

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792396
 研究課題名（和文）心筋虚血再灌流障害による細胞死のメカニズムにおける揮発性麻酔薬の効用の解明
 研究課題名（英文）Elucidation of the effect of the volatile anesthetics in the mechanism of the cell death by the myocardial ischemia-reperfusion injury
 研究代表者
 稲村 吉高 (INAMURA YOSHITAKA)
 大阪歯科大学・歯学部・講師（非常勤）
 研究者番号：80595794

研究成果の概要（和文）：

セボフルランポストコンディショニングはオートファジーを誘導し、梗塞サイズを減少させた。セボフルラン投与群でみられた LC3-II/I 発現の増強は 3MA の投与により消失した。また再灌流 120 分でセボフルラン投与群ではオートファゴソーム形成が有意に認められ、3MA の投与でその形成は抑制された。セボフルランポストコンディショニングの心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sevoflurane postconditioning reduced the infarct size by induction of autophagy. expression of LC3-II and the ratio of LC3-II/I were significantly increased in sevoflurane groups. Administration of 3-MA abolished these cardioprotective effects of sevoflurane groups. Expression of LC3-II and the ratio of LC3-II/I were significantly increased in POST and POST-L. Administration of 3-MA abolished these cardioprotective effects of POST. Sevoflurane postconditioning induces autophagy which plays an important role in cardioprotection against IR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：虚血性心疾患・心筋保護・揮発性麻酔薬・オートファジー・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会により高血圧、虚血性心疾患、動脈硬化などの循環器疾患を有する患者の全身麻酔の機会が増加している。これらの患者は術中、術後に急性冠症候群に陥り、広範囲急性心筋梗塞からポンプ失調を来し、死に至ることもある。このような high risk 患者の致死合併症を防ぐためには梗塞サイズを最小限にとどめるような全身麻酔法の確立が急務である。一般に揮発性麻酔薬は循環抑制があることが知られている。しかし、近年イソフルラン、セボフルラン、デスフルランなどの揮発性麻酔薬が心筋に対

して ischemic preconditioning (IPC: 長時間虚血前の反復する短時間虚血再灌流が、続発する長時間虚血による心筋梗塞巣を劇的に縮小する現象) 様の虚血心筋保護効果を有することが明らかとなり、anesthetic preconditioning (APC) と呼ばれている。私はこのように虚血前に揮発性麻酔薬により心筋に虚血耐性を獲得させる保護効果の持続に PKC- α 、PKC- ϵ は関与するが PKC- δ は関与しないこと (Okusa, Inamura et al. Eur J Anaesthesiol 2009), セボフルランはアルコールによる心筋保護作用を増強し、その機序として PKC ならびにミトコンドリア K_{ATP} チャ

ンネルが関与すること (Kaneda, Inamura et al. *Anesth Analg*, 106(1):9-16, 2008) を報告した。しかしながら致死的な虚血は予想不可能であり、この概念を積極的に臨床の場で応用するのは限られた症例のみである。そこで、近年こうした虚血再灌流障害を軽減させるための方法として、致死性虚血に陥った心筋の再灌流初期に短時間の虚血や薬剤を与えることによっても再灌流障害を軽減できることが明らかとなり、この戦略はポストコンディショニングと呼ばれている。再灌流はその開始時が特定されるため臨床医のコントロール下におくことができ、この意味ではポストコンディショニングはより臨床的に重要となる可能性がある。私は、再灌流直後にセボフルランを2分間のみ投与することで心筋梗塞サイズを縮小させ、そのメカニズムに nitric oxide (NO) 産生, protein kinase C- δ (PKC- δ), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), Akt のリン酸化が関与すること (Inamura et al. *Anesthesiol* 111:1036-1043, 2009), またセボフルランによるポストコンディショニング効果は、再灌流直後に Akt, ERK の活性化を介し、カスパーゼ 3, 9 の活性を減弱させることによりアポトーシスを抑制し、心筋再灌流障害を軽減すること (Inamura et al. *J Anesth* 24:215-224, 2010) を報告した。心筋細胞死のメカニズムとしてネクローシス, アポトーシス, オートファジーがよく知られている。私は揮発性麻酔薬の心筋ポストコンディショニング効果において上記のごとくネクローシス, アポトーシスの抑制を報告した。しかし、オートファジー関与は文献的にも未だ報告がない。オートファジー (自食作用, 自己食食) は飢餓応答, 細胞内浄化, 老化などとの関連が考えられてきた。しかし、最近、遺伝学研究により多数のオートファジー関連遺伝子 (Atg 遺伝子) 群が発見され、新たな役割が次々と解明されて来た。心筋では虚血や圧負荷などのストレス応答としても誘導される。一方、オートファジーが過度に誘導されることが、心筋の変性や細胞死の実行に深く関与している可能性も示唆され、心筋のホメオスタシス維持に多面的な役割を果たしていると考えられている。虚血再灌流障害においてもその関与が報告されている。Yan らはブタモデルを用い、冠動脈狭窄や完全虚血を頻回に繰り返すことによりオートファジー関連蛋白である cathepsin B, beclin-1, LC3-II/LC3-I が有意に上昇し、心筋梗塞サイズが縮小すること、またアポトーシスが減少するのに対しオートファジーが増加することを示した (Yan et al. *Proc Natl Acad Sci* 2005)。このように、現在、オートファジーの誘導が虚血心筋に対して保護的に働くか細胞死の誘導になるのか意見の一致を見ていない。近

年、Yuan らはアポトーシス経路が抑制された時、プログラムされたネクローシスが起これることを発見し necroptosis と名付け、細胞死に至る新たな経路を提唱した。また、necroptosis は形態学的にネクローシスの特徴を示し、オートファジーの増強を伴うこと、そしてこの非アポトーシス性細胞死を特異的に阻害する化学物質 necrostatin-1 を特定した。Yuan らは、脳卒中のネズミモデルを使った実験で、necrostatin-1 によって虚血性脳障害を起こした領域が縮小することを明らかにし、necroptosis が虚血性外傷による神経細胞損傷の一因であること (Yuan et al. *Nat Chem Biol* 2005) を実証した。アポトーシスとオートファジーは密接に関連することが分かっているが、新たな細胞死の経路である necroptosis とこれらの関係は虚血心筋の細胞死ではほとんど報告がない。antimicrobial agent である sulfaphenazole による虚血心筋保護にはオートファジーと PKC が必要であることが報告されている (Huang et al. *Am J Physiol* 298:H570-579, 2009)。私が報告したセボフルランによる心筋保護において PKC が key enzyme であることを考慮するとオートファジーの関与が示唆される。セボフルランによる心筋保護においてオートファジーの関与およびアポトーシスとの関係、また necroptosis がどのように作用しているかを明らかにしたい。これらの解明は全身麻酔時における心筋保護に最も有効な麻酔方法の確立に大きく寄与すると思われる。

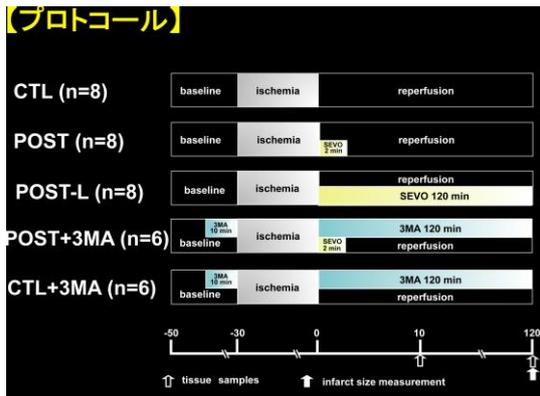
2. 研究の目的

心筋の細胞死のメカニズムとしてネクローシス, アポトーシス, オートファジーなどが提唱されている。虚血による心筋細胞死ではネクローシス, アポトーシスの報告が多いがオートファジーおよびこれらの相互関係についてはほとんどわかっていない。また、近年、プログラムされたネクローシスに至る新たな経路が提唱され、necroptosis と名付けられた。最近の研究から臨床で用いられる揮発性麻酔薬に虚血心筋保護作用があることが判明している。本研究は上記の種々の心筋細胞死のメカニズムにおける揮発性麻酔薬の作用機序を明らかにし、全身麻酔時における心筋保護に最も有効な麻酔方法の確立を分子生物学的手法を用いて解明することである。

3. 研究の方法

モルモットの langendorff 灌流心を用い、30分間虚血、120分間再灌流を行った。これを対照群 (CTL:n=8) とし、セボフルラン (1MAC;2%) を虚血再灌流直後に2分間又は再灌流中を通して投与した群 (POST, POST-L:n=8),

オートファジー阻害剤である 3MA を虚血 10 分前より再灌流中を通して CTL, POST 群に投与した群 (CTL+3MA, POST+3MA, n=6) の 5 群を作製した。それぞれ左心室圧 (LVDP), 左室終末拡張期圧 (LVEDP), 冠灌流量, 心筋梗塞サイズ (IS; TTC 染色) を各群間で比較した。また, 全群再灌流 10 分又は 120 分後に心筋を採取し, western blot によりオートファジー関連蛋白である LC3 I, LC3 II の発現について検討した (n=4)。また, 同様に再灌流後の心筋を採取し, 電子顕微鏡にてオートファゴソーム形成の評価も行った。



4. 研究成果

虚血再灌流後, POST, POST-L は CTL に比べて LVDP は有意に高値で, LVEDP は有意に低値であった (Table. 1)。梗塞サイズは POST, POST-L では CTL に対し有意に減少した (Fig. 1)。POST, POST-L における LC3-II/I の発現は再灌流 10 分では全群で有意差は認めなかったが, 再灌流 120 分で CTL よりも有意に増加していた。POST, POST-L でみられた LC3-II/I 発現の増強は 3MA の投与により消失した (Fig2, 3)。また再灌流 120 分で POST-L 群でオートファゴソーム形成が有意に認められ, 3MA の投与でオートファゴソームの形成は抑制された (Fig4, 5)。SPC はオートファジーを誘導し, IS を減少させた。この保護効果はオートファジー抑制剤 3MA の投与によって消失した。SPC の心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要であることが示唆された。

Table 1. Hemodynamic Variables

	baseline	reperfusion (min)		
		30	60	120
LVDP (mmHg)				
CTL	105 ± 14	39 ± 12	37 ± 9	31 ± 9
CTL+3MA	106 ± 12	39 ± 11	39 ± 9	33 ± 9
POST	100 ± 9	68 ± 11*†	65 ± 9*†	60 ± 8*†
POST-L	107 ± 11	51 ± 14	52 ± 13*	47 ± 13*
POST+3MA	106 ± 11	42 ± 10	43 ± 10	37 ± 10
LVEDP (mmHg)				
CTL	10 ± 0	47 ± 14	48 ± 15	51 ± 12
CTL+3MA	10 ± 0	51 ± 10	50 ± 12	45 ± 10
POST	10 ± 0	19 ± 6*†	19 ± 6*†	21 ± 8*†
POST-L	10 ± 0	24 ± 10*†	21 ± 10*†	20 ± 10*†
POST+3MA	10 ± 0	49 ± 14	49 ± 14	47 ± 15
CF (ml/min/g)				
CTL	22 ± 10	17 ± 9	16 ± 9	15 ± 9
CTL+3MA	19 ± 5	14 ± 5	12 ± 6	11 ± 5
POST	20 ± 4	16 ± 3	15 ± 4	14 ± 4
POST-L	23 ± 5	16 ± 4	15 ± 4	14 ± 4
POST+3MA	21 ± 6	14 ± 7	13 ± 6	12 ± 6

Table 1: Data are presented as mean ± SD. LVDP=left ventricular developed pressure; LVEDP=left ventricular end-diastolic pressure; CF=coronary flow. CTL=control; POST=postconditioning; POST-L=postconditioning long. *p<0.05 vs. CTL. †p<0.05 vs. POST+3MA. n=8 for each group.

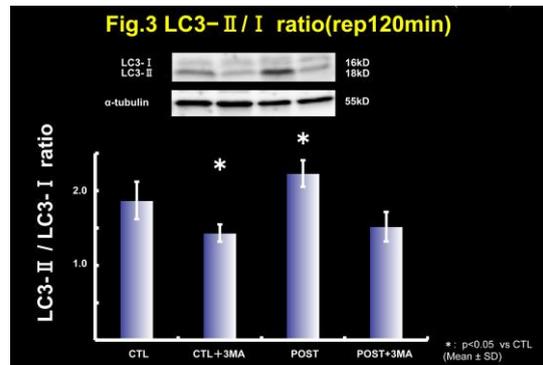
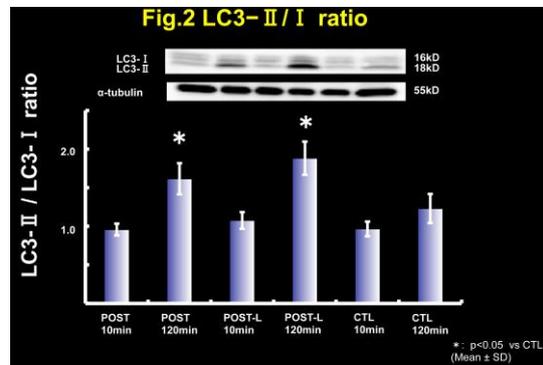
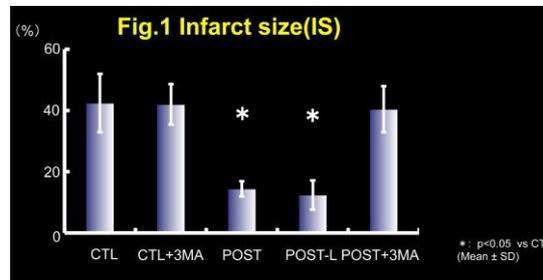


Fig. 4

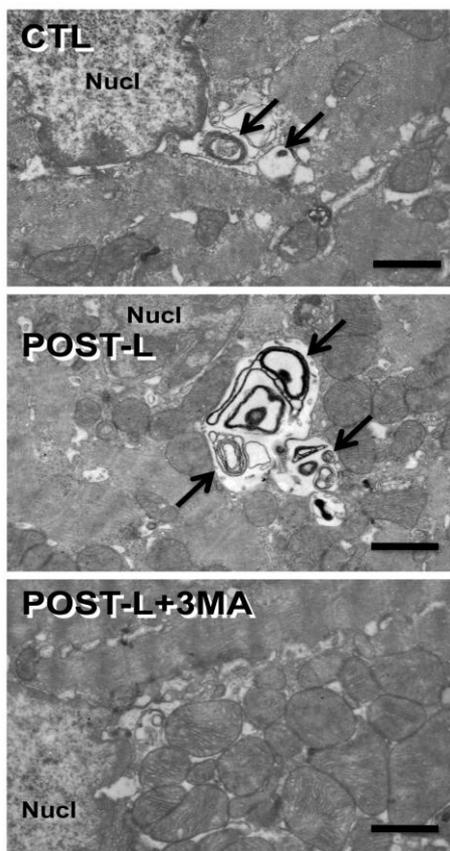
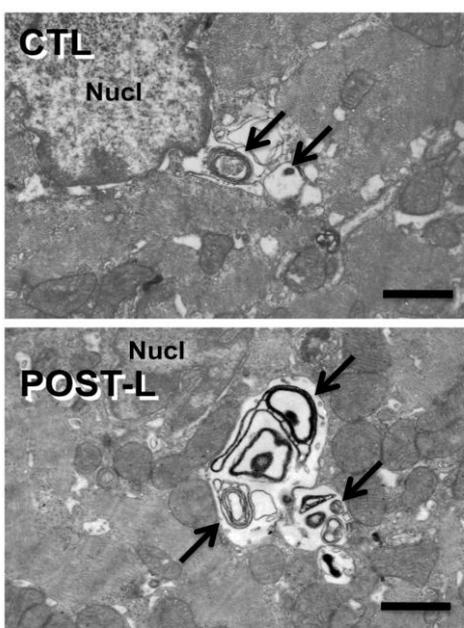


Fig. 5



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) Onishi A, Miyamae M, Inoue H, Kaneda K, Okusa C, Inamura Y, Shiomi M, Koshinuma S, Momota Y, Figueredo VM. Sevoflurane confers additive cardioprotection to ethanol preconditioning associated with enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2012 in press. 査読有
DOI : 10.1053/j.jvca.2012.10.002.

[学会発表] (計7件)

(1) 越沼 静. 心筋虚血再灌流障害における necroptosis の関与. 第40回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2012.10.6. アクロス福岡 (福岡市)

(2) 稲村吉高. セボフルランポストコンディショニングの虚血心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要である. 第40回日本歯科麻酔学会総会・学術集会 2012.10.6. アクロス福岡 (福岡市)

(3) 大西杏奈. セボフルラン・エタノールによる心筋プレコンディショニングの細胞内メカニズムの解明. 第9回日本歯科麻酔学会中国・四国地方会 2012.7.29. 岡山大学 (岡山市)

(4) 稲村吉高. セボフルランポストコンディショニングの虚血心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要である. 日本麻酔科学会第59回学術集会 2012.6.8. 神戸国際会議場 (神戸市)

(5) 塩見真由美. 心筋虚血前のオートファジーの誘導は長時間虚血により消失したセボフルランプレコンディショニング効果を回復させる. 日本麻酔科学会第59回学術集会 2012.6.8. 神戸国際会議場 (神戸市)

(6) Inamura Y. Sevoflurane postconditioning reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by induction of autophagy in isolated guinea pig hearts. 9th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD) from Prevention to Intervention 2011 2011.10.25.

Venive (Italy)

(7)Okusa C. Dipyridamole-induced cardiac preconditioning persists for 3 days after discontinuing therapy and is mediated through Akt activation. 9th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD) from Prevention to Intervention 2011 2011.10.25. Venive (Italy)

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲村 吉高 (INAMURA YOSHITAKA)

大阪歯科大学・歯学部・講師 (非常勤)

研究者番号 : 80595794