

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18244

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬とサーチュインの心筋保護作用とオートファジーの役割

研究課題名(英文) Cardiac protection by volatile anesthetic -Role of sirtuine and autophagy regulation-

研究代表者

笠井 飛鳥 (KASAI, Asuka)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：90756892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔薬の心筋保護作用は、そのメカニズムを含めて全容は明らかではない。そこで本研究は、イソフルランの心筋保護作用が、近年長寿遺伝子として注目されているSirt遺伝子に関連することを明らかにした。また、これらの心筋保護作用によって自食作用であるオートファジーが誘導されることを示した。これによって、吸入麻酔薬イソフルランによって起こる心筋保護作用にSirt遺伝子、オートファジーが重要な因子となっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

短時間の先行虚血により、その後生じる虚血性心筋障害が抑制される現象は他のどの治療薬よりも有効的な手段であり、20年以上を経た現在においてもその重要性が研究されている。この作用に類似した吸入麻酔薬によるプレコンディショニング作用も同様にヒトを含めた様々な動物種において、他の薬剤に比較して最も有効であり、簡便な方法として認識されている。この作用とSirt遺伝子、オートファジーの相互関連性を報告したものは本邦はもとより、国外においても調べた限りにおいては無い。そのため、近年わが国においても増加中の虚血性心疾患患者に対する治療戦略として、本研究の成果は非常に重要であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Ischemia-reperfusion injury was tested in anesthetic (isoflurane)-induced preconditioning mice. Compared with the control group, myocardial infarct size was significantly reduced by isoflurane. Expression of sirtuin genes, class III histone deacetylation enzymes, in myocardium was also induced by isoflurane, which suggests that sirtuins are involved in myocardial protective effects of anesthetic preconditioning. Additionally, autophagy plays an important role in isoflurane/sirtuins-induced cardiac protection.

研究分野：麻酔科学

キーワード：サーチュイン オートファジー イソフルラン 心筋保護 虚血再灌流障害 吸入麻酔薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 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* 74: 1124-1136, 1986)。短期虚血によるプレコンディショニング (IPC) と呼ばれ、臨床的に有用性の極めて高い発見であった。しかしながら、IPC作用のメカニズムなど全容は未だ明らかではない。近年、吸入麻酔薬、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。これらは、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有するものと考えられている。研究代表者も吸入麻酔薬の前投与によるプレコンディショニング (APC) 心筋保護作用による心筋保護作用を報告しており、そのメカニズムについても明らかにしてきた。

(2) オートファジー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、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、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)。

(3) Sirt 遺伝子はサーチュイン sirtuin 遺伝子とも呼ばれ、クラス III ヒストン脱アセチル化酵素であり、遺伝子の転写制御において重要な役割をはたしていることで知られている。Sirt 遺伝子の活性化により合成される Sirt はカロリー制限や飢餓によって発現することが知られており抗老化作用を有することで注目を浴びている。Sirt 遺伝子は抗老化作用だけでなく、代謝、細胞保護、悪性腫瘍などに関与しており生理学的、病態生理学的に重要であることが明らかになってきた。Sirt は心機能の制御や虚血に対する心筋耐性をコントロールする作用についても報告されている (Chen et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430: 798-803)。しかしながら、虚血再灌流障害に対して APC や Sirt、それらの相互作用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

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。

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。研究代表者の研究グループは、早くから吸入麻酔薬の心筋保護作用 APC に注目し、その経路を明らかにしてきた。また、Sirt 遺伝子の活性化により合成される Sirt はカロリー制限や飢餓によって発現することが知られており抗老化作用を有することで知られている。さらに、オートファジーの活性化により引き起こされる虚血再灌流障害に対する反応は近年注目を浴びている。しかしながら、Sirt と吸入麻酔薬の相互作用をオートファジーと関連付けた報告は、国内外を含め知る限りにおいて存在しないため、これらを明らかにすることは、極めて重要であると思われる。そのため、これらを介した詳細な機序について検討していくことで心筋虚血再灌流障害などによる細胞死に対する生体内の役割が明らかになるとと思われる。

そこで以下のように仮説を立て実験を行った。

- (1) 吸入麻酔薬又は Sirt の前投与によって心筋保護効果が発現する。
- (2) 吸入麻酔薬の心筋保護作用は Sirt に関連する。
- (3) これらの心筋保護作用は、オートファジーが誘導されることで発現する。

### 3. 研究の方法

(1) マウスに吸入麻酔薬イソフルランを吸入させた後、心臓を取り出しホモジナイズし RT-PCR、イムノプロットを用い RNA 及びタンパクレベルにおいて Sirt の発現が増加していることを明らかにする。

(2) マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定しながら、心臓冠動脈を 30 分間閉塞を行なう。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。Sirt の誘導剤である resveratrol、Sirt の阻害剤である nicotinamide を APC 刺激前に投与し、同様の虚血再灌流実験を行う。

(3) 各群のマウスの摘出心を組織固定し、オートファジーの誘導をアッセイキットにて検出し比較検討する。また、関連タンパクについてイムノプロット法にて比較する。

#### 4. 研究成果

(1) マウスに吸入麻酔薬イソフルランを1.0MAC吸入させた後 (APC刺激)、心臓を取り出しホモジナイズしRT-PCR、イムノブロットを用いRNA及びタンパクレベルにおいてSirtの発現が増加していることを明らかにした (図1)。

(2) マウスの心筋梗塞サイズを測定すると、吸入麻酔薬の心筋保護作用は、Sirtの誘導剤であるresveratrolによって相加的に引き起こされた。また、吸入麻酔薬の心筋保護作用は、Sirtの阻害剤であるnicotinamideによって棄却された。このことから、吸入麻酔薬の心筋保護作用はサーチュインの心筋保護作用と同じ経路が関与している可能性が示唆された。

(3) 各群のマウスの摘出心 (コントロール群、APC群、Sirt誘導剤群、Sirt抑制剤群) についてイムノプロット法にて関連タンパクを比較した。特に、オートファジーの評価については、LC3を用いたオートファジーの定量を用い、LC3-II/LC3-Iを指標とし、オートファジー誘導タンパクであるBeclin1を測定した。その結果、APC群ではコントロール群に比較してオートファジーの誘導が高かった。これにより、吸入麻酔薬の虚血再灌流障害に対する心筋保護作用、特に吸入麻酔薬によるプレコンディショニング様心筋保護作用は、オートファジーの影響が考えられた。また、Sirt誘導剤群においてもオートファジーの誘導が高くなっており、一方、Sirt抑制剤群においては抑制されていた。このことから、吸入麻酔薬のAPC作用による心筋保護作用には、Sirtおよびオートファジーが関連していることが明らかになった。

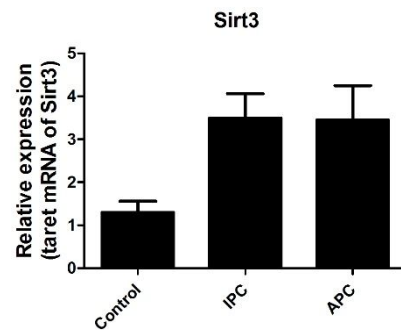


図1 RT-PCRによる発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kohei Fukuta, Asuka Kasai, Noriko Niki, Yuki Ishikawa, Ryosuke Kawanishi, Nami Kakuta, Yoko Sakai, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuya Tanaka.	4. 巻 20
2. 論文標題 The effect of 1% glucose loading on metabolism in the elderly patients during remifentanyl-induced anesthesia: a randomized controlled trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC anesthiol	6. 最初と最後の頁 143-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12871-020-01061-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富山芳信、笠井飛鳥、川西良典、石川雄樹、坂東悠太郎
2. 発表標題 手術終了一退室時間に影響及ぼす諸因子の検討
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------