

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463071

研究課題名(和文) 長寿遺伝子Sirtuin 3の吸入麻酔薬による心筋保護作用における役割

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

研究代表者

北畑 洋 (KITAHATA, Hiroshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：60161486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの心筋虚血再灌流モデルを用いて、吸入麻酔薬イソフルランの心筋保護作用に、抗老化作用を有するSirtuinおよび細胞膜マイクロドメインを構成するカベオリンが関与していることを明らかにした。

また、遺伝子組み換え動物を使った実験・分子生物学実験などにより、イソフルランの吸入刺激によりSirtuinが誘導され、カベオリンを介した経路によって心筋保護作用を発現する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using the mouse myocardial ischemia-reperfusion model, our results show that, volatile anesthetic-induced cardiac protection is dependent on an anti-aging gene, sirtuin, and a membrane microdomain, caveolin. Additionally, our results suggest that caveolin within the heart are critical for sirtuin-induced cardiac protection via volatile anesthetics.

研究分野：医歯薬学

キーワード：心筋保護作用 Sirtuin カベオリン プレコンディショニング イソフルラン 吸入麻酔薬 虚血再灌流障害 細胞膜マイクロドメイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。

(2) 細胞膜マイクロドメインであるカベオラは細胞膜に存在する直径 50-100 nm 前後の陥凹であり、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメインと称され、細胞膜のシグナル伝達、エンドサイトーシスなどの断片的な性質は明らかにされてきた。カベオリンはカベオラを構成する構成タンパクであり、異なる遺伝子でコードされるカベオリン-1,2,3 が同定されている。カベオリンは両末端が細胞質側に露出し脂質分子と結合しシグナル伝達に関与すると考えられる。特に、カベオリン骨格ドメインと呼ばれる部分は多くのシグナル伝達関連分子に結合するだけでなくそれらの機能制御にも関与すると考えられている。

(3) 1996 年に Kersten 等によって吸入麻酔薬を投与することで心筋保護効果が得られることが報告された (*Anesthesiology* 1996;85:794-807)。以来、この麻酔薬によるプレコンディショニング作用 (APC) に対し様々な考察が行われてきたが、そのメカニズムは未だに全て明らかになってはいない。近年、申請者らの研究グループは吸入麻酔薬によって細胞膜カベオラ数が増加し、カベオリンを介した心筋保護作用が活性化されることを突き止め (*FASEB J* 2007;21:1565-74, *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:123-30, *Anesthesiology* 2010;112:1136-1145)、細胞膜マイクロドメインであるカベオラおよびカベオリン-3 が心筋保護作用に重要な役割を担っていることを明らかにした。

(4) サーチュイン Sirtuin (Sirt) ファミリー蛋白質は、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。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注目を浴びている。ヒトにおいては 7 種類の Sirt が存在することが分かっており、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。しかし、APC による心筋保護作用と Sirt との関与を示した報告はなく、さらに、この保護作用がカベオラおよびカベオリンを介しているかを調べた研究はない。

## 2. 研究の目的

本研究において申請者らは、吸入麻酔薬の投与で Sirt の発現が増加し、細胞膜マイクロドメイン (カベオラ・カベオリン) を介して心保護作用が誘導されることを明らかにする。上記の仮説を検証するため以下の実験を行なう。

実験 1. APC 刺激後の Sirt 発現を RT-PCR 法およびイムノプロットング法にて確認する。

実験 2. 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、Sirt の誘導剤を投与し Sirt の作用を明らかにする。

実験 3. 実験 2. の各群においてカベオリンの活性化をイムノプロットング法、蛍光抗体法にて確認し、その Sirt の関与を明らかにする。

実験 4. カベオリン-3 ノックアウトマウスを用い実験 2. の各群に対して心筋梗塞サイズを測定し、カベオリン-3 の影響を明らかにする。カベオラは、その構造を構成タンパクであるカベオリン-3 に依存しているため、カベオリン-3 ノックアウトマウスにはカベオラ構造が存在しない (図 1)。

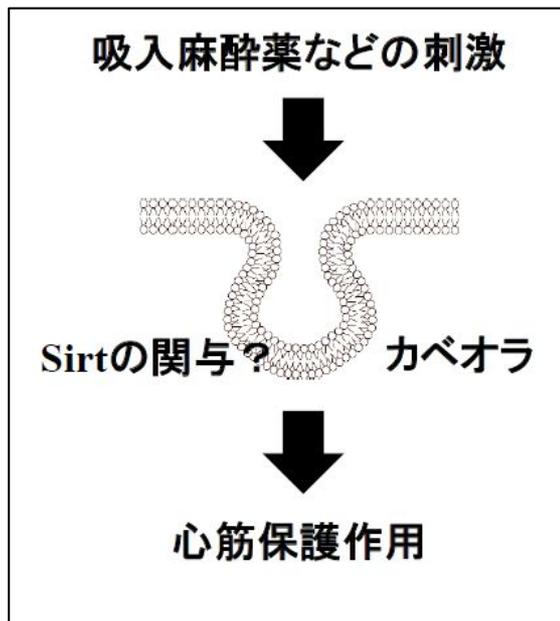


図 1 細胞膜の陥凹構造であるカベオラ

## 3. 研究の方法

### 実験 1.

C57BL/6 マウスに吸入麻酔薬イソフルランを 30 分間 1.0 MAC 吸入させ、続いて 15 分間 washout した後 (APC 刺激)、心室筋を分離してホモジナイズしリアルタイム PCR 法を用いて mRNA レベルにおいて Sirt の発現が増加しているか Control 群と比較検討した。

## 実験 2.

C57BL/6 マウスを 3 群に分け、人工呼吸下に Sirt 群は Sirt の誘導薬である resveratrol (10mg/kg) を冠動脈閉塞 60 分前に投与し、APC 群はイソフルラン (1MAC) を冠動脈閉塞前に 30 分間吸入後、15 分間 washout した。Control 群は前処置なしで開胸した。全群ともに左冠動脈前下行枝を 30 分間閉塞し、120 分間の再灌流を行った。心筋梗塞危険領域を同定するため、再び左冠動脈前下行枝を閉塞、10% Evans blue を注入し心臓を摘出した。心臓の横断スライスを作成し、1% triphenyltetrazolium chloride で染色した。心筋梗塞範囲、梗塞危険領域および全左室の重量、各重量比を計測した(図 2)。

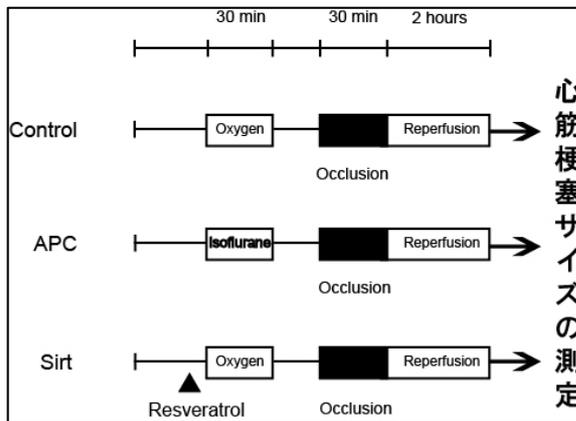


図 2 実験 2 プロトコール

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イムノプロットング法で評価を加えた。

## 実験 3.

実験 2. の各群のマウスの摘出心を用い Sirt とカベオリン-3 を共に蛍光抗体を反応させ、共焦点顕微鏡を使用しタンパクの局在を同定した。また、カベオリン-3 の活性をイムノプロットング法にて確認した。

## 実験 4.

実験 2. と同様の方法でマウスをカベオリン-3 ノックアウトマウスに替えて Control 群、APC 群、Sirt 群の 3 群に分けて虚血再灌流実験を行った。

### 4. 研究成果

(1) Sirt の mRNA の発現レベルは、Control 群に比べて APC 群で有意に高かった ( $1.230 \pm 0.263$  vs.  $3.449 \pm 0.797$ ) (図 3)。

(2) Control 群 ( $41 \pm 4\%$ ,  $n=8$ ) と比較し、Sirt 群、APC 刺激群では心筋梗塞/梗塞危険領域比が有意に減少した ( $30 \pm 7\%$ ,  $28 \pm 6\%$ ,  $P < 0.05$ ) (図 4)。

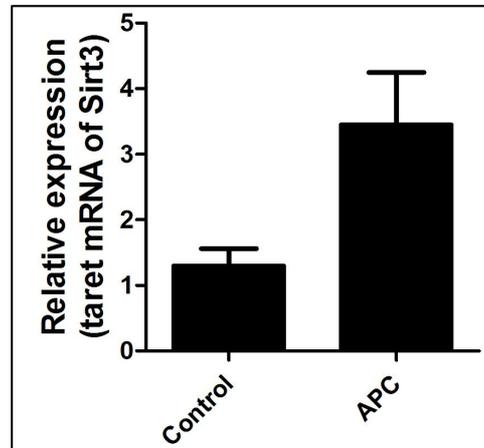


図 3 Sirt の mRNA レベル

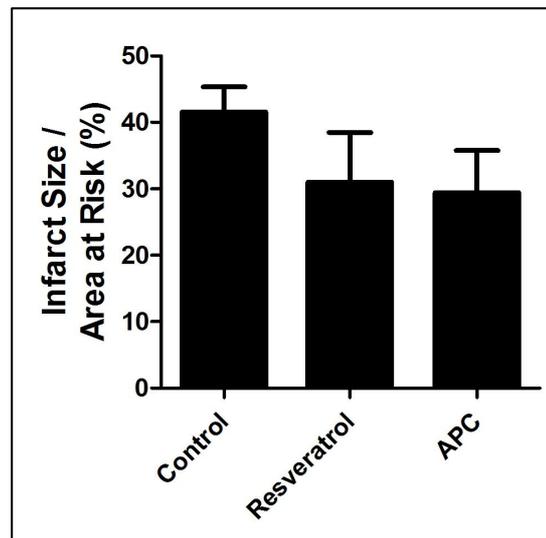


図 4 各群における心筋梗塞/梗塞危険領域の重量比

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イムノプロットング法にて評価を加えた結果、anti-apoptotic 遺伝子の活性が Sirt 群および APC 群で認められた。

(3) 共焦点顕微鏡を用い、Sirt とカベオリン-3 の蛍光抗体にて反応させると、これらが共発現していることが明らかとなった。このことは Sirt とカベオリン-3 の抗体を用いた免疫沈降法によっても確認された。

(4) カベオリン-3 ノックアウト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 分間閉塞し、2 時間の再灌流を行った。心臓を取り出し、再染色後心筋梗塞サイズを測定した。野生型マウスで認められた APC 群・Sirt 群による心筋保護作用は、ノックアウトマウスにおいてはその作用が棄却された。

これらのことより、吸入麻酔薬・Sirt による心筋保護作用はカベオリンを介しているこ

とが明らかになった。また、虚血再灌流障害に対する APC 心筋保護の作用経路における Sirt の果たす役割、カベオリンを介した心筋保護作用に与える影響が明らかになった。

#### 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7件)

Naoji Mita, Shinji Kawahito, Tomohiro Soga, Kazumi Takaishi, Hiroshi Kitahata, Munehide Matsuhisa, Mitsuo Shimada, Hiroyuki Kinoshita, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuya Tanaka. Strict blood glucose control by an artificial endocrine pancreas during hepatectomy may prevent postoperative acute kidney injury. *Journal of Artificial Organs* 20:76-83, 2017. 査読有

DOI: 10.1007/s10047-016-0925-6.

Ryo Otsuka, Nagakatsu Harada, Shouhei Aoki, Kanna Shirai, Kazuchika Nishitsuji, Ayane Nozaki, Adzumi Hatakeyama, Masayuki Shono, Noriko Mizusawa, Katsuhiko Yoshimoto, Yutaka Nakaya, Hiroshi Kitahata, Hiroshi Sakaue. C-terminal region of GADD34 regulates eIF2 dephosphorylation and cell proliferation in CHO-K1 cells. *Cell Stress and Chaperones* 21:29-40, 2016. 査読有

DOI: 10.1007/s12192-015-0633-9

Michiko Kinoshita, Yasuo M. Tsutsumi, Kohei Fukuta, Asuka Kasai, and Katsuya Tanaka. Isoflurane-induced postconditioning via mitochondrial calcium-activated potassium channels. *Journal of Medical Investigation* 63: 80-84, 2016. 査読有

[http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol63/pdf/v63\\_n1-2\\_p080.pdf](http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol63/pdf/v63_n1-2_p080.pdf)

Eisuke Hamaguchi, Katsuya Tanaka, Rie Tsutsumi, Yoko Sakai, Kouhei Fukuta, Asuka Kasai, Yasuo M. Tsutsumi.

Exendin-4, glucagon-like peptide-1 receptor agonist, enhances isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction via caveolin-3 expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 19:1285-1290, 2015. 査読有  
<http://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/1285-1290.pdf>

Noriko Kambe, Shinji Kawahito, Kazumi Takaishi, Toshiko Katayama, Yoko Sakai, Tomohiro Soga, Hiroaki Kawano, M Munehide Matsushita, Mitsuo Shimada, Tetsuya Kitagawa, Hiroshi Kitahata. Impact of newly developed,

next-generation artificial endocrine pancreas. *Journal of Medical Investigation* 62:41-44, 2015. 査読有  
[http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol62/pdf/v62\\_n1-2\\_p041.pdf](http://medical.med.tokushima-u.ac.jp/jmi/vol62/pdf/v62_n1-2_p041.pdf)  
Yasuo M. Tsutsumi, Rie Tsutsumi, Eisuke Hamaguchi, Yoko Sakai, Asuka Kasai, Yoshihiro Ishikawa, Utako Yokoyama, Katsuya Tanaka. Exendin-4 ameliorates cardiac ischemia/reperfusion injury via caveolae and caveolins-3. *Cardiovascular Diabetology* 13: 132, 2014. 査読有  
DOI: 10.1186/s12933-014-0132-9.  
Yasuo M. Tsutsumi, Rie Tsutsumi, Horikawa T. Yousuke, Yoko Sakai, Eisuke Hamaguchi, Hiroshi Kitahata, Asuka Kasai, Noriko Kambe, Katsuya Tanaka. Geranylgeranylacetone and volatile anesthetic-induced cardiac protection synergism is dependent on caveolae and caveolin-3. *Journal of Anesthesia* 28:733-739, 2014 査読有  
DOI: 10.1007/s00540-014-1816-8.

##### [学会発表](計8件)

川人伸次, 曾我朋宏, 箕田直治, 堤保夫, 田中克哉, 高石和美, 北畑洋, 木下浩之 シンポジウム「神経調節による循環制御」カリウムチャンネルと循環 第37回日本循環制御医学会総会 2016年7月8日 ステーションコンファレンス東京(東京都・千代田区)

堤保夫、香留希実子、濱口英佑、酒井陽子、北畑洋、田中克哉 イソフルランによる心筋保護作用はSirtによるOpa-1制御を介する。日本麻酔科学会第63回学術集会 2016年5月26日 マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)

Rie Tsutsumi, Yasuo M. Tsutsumi, David M. Roth, Hemal H. Patel, Katsuya Tanaka, Hiroshi Sakaue. Leucine induces cardioprotection by promoting mitochondrial fusion via mTOR and Opa-1 signaling in vitro and diet induced obese mice. Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology. Westin Miyako Kyoto (Kyoto・Kyoto), October 28, 2015.

Naoji Mita, Shinji Kawahito, Tomohiro Soga, Katsuya Tanaka, Kazumi Takaishi, Hiroshi Kitahata. Good glucose control by artificial endocrine pancreas during hepatectomy prevents postoperative acute kidney injury. The Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists. San Diego (USA), October 27, 2015.

角田奈美、川人伸次、曾我朋宏、片山俊子、多田文彦、堤保夫、田中克哉、高石

和美、北畑洋 小児体外循環中の血糖値  
連続モニタリングシステムの精度 第21  
回日本小児麻酔学会 2015年8月29日  
東京国際交流館(東京都・江東区)  
Hiroshi Kitahata, Yasuo M. Tsutsumi,  
Tomohiro Aoyama, Kazumi Takaishi,  
Shinji Kawahito, Katsuya Tanaka. Role  
of sirtuins in cardioprotection by  
ischemic and anesthetic  
preconditioning. The European  
Anaesthesiology Congress,  
Euroanaesthesia 2015. Berlin  
(Germany), June 1, 2015.  
Kazumi Takaishi, Shinji Kawahito,  
Tomohiro Soga, Ryo Otsuka, Yasuo M.  
Tsutsumi, Hiroshi Kitahata. Effects of  
beta-3 adrenergic stimulation on  
nitric oxide production in myocardial  
cells of neonatal rats. The European  
Anaesthesiology Congress,  
Euroanaesthesia 2015. Berlin (Germany),  
May 31, 2015.  
Kazumi Takaishi, Shinji Kawahito,  
Tomohiro Aoyama, Ryo Otsuka, Hiroshi  
Kitahata. The effects of intravenous  
anesthetics on cell migration using  
cultured human umbilical vein  
endothelial cells. IARS 205 Annual  
Meeting and International Science  
Symposium. Honolulu (USA), March 22,  
2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北畑 洋 (KITAHATA, Hiroshi)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学  
系)・教授  
研究者番号: 6 0 1 6 1 4 8 6

### (2) 研究分担者

堤 保夫 (TSUTSUMI, Yasuo)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学  
系)・准教授  
研究者番号: 9 0 5 2 3 4 9 9

川人 伸次 (KAWAHITO, Shinji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学  
系)・特任教授  
研究者番号: 6 0 2 8 4 2 9 6

高石 和美 (TAKAISHI, Kazumi)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号: 2 0 3 2 5 2 8 6