai, Tomonori Matsuyama, Shin Kurosawa, Kazuhiko Fukuda, Kiichi Hirota

2011 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/16

② Hydrogen sulfide inhibits hypoxia-induced HIF-1 activation in a mitochondria-dependent manner

Shinichi Kai, Tomoharu Tanaka, Hiroki Daijo, Shun Kishimoto, Kengo Suzuki, Satoshi Takabuchi, Takuhiko Wakamatsu, Kazuhiko Fukuda, Kiichi Hirota

2011 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高淵 聡史 (TAKABUCHI SATOSHI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：

90402841