

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 4 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791437

研究課題名（和文） 糖鎖が吸入麻酔薬による心保護作用に及ぼす影響

研究課題名（英文） Role of the O-linked β -N-acetylglucosamine in the Cardioprotection Induced by Isoflurane.

研究代表者

廣瀬 佳代 (HIROSE KAYO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・特別研究員

研究者番号：40532221

研究成果の概要（和文）：イソフルランは O-GlcNAc を介したシグナル伝達経路で心筋保護効果をあらわす。その経路として mitochondrial permeability transition pore (mPTP) の構成要素である voltage-dependent anion channel (VDAC) はイソフルラン投与により O-GlcNAc 化される。それを介して mPTP の開口が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Isoflurane induced O-GlcNAc modification mitochondrial protein known as the VDAC. This inhibits the opening of mPTP and results in the acquisition of resistance to ischemia reperfusion stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

1. 研究開始当初の背景

1986 年、短時間の虚血再灌流がその後の長時間の虚血に対する心筋梗塞サイズを減少させるという報告がなされた(Murry CE et al., *Circulation* 1986;74:1124-1136)。短期虚血によるプレコンディショニング(IPC)によるこの現象は、虚血によって障害される心筋を保護するという観点から、臨床的に有用性の極めて高い発見であった。そのメカニズムを明らかにすることで、心筋梗塞患者の救命につながるため、その後 20 年以上にわたり IPC 作用における分子経路の解明がなされてきたが、その全容は未だ明らかではない。

近年、オピオイドやアデノシンなど IPC 様作用をあらわす様々な薬物が報告されており注目を浴びてきた。また、吸入麻酔薬であるイソフルランにおいても前投与によって同様の心筋保護効果が得られることが報告された(Kersten JR et al., *Anesthesiology* 1996;85:794-807)。この吸入麻酔薬によつてプレコンディショニング(APC)は IPC のメカニズムと類似した部分が多く、心筋保護作用に対して共通の経路を共通するものと考えられている。

虚血再灌流障害にはミトコンドリアにおける Mitochondrial Permeability Transition

Pore (mPTP)の開口が起り細胞死へと繋がるとされている。そのため、虚血再灌流障害時に mPTP の開口を抑制することが心筋保護作用の発現に重要な役割を担うこととなる。

最近の報告によると O-Linked β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc)が IPC の作用経路に関与していることが明らかとなった(Jones SP et al., *Circulation* 2008.,117:1172-1182)。O-GlcNAc は糖鎖であり、セリンあるいはスレオニン残基の水酸基の酸素に N-Acetylglucosamine が 1 分子結合したものである。この分子は翻訳後修飾によるタンパク質の制御機構の一つであり、シグナル伝達の重要な調節因子として以前から知られていた。さらに Jones 等によると IPC 刺激により、mPTP を構成する分子の一つである voltage-dependent anion channel が O-GlcNAc により修飾を受けることが示され、それにより mPTP の開口が抑制され心筋保護作用が発現すること示された。

2. 研究の目的

APC による心筋保護作用が IPC 作用同様に O-GlcNAc 化タンパク質により誘導されるかどうかは明らかではない。本研究は、イソフルランによる心筋保護作用に O-GlcNAc が関与することを明らかにし、虚血プレコンディショニング経路の解明に寄与する事を目的とする。

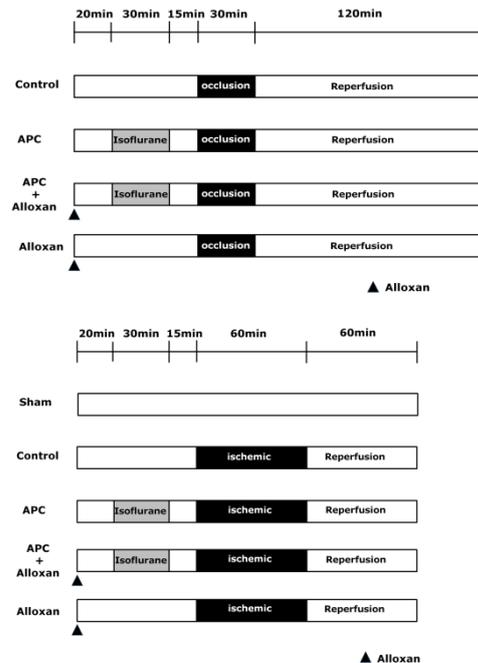
3. 研究の方法

(1) イソフルランの投与で O-GlcNAc 修飾タンパク量が増加するか否かを定量する。マウスをペントバルビタールで麻酔し、人工呼吸器で換気、開胸し、心臓を摘出。マウスを①対照群、②APC 群 (1.4%イソフルラン吸入)、③APC+アロキサン (O-GlcNAc トランスフェラーゼ阻害薬) 群、④アロキサン群に分け、心筋タンパク質をイムノブロッティングし、O-GlcNAc の量を比較する

(2)O-GlcNAc 修飾の増強が心筋保護効果に与える影響を in vivo で検討する。In vivo 実験系では開胸マウスの左冠動脈前下行枝を一時的に結紮し、虚血モデルを作成。各群間の心筋梗塞サイズを比較。

(3) O-GlcNAc 修飾の増強が心筋保護効果に与える影響を in vitro で検討する。In vitro 実験系では、ペントバルビタールで麻酔したマウスの心臓を摘出し、コラゲナーゼ II を使用し

て灌流することにより遊離心筋細胞を得た。遊離心筋細胞を、①シャム群、②対照群、③APC 群、④APC+アロキサン群、⑤アロキサン群に分け、②～⑤は虚血モデルとして 95%窒素+5%二酸化炭素に暴露する。③、④では、混合ガス中に 1.4%イソフルランを加える。95%窒素+5%二酸化炭素で 60 分間に暴露した後、95%空気+5%二酸化炭素で 60 分間暴露する。後に細胞の生存率を比較する。



(4)O-GlcNAc により修飾されたタンパク質の心筋保護効果のシグナル伝達経路を検討する。心筋保護効果のシグナル伝達経路の最終段階として、ミトコンドリア膜透過性の変化が関与することが、近年報告されている。ミトコンドリア膜透過性の変化 (mPTP 開口の程度) は蛍光色素を用いて検討した。カルセイン AM と塩化コバルトを用いて心筋細胞を染色したものに、レーザーを照射することにより、ミトコンドリアに取り込まれた緑色の蛍光色素が発色する。そこに過酸化水素を投与することにより酸化ストレスを与えた時の蛍光の減弱が mPTP の開口を示唆する。①対照群、②APC 群、③APC+アロキサン群、④アロキサン群の 4 群の心筋細胞の群間での蛍光色素の減弱の程度を比較する。

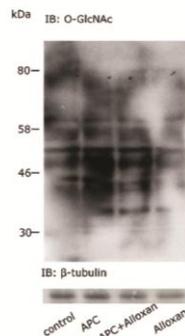
(5) ミトコンドリア膜開口に関与すると考えられる mPTP 構成タンパク質を同定する。まず、共免疫沈降を行う。心筋タンパク質を抗 O-GlcNAc 抗体を用いて免疫沈降したのち、抗 VDAC 抗体でイムノブロットを行う。また、逆に抗 VDAC 抗体を用いて免疫沈降を行っ

たのち、抗 O-GlcNAc 抗体を用いてイムノブロットを行う。
得られた結果を確認するため、また、群間で用いたタンパク量に差がないことを明らかにするため、酵素抗体法を行う。まず、心筋タンパク質を用いて抗 VDAC 抗体で免疫沈降を行う。引き続き O-GlcNAc 修飾タンパクを標識し、532nm レーザーで視覚化する。同じゲルを総タンパクを染色する SYPRO-Ruby で標識し、同様に 488nm レーザーで画像化する。

(6)統計は SPSS version 19 software (SPSS Inc., Chicago, IL)を用いて行う。全てのデータは mean±SD であらわす。多群間の比較は one-way analysis of variance で行い、ポストホックテストは Tukey 法を用いる。P<0.05 を以て有意とする。

4. 研究成果

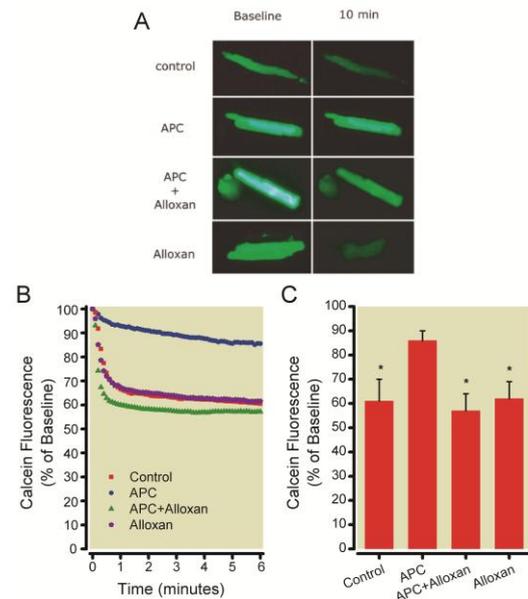
(1) 心室筋を摘出し、APC の影響をイムノブロット法により検討した結果、イソフルラン投与によって O-GlcNAc により修飾を受ける蛋白が増加していることが明らかになった。



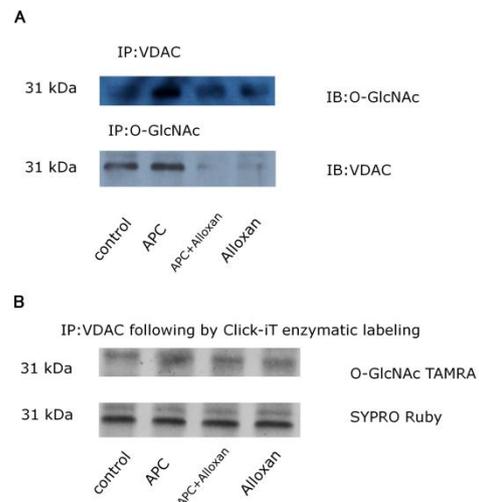
(2) In vivo でのマウス虚血再灌流 (30 分-2 時間)モデルにおいてリスク領域に対する心筋梗塞サイズは APC 群では対照群と比較して縮小する (26 ± 5% vs. 43 ± 3%, p < 0.001) が、O-GlcNAc transferase 阻害薬であるアロキサンを前投与することにより心筋保護作用は消失した (39 ± 5%)。

(3) マウスの遊離心室筋細胞を用いた in vitro 低酸素モデルにおいて低酸素後の細胞生存率はイソフルランによる APC 作用によって上昇するが (71 ± 10% vs. 53 ± 7%, p = 0.012)、イソフルラン刺激前にアロキサンを投与し同様の実験を行なった場合、その保護作用は消失した (47 ± 12%)。

(4)マウスの遊離心筋細胞をイソフルランに暴露後、calcein AM と塩化コバルトでミトコンドリアを蛍光染色し、過酸化水素により酸化ストレスを与えた。イソフルラン投与で蛍光強度の減弱が抑制された (61 ± 9% vs. 86 ± 4% of baseline, P < 0.001) が、O-GlcNAc transferase 阻害剤であるアロキサンを前投与することによってその効果は消失した (57 ± 7% of baseline)。



(5) mPTP を構成するタンパク質である VDAC がイソフルラン投与により、O-GlcNAc で修飾されることを免疫共沈降法によって明らかにした。また、酵素抗体法によっても確認した。



イソフルランが投与されていない群、及びアロキサンが前投与された群では O-GlcNAc により修飾された VDAC は増強されていなかった。

これらの実験結果から、mPTP の構成要素である VDAC は、イソフルラン投与により O-GlcNAc 化され、それを介して mPTP の開口が抑制されることで、心筋保護効果をあらわす可能性が示唆された。

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)

- ① Hirose K, Tsutsumi YM, Tsutsumi R, Shono M, Katayama E, Kinoshita M, Tanaka K, Oshita S. Role of the O-linked β -N-acetylglucosamine in the Cardioprotection Induced by Isoflurane. *Anesthesiology*. 査読あり 115、2011、955-62

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kayo Hirose, The Relation Between Isoflurane-induced O-Linked β -N-Acetylglucosamine and Mitochondrial Function, American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2011、平成 23 年 10 月 16 日、米国シカゴ
- ② 廣瀬佳代、イソフルランによる心筋保護効果における O-Linked β -N-Acetylglucosamine とミトコンドリア機能、日本麻酔科学会、平成 23 年 5 月 19 日、神戸 (神戸国際展示場)
- ③ Kayo Hirose, The role of O-linked [beta]-N-acetylglucosamine in the cardiac protection induced by isoflurane, American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2010、平成 22 年 10 月 16 日、米国サンディエゴ
- ④ 廣瀬佳代、イソフルランによる心筋保護効果における O-Linked β -N-Acetylglucosamine の役割、日本麻酔科学会、平成 22 年 6 月 3 日、福岡 (福岡国際会議場)
- ⑤ Yasuo Tsutsumi, Role of O-linked -N-acetylglucosamine in isoflurane induced cardiac protection, *Experimental Biology Annual Meetin*、平成 22 年 4 月 6 日、米国アナハイム

[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
廣瀬 佳代 (HIROSE KAYO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・特別研究員
研究者番号：40532221

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

