

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861377

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬の心保護作用における影響 - グルカゴン様ペプチド-1の役割 -

研究課題名(英文) Mechanisms of isoflurane-induced cardiac protection from ischemia/reperfusion injury: a role for glucagon-like peptide-1.

研究代表者

河野 裕明 (KAWANO, Hiroaki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・徳島大学特別研究員

研究者番号：90467811

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)誘導体であるExendin-4または吸入麻酔薬イソフルランを前投与することで虚血再灌流障害における心筋梗塞サイズが減少することを明らかにした。また、イソフルランを加えた場合、GLP-1誘導体を加えた場合においてアポトーシスが抑制されることも明らかにした。さらに、GLP-1受容体拮抗剤を投与することで、これらのプレコンディショニング様心筋保護作用が棄却されることから、GLP-1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した。加えて、これらの心保護作用の経路を明らかにするためイムノブロットング法やリアルタイムPCRを用いて考察を行った。

研究成果の概要(英文)：To assess the role of volatile anesthetic (isoflurane) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the protection from ischemia/reperfusion injury, we tested mice with isoflurane or exendin-4, GLP-1 agonist, and then exposed the mice to ischemia/reperfusion. Similar infarct size reductions were produced by treatment with isoflurane or exendin-4. The cardioprotective effects of these pharmacological preconditioning were abolished in GLP-1 antagonist pretreatment. Furthermore, apoptosis has been evaluated in these preconditionings and we found after 2 hours of reperfusion that apoptosis in myocardium at risk of ischemia is attenuated by preconditionings. Additionally, to determine the downstream mediators of involved in isoflurane or GLP-1 preconditioning, we performed immunoblotting and realtime PCR using preconditioned samples.

研究分野：麻酔科学

キーワード：イソフルラン グルカゴン様ペプチド-1 プレコンディショニング 心筋保護作用

1. 研究開始当初の背景

2012年の厚生労働省の統計調査によると、心疾患の死亡順位は第2位であり、死亡総数に占める割合は15.8%と増加傾向を示した。虚血性心疾患はこのうち約40%を占め、その予防と治療に関する研究の重要性は今後さらに高まると予想される。

1986年、短時間の虚血再灌流を先行させることにより、その後の長時間の虚血に対する心筋梗塞サイズが減少することが報告された (Murry CE et al., Circulation 1986;74: 1124-1136)。この現象は短期虚血によるプレコンディショニング (IPC) と呼ばれ、心筋梗塞患者の予後において梗塞サイズが重要因子であることから、臨床的に有用性の高い発見として注目を浴びた (図1)。そ

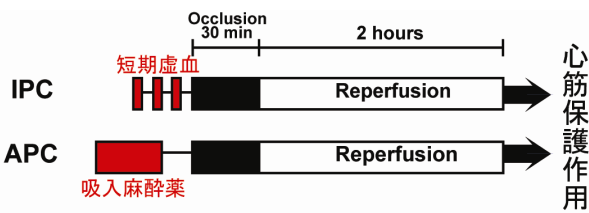


図1. 虚血再灌流モデルのスキーマ

その後20年以上にわたりIPC作用における分子経路に関する研究が行われてきたが、その全容はいまだに明らかではない。

その後の研究により、オピオイドやエリスロポエチンなどの様々な薬剤によっても、IPCと同様の心筋保護効果が得られることが報告されてきた。

吸入麻酔薬であるイソフルランにおいても、先行投与することで同様の心筋保護効果が得られることが示された (Kersten JR et al., Anesthesiology 1996;85: 794-807) (図1)。吸入麻酔薬は、心筋虚血発生のリスクが高い周術期に使用されるため、その臨床的な有用性が期待されている。また、吸入麻酔薬によるプレコンディショニング (APC) はIPCメカニズムと類似した部分が多く、心筋保護作用に対し共通の経路を有すると考えられている。

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: 465-473, 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 54:146-151, 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グルカゴン様ペプチド-1 Glucagon-Like Peptide (GLP-1) が心筋保護に関与する可能性があることが報告された (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、メディエーターを介し心筋保護作用が発現している。

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 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。同様に、GLP-1を前投与しAPC作用の関与を明らかにする。また、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。

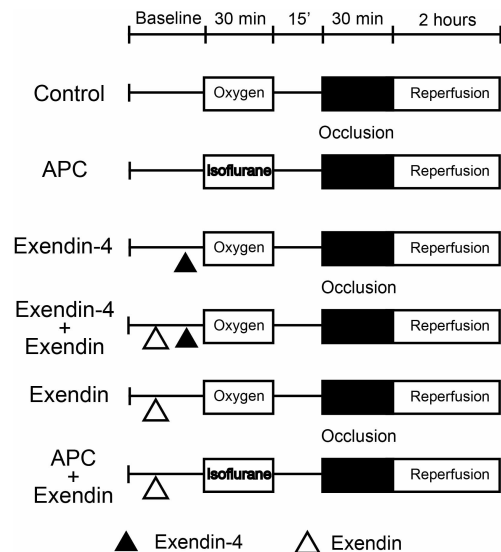
実験2. APC刺激後のGLP-1受容体活性を免疫プロットング法にて確認する。また、心保護作用を発現する経路がGLP-1受容体活性作用によってどのように影響を受けるかを検討する。

これらによって本研究期間内に、GLP-1のAPCに及ぼす影響が明らかとなる。また、心筋保護作用経路におけるGLP-1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、血行動態を測定しながら、APC刺激を30分行う。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。

GLP-1 誘導体である Exendin-4、GLP-1 受容体拮抗剤 Exendin を APC 刺激前に投与し、同様の虚血再灌流実験を行ない、GLP-1 の APC 作用に対する影響を明らかにする。

さらに、各群の組織サンプルを利用し、アポトーシスについて評価を加える（リアルタイム PCR による遺伝子定量、TUNEL 染色）。
実験 2.

実験 1. における各群の心臓を虚血-再灌流前に取りだし、ホモジナイズし、APC 作用のメディエーターと考えられているタンパクが増加しているかどうかをイムノプロットング法にて検討する。また、サンプルから mRNA を抽出し、リアルタイム PCR にて解析し、細胞内分子輸送経路モデルを確立する。

4. 研究成果

実験 1.

マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定しながら、吸入麻酔薬であるイソフルラン刺激（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時間の再灌流を行った。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。それによると、APC刺激によって心筋の梗塞サイズは、コントロール群と比較して有意に減少することが確認された。このことは、以前の報告と同様の結果であり、この実験モデルを使用し、さらに以下のことについて研究を進めた。

グルカゴン様ペプチド 1（GLP-1）誘導体である Exendin-4、GLP-1 受容体拮抗剤 Exendin をコントロール群及び APC 刺激群に投与し、同様の虚血再灌流実験を行ない、GLP-1 の APC 作用に対する影響を明らかにしようと試みた。その結果、Exendin-4 によってコントロール群の心筋梗塞サイズが減少した。このことから、Exendin-4 には APC 刺激と同様の心保護作用が存在することが明らかとなった。また、Exendin-4 および APC 刺激を加えることで、心保護効果は同様に保たれた。

つぎに、GLP-1 受容体の拮抗剤を APC 刺激の前に投与することで APC 刺激による心筋保護作用が棄却されたことから、APC 刺激による心保護作用が、GLP-1 受容体を介していることが推測された。

さらに、アポトーシスにおける考察も行った。リアルタイム PCR を用いて pro-apoptotic gene、anti-apoptotic gene を測定、TUNEL 染色を行うことでイソフルランを加えた場合、GLP-1 誘導体を加えた場合においてアポトーシスが抑制されることが明らかとなった。

以上のことから吸入麻酔薬の心筋保護作用と GLP-1 の関連性が示唆された。

実験 2.

実験 1. で行った実験における各群の心臓を虚血-再灌流前に取りだし、ホモジナイズし、APC 作用のメディエーターと考えられているこれらタンパクが増加しているかどうかをイムノプロットング法にて検討した。また、サンプルから mRNA を抽出し、リアルタイム PCR にて解析し、細胞内分子輸送経路モデルを確立した。

これらの結果から、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ことが明らかとなった。また、メディエーターを介し心筋保護作用が発現していることも併せて明らかとなった。

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 4 件)

Hiroaki Kawano, Naohiro Ohshita, Kimiko Katome, Takako Kadota, Michiko Kinoshita, Yayoi Matsuoka, Yasuo M. Tsutsumi, Shinji Kawahito, Katsuya Tanaka, and Shuzo Oshita.

Effects of a novel method of anesthesia combining propofol and volatile anesthesia on the incidence of postoperative nausea and vomiting in patients undergoing laparoscopic gynecological surgery.

Revista Brasileira de Anestesiologia 査読有、印刷中、2015

doi: 10.1016/j.bjane.2014.07.005

Noriko Kambe, Shinji Kawahito, Naoji Mita, Kazumi Takaishi, Toshiko Katayama, Yoko Sakai, Tomohiro Soga, Hiroaki Kawano, Munehide Matsuhisa, Mitsuo Shimada, Tetsuya Kitagawa and Hiroshi Kitahata.

Impact of newly developed, next-generation artificial endocrine pancreas.

Journal of Medical Investigation 査読有、62: 41-44, 2015

doi: 10.2152/jmi.62.41

Hiroaki Kawano and Tomomi Matsumoto
Anesthesia for arthroscopic shoulder surgery in the beach chair position: monitoring of cerebral oxygenation using combined bispectral index and near-infrared spectroscopy.

Middle East Journal of Anesthesiology 査読有、22: 613-617, 2014

http://www.meja.aub.edu.lb/downloads/22_6/613.pdf

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

〔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

河野 裕明 (KAWANO, Hiroaki)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・徳島大学特別研究員
研究者番号：90467811