

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462405

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬の心筋保護作用における細胞膜マイクロドメインとオートファジーの役割

研究課題名(英文) Isoflurane induces cardioprotection is dependent on caveolae and autophagy

研究代表者

堤 保夫 (TSUTSUMI, Yasuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：90523499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを人工呼吸下に開胸、心臓冠動脈を30分間閉塞、2時間再灌流し、心筋梗塞サイズを測定した。コントロール群、吸入麻酔薬群、オートファジー誘導剤群において心筋梗塞サイズを測定比較した結果、吸入麻酔薬群、オートファジー群はコントロール群に比べて優位に心筋梗塞サイズを減少させた。同様のモデルを使用し、細胞膜マイクロドメインの関与を明らかにした。また、関連タンパクについてイムノプロットング法にて比較する検討した結果、LC3-I/LC3-II、Beclin1などのオートファジー関連タンパクが活性化が見られた。

研究成果の概要(英文)：The protocol was approved by the institutional Animal Care and Use Committee. Following thoracotomy and establishment of baseline values, male C57BL/6 mice were assigned to experimental groups. The autophagy group received rapamycin, active agent of autophagy before coronary artery occlusion (CAO). In the APC group, isoflurane was administered for 30 min and discontinued 15 min before CAO. All mice then underwent 30 min of CAO followed by 2 h of reperfusion. Compared with the Control group, myocardial infarction size in the autophagy group and APC group were reduced significantly. Additionally, cardiac protection was not observed in caveolin knockout mice following the administration of APC, and rapamycin. Furthermore, LC3-I/LC3-II and Beclin1 were activated by preconditioning.

研究分野：麻酔科学

キーワード：細胞膜マイクロドメイン オートファジー 吸入麻酔薬 心筋保護作用

1. 研究開始当初の背景

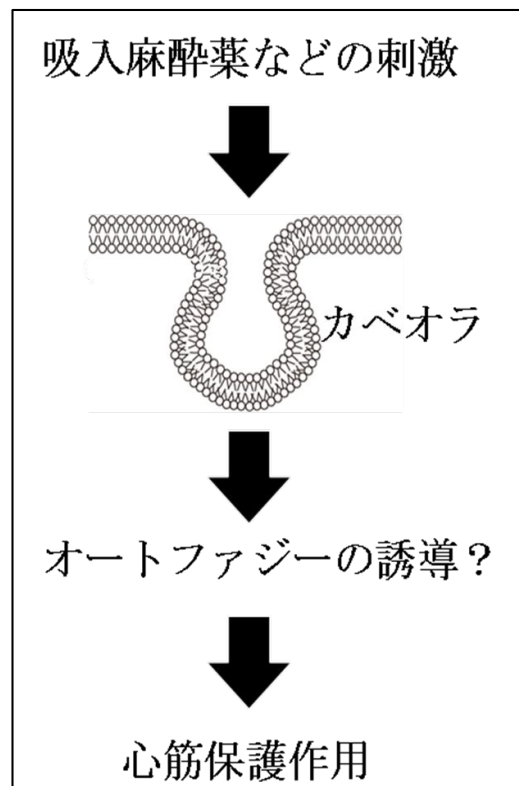
近年の食生活の欧米化、人口の高齢化および生活習慣病の増加は、本邦における心血管リスクを急激に増加させている。虚血性心疾患やリスクを有する患者の心合併症発生予防とその治療は患者予後にとって重要な因子となっている。

右図に示されるとおり、細胞膜マイクロドメインであるカベオラは細胞膜に存在する直径 50-100 nm 前後の陥凹であり、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメインと称され、細胞膜のシグナル伝達、エンドサイトーシスなどの断片的な性質は明らかにされてきた。カベオリンはカベオラを構成する構成タンパクであり、異なる遺伝子でコードされるカベオリン-1,2,3 が同定されている。カベオリンは両末端が細胞質側に露出し脂質分子と結合しシグナル伝達に関与すると考えられる。特に、カベオリン骨格ドメインと呼ばれる部分は多くのシグナル伝達関連分子に結合するだけでなくそれらの機能制御にも関与すると考えられている。

1996年に Kersten 等によって吸入麻酔薬を投与することで心筋保護効果が得られることが報告された (Anesthesiology 1996;85:794-807)。以来、この保護経路に対し様々な考察が行われてきたが、そのメカニズムは未だに全て明らかになってはいない。

近年、申請者は吸入麻酔薬によって細胞膜カベオラ数が増加し、カベオリンを介した心筋保護作用が活性化されることを突き止め (FASEB J 2007;21: 1565-74、J Mol Cell Cardiol 2008;44: 123-30、Anesthesiology 2010;112: 1136-1145) 細胞膜マイクロドメインであるカベオラおよびカベオリン-3 が心筋保護作用に重要な役割を担っていることが明らかにした。

オートファジーは自食作用と呼ばれ、細胞内タンパク分解機構であり、一般的には栄養飢餓などで誘導され、タンパクを分解して再



利用することで細胞や組織に保護的に働くシステムである。また、不要なタンパク質やダメージを受けた器官を除去して細胞を正常に保つ働きも行っており、近年の研究によると、虚血再灌流時にオートファジーの誘導が心筋に対し保護的に作用することが示唆されている (Autophagy 2006;2: 305-306)。しかしながら、虚血再灌流障害に対して細胞膜マイクロドメインを介する吸入麻酔薬による心筋保護作用が、オートファジーの誘導にどのように作用しているかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

(1) 吸入麻酔薬によりカベオラが増加、カベオリン-3 が活性化され、オートファジーが誘導されることを明らかにすること。

(2) 心筋保護作用は細胞膜マイクロドメインを介しオートファジーが誘導されることで発現することを証明すること。

である。

上記の仮説を検証するため以下の実験を行なう。

実験1. マウスの in vivo 虚血再灌流モデルを用いて対照群、吸入麻酔群、オートファジー誘導剤群において心筋梗塞サイズを測定比較する。さらに、同様のモデルを使用しオートファジー抑制剤によりオートファジーの心保護作用への関与を明らかにする。

実験2. カベオリン-3 ノックアウトマウスを用い上記3群に対して心筋梗塞サイズを測定し、カベオリン-3の影響を明らかにする。

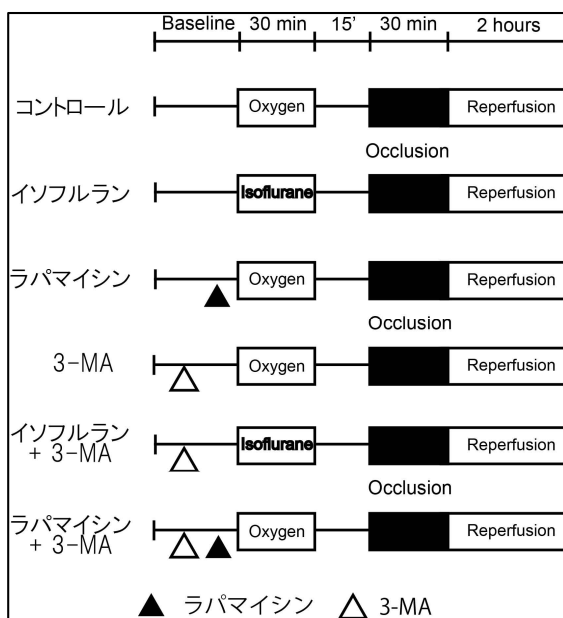
実験3. 実験1. 及び実験2. の各群においてカベオラ数、カベオリン-3の活性化、及びオートファジーの誘導を形態学的方法、イムノプロットング法にて確認する。

これらによって本研究期間内に、吸入麻酔薬の細胞膜マイクロドメインを介したオートファジーに及ぼす影響が明らかになると共に、心筋保護作用経路におけるオートファジーの果たす役割が解明される。

3. 研究の方法

実験1.

マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定（血圧-容量曲線）しながら、心臓冠動脈左前下行枝を30分間閉塞した後を行なう。その後、2時間再灌流し、再び冠動脈を閉塞、Evans Blueを注入し心臓を取り出す。心臓をスライスし、TTCにて再染色を行い心筋梗塞

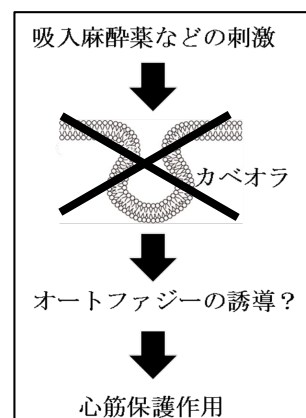


サイズを測定する。コントロール群、吸入麻酔薬（イソフルラン 1.0 MAC）群、オートファジー誘導剤（ラパマイシン）群において心筋梗塞サイズを測定比較する。

同様のモデルを使用し、オートファジー抑制剤（3-メチルアデニン：3-MA）を刺激前に投与し、虚血再灌流実験を行いオートファジーのイソフルランによる心保護作用に対する影響を明らかにする。

実験2.

実験1.と同様の方法でマウスをカベオリン-3 ノックアウトマウスに替えて虚血再灌流実験を行う。コントロール群、吸入麻酔薬群、オートファジー誘導剤群に



において心筋梗塞サイズを測定比較する。

実験3.

実験1.及び実験2.の各群のマウスの摘出心臓をカベオリン-3の活性をイムノプロットング法にて確認する。

また、関連タンパクについてイムノプロットング法にて比較する（LC3-I/LC3-II、Beclin1など）。

これらを行うことで、吸入麻酔薬の心筋保護作用における細胞膜マイクロドメインとオートファジーの関係がより明らかとなる。

4. 研究成果

マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定しながら、心臓冠動脈左前下行枝を30分間閉塞した後を行なった。その後、2時間再灌流し、再び冠動脈を閉塞、Evans Blueを注入し心臓を取り出す。心臓をスライスし、TTCにて再染色を行い心筋梗塞サイズを測定する。

コントロール群、吸入麻酔薬（イソフルラン 1.0 MAC）群、オートファジー誘導剤（ラパ

マイシン)群において心筋梗塞サイズを測定比較した。その結果、コントロール群において心筋梗塞サイズがリスク領域の43%であったのに対し、イソフルラン投与群においては32%と減少した。さらに、オートファジー誘導群においては、28%であり、イソフルラン同様に心筋梗塞サイズの減少が認められた。

同様のモデルを使用し、オートファジー抑制剤(3-メチルアデニン: 3-MA)を刺激前に投与し、虚血再灌流実験を行った。その結果、オートファジー誘導群の心筋保護作用は棄却され、心筋梗塞サイズは46%に上昇した。さらに、イソフルランによる心保護作用においても、オートファジー抑制剤によって心保護作用は棄却されたことから、イソフルランの心筋保護作用にオートファジーの関与が考えられた。

さらに、上記と同様の方法で、マウスをカベオリン-3ノックアウトマウスに変えて虚血再灌流実験を行った。カベオリン-3ノックアウトマウスにおいては、コントロール群(リスク領域に対する心筋梗塞サイズの割合が46%)、吸入麻酔薬(イソフルラン1.0 MAC)群(リスク領域に対する心筋梗塞サイズの割合が44%)、オートファジー誘導剤(ラバマイシン)群(リスク領域に対する心筋梗塞サイズの割合が44%)であり、これらの心筋保護作用が棄却されることが明らかとなった。

また、関連タンパクについてイムノブロットング法にて比較する検討した結果、LC3-I/LC3-II、Beclin1などのオートファジー関連タンパクが活性化が見られた。

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 6 件)

Michiko Kinoshita, Yasuo M. Tsutsumi, Kohei Fukuta, Asuka Kasai, and Katsuya

Tanaka. Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels. *J Med Invest* 63: 80-84, 2016. 査読あり

http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol63/pdf/v63_n1-2_p080.pdf

Eisuke Hamaguchi, Katsuya Tanaka, Rie Tsutsumi, Yoko Sakai, Kohei Fukuta, Asuka Kasai, and Yasuo M. Tsutsumi. Exendin-4, glucagon-like peptide-1 receptor agonist, enhances isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction via caveolins-3 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19: 1285-1290, 2015. 査読あり

<http://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/1285-1290.pdf>

Yasuo M. Tsutsumi, Rie Tsutsumi, Eisuke Hamaguchi, Yoko Sakai, Asuka Kasai, Yoshihiro Ishikawa, Utako Yokoyama, and Katsuya Tanaka. Exendin-4 ameliorates cardiac ischemia/reperfusion injury via caveolae and caveolins-3 *Cardiovasc Diabetol* 13: 132(1-10), 2014. 査読あり doi: 10.1186/s12933-014-0132-9

Yasuo M. Tsutsumi, Rie Tsutsumi, Yousuke T. Horikawa, Yoko Sakai, Eisuke Hamaguchi, Yoshihiro Ishikawa, Utako Yokoyama, Asuka Kasai, Noriko Kambe, and Katsuya Tanaka.

Geranylgeranylacetone protects the heart via caveolae and caveolin-3. *Life Sci* 101: 43-48, 2014. 査読あり doi: 10.1016/j.lfs.2014.02.019

Yasuo M. Tsutsumi, Rie Tsutsumi, Yousuke T. Horikawa, Yoko Sakai, Eisuke Hamaguchi, Hiroshi Kitahata, Asuka

Kasai, Noriko Kambe, and Katsuya Tanaka. Geranylgeranylacetone and volatile anesthetic induced cardiac protection synergism is dependent on caveolae and caveolin-3. *J Anesth* 28: 733-739, 2014. 査読あり

doi:10.1007/s00540-014-1816-8.

Yasuo M. Tsutsumi (co-first author), Yousuke T. Horikawa, Hemal H. Patel, and David M. Roth. Signaling epicenters: the role of caveolae and caveolins in volatile anesthetic induced cardiac protection. *Curr Pharm Design* 20: 5681-5689, 2014 査読あり

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119864/pdf/nihms575508.pdf>

[学会発表](計 3 件)

Hiroshi Kitahata, Yasuo Tsutsumi, Tomohiro Aoyama, Kazumi Takaishi, Shinji Kawahito, and Katsuya Tanaka. Role of sirtuins in cardioprotection by ischemic and anesthetic preconditioning. Poster presented at Euroanaesthesia 2015, Berlin, Germany, June 1, 2015.

Kazumi Takaishi, Shinji Kawahito, Tomohiro Soga, Ryo Otsuka, Yasuo Tsutsumi, and Hiroshi Kitahata. Effects of beta-3 adrenergic stimulation on nitric oxide production in myocardial cells of neonatal rats. Poster presented at Euroanaesthesia 2015, Berlin, Germany, May 31, 2015.

瀧口英佑、堤保夫、田中克哉、曾我朋宏、神邊紀子、大下修造 吸入麻酔薬およびGLP-1の細胞膜マイクロドメインを介した心筋保護作用 第60回日本麻酔科学会、ロイトン札幌「札幌・北海道」 5/23/2013

[図書](計 2 件)

田中克哉、堤保夫 文光堂 『麻酔科医のための周術期の薬物使用法』 総 525 ページ (260-263), 2015

田中克哉、堤保夫、大下修造 総合医学社 「心臓手術中の心筋保護」 『徹底ガイド 心臓麻酔 Q&A【新装版】 - 心臓麻酔における臓器保護 - 心臓手術中の心筋保護』 総 287 ページ (107-115), 2013

[その他]

ホームページ等

徳島大学研究者総覧

<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/178260/profile-ja.html>

徳島大学麻酔科ホームページ

http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/masui_totsu/ikyoku/staff.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 保夫 (TSUTSUMI, Yasuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：90523499

(2) 研究分担者

田中 克哉 (TANAKA, Katsuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：30263841

大下 修造 (OSHITA, Shuzo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・非常勤講師
研究者番号：60144945

堤 理恵 (TSUTSUMI, Rie)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：80510172