

令和元年5月22日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16734

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬とGLP-1の心筋保護相互作用 ミトコンドリア機能に与える影響

研究課題名(英文) Synergism in cardiac protection: Role for isoflurane and GLP-1 in mitochondrial dynamics

研究代表者

浜口 英佑 (HAMAGUCHI, Eisuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・徳島大学専門研究員

研究者番号：60709575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬は、近年本邦においても臨床承認され糖尿病患者に対して広く使用されている。GLP-1は小腸のL細胞から分泌されるペプチドであり、近年の研究によるとGLP-1受容体は心機能の制御や虚血に対する心筋保護作用についても報告されている。そこで本研究は、イソフルラン・GLP-1受容体の心筋保護作用に対し、その作用のエンドエフェクターとして考えられているミトコンドリア・ダイナミクスがこれらに与える影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プレコンディショニング作用がある様々な薬剤が研究されているが、臨床応用に至っている薬剤は少ない。申請者は、小腸のL細胞から分泌されるGLP-1がイソフルランによる心筋保護作用に関与することを明らかにした。しかしながら、そのメカニズムの全容は明らかではない。そのため、周術期患者においてもGLP-1と吸入麻酔薬との相互作用を明らかにすることは、臨床的にも極めて重要であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is an intestinal hormone secreted in a nutrient-dependent manner that stimulates insulin secretion and inhibits glucagon secretion and gastric emptying, resulting in reduced post-prandial hyperglycemia. Recently, GLP-1 has been shown to reduce an infarct size in both in vitro and in vivo animal models of cardiac ischemia/reperfusion injury. Thus, I tested the hypotheses that the cardioprotective effects of Iso and GLP-1 against ischemia/reperfusion injury. In conclusion, isoflurane and exendin-4 reduced infarct size, and the cardioprotective effects of these agents are mediated by fusion of mitochondria.

研究分野：麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 虚血再灌流実験 GLP-1 プレコンディショニング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

吸入麻酔薬であるイソフルランを前投与によって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)。これを吸入麻酔薬によるプレコンディショニング (APC) 作用という。APC のメカニズムは現在までに報告されている虚血再灌流障害に対する心筋保護のメカニズムと類似した部分が多く、それらは心筋保護作用に対して共通の経路を共有するものと考えられている。

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。

そうしたなか現在までに、プレコンディショニング作用がある様々な薬剤が研究されているが、臨床応用に至っている薬剤は少ない。申請者は、早くから吸入麻酔薬の心筋保護作用に注目し、その経路を明らかにしてきた。

また、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体作動薬は、近年本邦においても臨床承認され糖尿病患者に対して広く使用されている。GLP-1は小腸のL細胞から分泌されるペプチドであり、ブドウ糖濃度依存性にインスリンの分泌を亢進させる働きがあり、新しい糖尿病治療薬として注目を浴びている。他にも、膵細胞の増殖、胃内容物の排出遅延作用、食欲抑制などが知られている。

近年の研究によるとGLP-1受容体は心筋細胞にも分布していることが明らかにされ (Luque et al. J Endocrinol 173: 465-473, 2002)、心機能の制御や虚血に対する心筋保護作用についても報告されている。さらに近年、申請者は、in vivo 虚血再灌流実験を通してGLP-1受容体のアゴニストがAPC作用と相乗効果を発揮することを明らかにした (Hamaguchi et al. Eur Rev Med Pharmacol Sci 19: 1285-1290, 2015.)。そのため、周術期患者においてもGLP-1と吸入麻酔薬との相互作用を明らかにすることは、臨床的にも極めて重要であると思われる。

### 2. 研究の目的

プレコンディショニング作用がある様々な薬剤が研究されているが、臨床応用に至っている薬剤は少ない。申請者は、小腸のL細胞から分泌されるGLP-1がイソフルランによる心筋保護作用に関与することを明らかにした (Hamaguchi et al. Eur Rev Med Pharmacol Sci 19: 1285-1290, 2015)。しかしながら、そのメカニズムの全容は明らかではない。

そこで本研究は、イソフルランのGLP-1受容体を介した心筋保護作用に対し、その作用のエンドエフェクターとして考えられているミトコンドリアにこれらが与える影響を明らかにすることで、虚血プレコンディショニング経路の解明に寄与することを目的とする。

### 3. 研究の方法

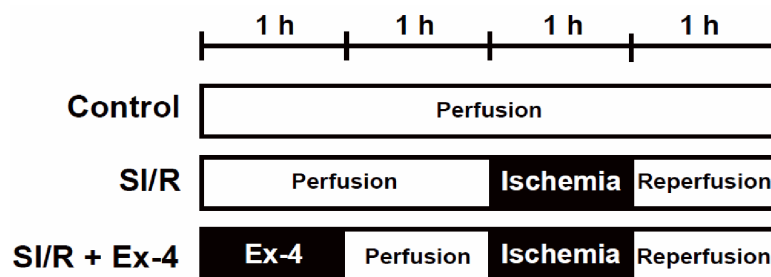
(1) in vitro 遊離心筋細胞を用い、低酸素モデルにて心筋細胞死亡率がGLP-1 (Exendin-4)により低下することを明らかにする。

さらに、同様のモデルを使用しGLP-1を前投与しAPC刺激の相互作用を明らかにする。免疫プロット

等を用いてこれらのシグナルメカニズムについて明らかにする。

(2) 各群についてプレコンディショニング作用がミトコンドリアダイナミクスを含むミトコンドリア機能に与える影響について調べる。

(3) ミトコンドリア融合に関与するOpa-1の影響を明らかにするため、Opa-1をノックダウンした細胞を用いて上記実験を行う。



### 4. 研究成果

(1) ラットの摘出心をランゲンドルフ酵素法にて灌流、得られた遊離心室筋細胞をラミンを用いてディッシュに接着させた。In vitro 遊離心室筋細胞を用いた低酸素実験は、通常培養液 (グルコース濃度 5.5 mmol/L) を「グルコースなし」のものに置き換え、特殊チャンバーを用い、1時間低酸素状況 (95%N<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>) に暴露することで心室筋細胞に虚血状態をつくりだした。その後1時間通常の培養状態に戻すことで再灌流状態とした。

細胞をトリパンブルー染色することで死亡細胞と正常細胞を区別し、生存率を割り出した。GLP-1群は、低酸素-再灌流の1時間前にGLP-1受容体作動薬 Exendin-4にて細胞を処置することによって作った。これによりGLP-1によるプレコンディショニング作用が明らかとなった。同様に、吸入麻酔薬イソフルラン (1.0 minimum alveolar concentration [MAC])にて30分間刺激を与え前処置を行ったAPC群においてもその心筋保護作用が明らかとなった。

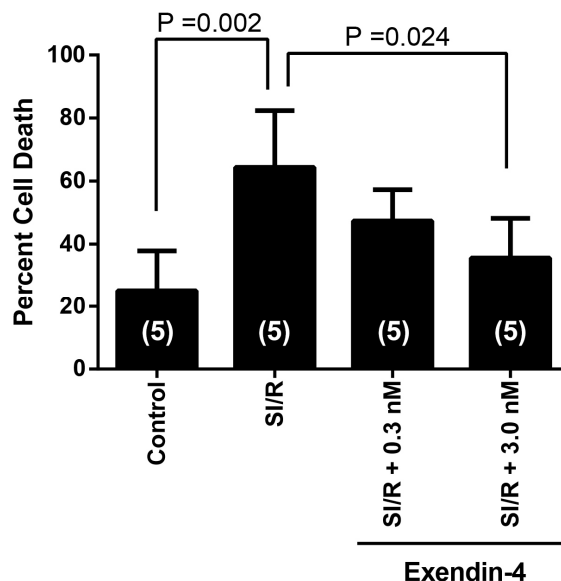
さらに、これらの両方を与えた場合の生存率を対照群と比較検討すると、GLP-1とAPCの相互作用が明らかとなった。

(2) 実験1. の低酸素再灌流モデルにて、ミトコンドリア染色色素(MitoTracker)、光褪色後蛍光回復法(FRAP assay)を用いて各群のミトコンドリアダイナミクス(ミトコンドリアの分裂と融合)を明らかにした。

分裂・融合タンパクについてイムノブロット・real-time PCRを用いて調べること、ミトコンドリアの融合タンパクであるOpa-1が有意に増加することを明らかにした。

(3) ミトコンドリア融合に関与するOpa-1の影響を明らかにするため、Opa-1 siRNAを電気穿孔法にて細胞に注入、トランスフェクションさせた細胞を用い、各群の心筋保護作用が棄却するかを調べた。

これらの結果、吸入麻酔薬の心筋保護作用にミトコンドリアも融合タンパクが重要な役割を演じていることが明らかになった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shiho Satomi, Asuka Kasai, Eisuke Hamaguchi, Yasuo M. Tsutsumi, and Katsuya Tanaka. Normothermic cardiopulmonary bypass in patient with Waldenström's macroglobulinemia and cryoglobulinemia: Case report. *A&A Case Reports* 9:162-163, 2017. 査読有  
DOI: 10.1213/XAA.0000000000000555.

Naoji Mita, Shinji Kawahito, Tomohiro Soga, Toshiko Katayama, Narutomo Wakamatsu, Tomiya Kawahara, Nami Kakuta, Eisuke Hamaguchi, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuya Tanaka, Kazumi Takaishi, and Hiroshi Kitahata. Anesthetic management of a patient with unruptured sinus of Valsalva aneurysm with right ventricular outflow tract obstruction. *Circulation Control* 37:195-198, 2016. 査読有  
<https://doi.org/10.11312/ccm.37.195>

〔学会発表〕(計 1 件)

Shiho Satomi, Shinji Kawahito, Tomohiro Soga, Naoji Mita, Eisuke Hamaguchi, Kazumi Takaishi, Hiroshi Kitahata, Yasuo M. Tsutsumi, and Katsuya Tanaka. Accuracy and reliability of continuous blood glucose monitoring during pediatric cardiopulmonary bypass. Poster presented at the American Society of Anesthesiologist Annual Meeting, 2016.

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 田中 克哉  
ローマ字氏名: (TANAKA, Katsuya)  
所属研究機関名: 徳島大学  
部局名: 大学院医歯薬学研究部(医学系)  
職名: 教授  
研究者番号(8桁): 30263841

研究協力者氏名: 酒井 陽子  
ローマ字氏名: (SAKAI, Yoko)  
所属研究機関名: 徳島大学  
部局名: 病院  
職名: 特任准教授  
研究者番号(8桁): 90711862

研究協力者氏名: 堤 保夫  
ローマ字氏名: (TSUTSUMI, Yasuo)  
所属研究機関名: 徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（医学系）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90523499

研究協力者氏名：角田 奈美

ローマ字氏名：(KAKUTA, Nami)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：00622606

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。