

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592300

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬の心保護作用におけるGLP-1受容体の役割

研究課題名(英文) Role of GLP-1 in volatile anesthetic induced cardiac protection

研究代表者

大下 修造 (OSHITA, Shuzo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師

研究者番号：60144945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：GLP-1受容体拮抗剤を前投与することで、GLP-1および吸入麻酔薬によるプレコンディショニング心筋保護作用が棄却されることを示した。このことより、吸入麻酔薬による心筋保護作用がGLP-1を介して発現することが明らかとなった。

さらに、GLP-1受容体抗体とメディエーターの抗体とを共に蛍光抗体反応させ、共焦点顕微鏡を使用しタンパクの局在を同定した。また、ミトコンドリア膨化アッセイ等を用いて、GLP-1のプレコンディショニング作用に心筋保護作用があること、また、これらの作用が各種メディエーターを介して発現していること、そして最終的にはミトコンドリア機能に影響していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Exendin-4, GLP-1 receptor agonist, protected cardiac myocytes (CM) from ischemia-reperfusion. Additionally, myocardial infarct size was smaller in the isoflurane- [1.0 minimum alveolar concentration (MAC)] or exendin-4- (30 ng/kg i.v.) treated groups than the controls. Infarct size was not affected by isoflurane at 0.5 MAC or 3 ng/kg i.v. exendin-4, but the combination of these treatments reduced infarct size.

Immunofluorescence analysis of the expression and colocalization of caveolin-3 (Cav-3) and GLP-1R in cardiac myocytes. Fluorescent secondary antibodies were used to determine Cav-3 and GLP-1R localization, and strong colocalization were observed on the cell surface membrane. Additionally, these preconditioning significantly attenuated the calcium-induced swelling compared with the control.

研究分野：麻酔科学

キーワード：GLP-1受容体 虚血再灌流障害 吸入麻酔薬

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症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。

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)と呼ばれるこの現象は、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る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有するものと考えられている。

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。さらに、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: 465-73, 2002)、心機能の制御や虚血に対する心保護作用についても報告されている。また、GLP-1がIPCの作用経路に関与していることが明らかになった(Bose et al. Diabetes 54:146-51, 2005)。しかし、APCによる心筋保護作用がIPC作用同様にGLP-1により誘導されるかどうかは明らかではない。

2. 研究の目的

吸入麻酔薬であるイソフルランには心筋保護効果があることが知られているが、そのメカニズムの全容は明らかではない。近年、小腸のL細胞から分泌されるGlucagon-Like Peptide (GLP-1)が心筋保護に関与する可能性があると報告された(Bose et al. Diabetes 54:146-51, 2005)。

本研究は、イソフルランによる心筋保護作用にGLP-1受容体に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ことを目的とする。

そこで、申請者は以下の仮説を立てた。吸入麻酔薬投与でGLP-1により修飾を受けたタンパクが心筋保護作用を誘導する。吸入麻酔薬投与によりGLP-1受容体が活性化し、メディエーター・エンドエフェクター等を介し心筋保護作用が発現している。

3. 研究の方法

実験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APC刺激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およびGLP-1受容体阻害剤を前投与しAPC作用の関与を明らかにする。

実験2.

in vivo 虚血再灌流モデルを用いて対照群、APC群において心筋梗塞サイズを測定比較する。

実験3.

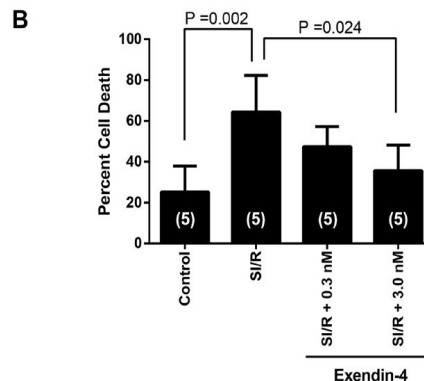
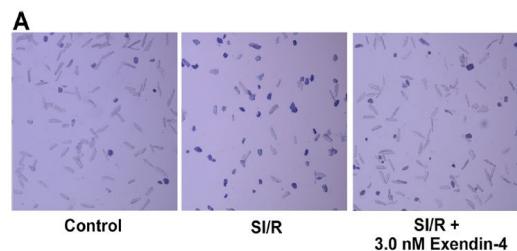
APC刺激後のGLP-1受容体活性を確認する。また、メディエーターがGLP-1受容体活性作用によってどのように影響を受けるかを検討する。

4. 研究成果

実験1.

マウスの摘出心を酵素法にて灌流、得られた遊離心室筋細胞をディッシュに接着させ、特殊チャンバーを用い、吸入麻酔薬イソフルランにてAPC刺激を加えた後、2時間低酸素状況(95%N₂, 5%CO₂)に暴露した。トリパンブルー染色し細胞数を数え、生きた細胞の割合を計算し、対照群と比較検討した結果、細胞の生存率はイソフルランによって上昇することが分かった。また、GLP-1群においても生存率が上昇した。

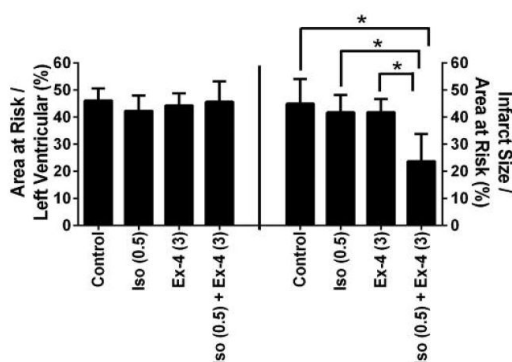
さらに、APC刺激前にGLP-1受容体拮抗剤であるExendinにて細胞をインキュベートし、



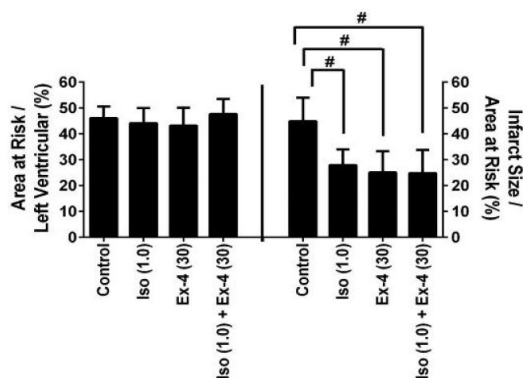
同様の実験を行なった場合、イソフルランの心筋細胞保護作用は棄却された。このことより、GLP-1のAPC誘導性心筋細胞保護作用に及ぼす影響が明らかになった。

実験2.

マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定しながら、イソフルランを用いAPC刺激を30分行った。その後、心臓冠動脈左前下行枝を30分間閉塞し、2時間の再灌流を行う。再び冠動脈を閉塞、Evans Blueを注入し心臓を取り出し、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した。薄い濃度のGLP-1(3ng/kg)、イソフルラン(0.5MAC)は共に心筋梗塞サイズに変化がなかったが、



GLP-1(30ng/kg) イソフルラン(1.0MAC)においては心筋梗塞サイズを減少させた。また、薄い濃度どうしを加えることによって心筋梗塞サイズを減少させることができた。



このことより、APCによる心筋保護作用がGLP-1と相互作用を発現することが明らかとなった。

実験3.

各群の心臓を虚血再灌流前に取り出し、GLP-1受容体抗体とメディエーターの抗体とを共に蛍光抗体反応させ、共焦点顕微鏡を使用しタンパクの局在を同定した。また、ミトコンドリア膨化アッセイによりカルシウムイオン依存性ミトコンドリア膨化がGLP-1によりどのように変化するかを調べた。これらの結果からGLP-1のプレコンディショニング作用に心筋保護作用があること、また、これらの作用が各種メディエーターを介して発現していること、そして最終的にはミトコンドリア機能に影響していることが明らかとなった。

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 8 件)

Eisuke Hamaguchi, Katsuya Tanaka, Rie Tsutsumi, Yoko Sakai, Kohei Fukuta, Asuka Kasai, and Yasuo M. Tsutsumi. Exendin-4, flucagon-like peptide-1 receptor agonist, enhances isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction via caveolins-3 expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 査読有、19: 1285-1290, 2015.

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

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 Sciences* 査読有、101: 43-48, 2014.

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. *Journal of Anesthesia* 査読有、28: 733-739, 2014.

doi: 10.1007/s00540-014-1816-8

Noriko Kambe, Katsuya Tanaka, Nami Kakuta, Ryosuke Kawanishi, and Yasuo M. Tsutsumi. The influence of glucose load on metabolism during minor surgery using remifentanyl-induced anesthesia. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 査読有、58: 948-954, 2014.

doi: 10.1111/aas.12335

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. *Cardiovasclar Diabetology* 査読有、13: 132, 2014.

doi: 10.1186/s12933-014-0132-9.

Yasuo M. Tsutsumi, Yousuke T. Horikawa, Hemal H. Patel, and David M. Roth.

Signaling epicenters: the role of caveolae and caveolins in volatile anesthetic induced cardiac protection. Current Pharmaceutical Design 査読有、20: 5681-5689, 2014

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

Yasuo M. Tsutsumi, Nami Kakuta, Tomohiro Soga, Katsuyoshi Kume, Eisuke Hamaguchi, Rie Tsutsumi, and Katsuya Tanaka. The effects of intravenous fosaprepitant and ondansetron for the prevention of postoperative nausea and vomiting in neurosurgery patients: a prospective, randomized, double-blinded study. Biomedical Research International 査読有、2014: 307025, 2014.

doi: 10.1155/2014/307025

Hiroaki Kawano, Sawa Manabe, Tomomi Matsumoto, Eisuke Hamaguchi, Michiko Kinoshita, Fumihiko Tada, and Shuzo Oshita. Comparison of intraoperative blood loss during spinal surgery using either remifentanyl or fentanyl as an adjuvant to general anesthesia. BMC Anesthesiology 査読有、13: 46, 2013
doi:10.1186/1471-2253-13-46

〔学会発表〕(計 7 件)

角田奈美、瀧口英佑、曾我朋宏、河原富也、小居理恵、田中克哉、堤保夫 周術期の血漿サブスタンスP濃度の推移と術後嘔気・嘔吐 (postoperative nausea and vomiting: PONV) の関連 第34回臨床麻酔学会 プリンスホテル新高輪(東京都・品川区) 11/1/2014

瀧口英佑、角田奈美、曾我朋宏、久米克佳、植村勇太、田中克哉、堤保夫 下肢人工関節置換術における術後悪心・嘔吐予防のランダム化比較試験—ホスアレピタント対オンダンセトロン— 第34回臨床麻酔学会 プリンスホテル新高輪(東京都・品川区) 11/1/2014

堤保夫、角田奈美、久米克佳、曾我朋宏、川西良典、田中克哉 脳神経外科開頭手術後の嘔気・嘔吐に対するニューロキニン1受容体拮抗剤とオンダンセトロンの有効性の比較検討 第61回日本麻酔科学会 横浜コンベンションセンター(神奈川県・横浜市) 5/16/2014

久米克佳、曾我朋宏、瀧口英佑、田中克哉、河原富也、東島祥代、角田奈美、堤保夫 脳神経外科手術後の嘔気・嘔吐に対するニューロキニン1受容体拮抗剤の有効性 第33回臨床麻酔学会 石川県音楽堂(石川県・金沢市) 11/3/2013

Noriko Kambe, Katsuya Tanaka, Nami

Kakuta, Yasuo M. Tsutsumi, and Shuzo Oshita. Short-term simvastatin administration in hyperglycemia rabbits facilitate anesthetic postconditioning. American Society of Anesthesiologist Annual Meeting, San Francisco, USA, October 13, 2013. 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(北海道・札幌市) 5/23/2013

Eisuke Hamaguchi, Shuzo Oshita, Katsuya Tanaka, Rie Tsutsumi, and Yasuo M. Tsutsumi. Glucagon-like peptide-1 induced cardiac protection is dependent on caveolin-3 expression. Experimental Biology Annual Meeting, Boston, USA, April 21, 2013.

〔図書〕(計 1 件)

田中克哉、堤保夫、大下修造、総合医学社 「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」麻酔科学レクチャー編集 澄川耕二 1078(107-115), 2013

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大下 修造 (OSHITA, Shuzo)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師
研究者番号: 60144945

(2) 研究分担者

田中 克哉 (TANAKA, Katsuya)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 30263841

堤 保夫 (TSUTSUMI, Yasuo)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号: 90523499