

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11325

研究課題名(和文) 気管支平滑筋における静脈麻酔薬のインフラマソーム抑制作用

研究課題名(英文) Effect of intravenous anesthetic agent on inflammasome in human bronchial smooth muscle cell

研究代表者

松本 裕子 (MATSUMOTO, Hiroko)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：50221594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器疾患の既往を持った患者の周術期呼吸管理を行うにあたり、それらの患者に対する静脈麻酔薬の影響を検討することは重要である。本研究では、ヒト気管支平滑筋細胞および肺胞上皮細胞由来培養細胞を用いてAkt伝達経路におけるプロポフォールの影響について検討した。プロポフォールはGSK-3のリン酸化を促進することによって細胞周期を進行させ、抗アポトーシス作用を現す可能性が示唆された。さらに、プロポフォールはHydrogen peroxideによるアポトーシス制御因子のBcl-2、Bcl-xL発現抑制に対して拮抗的に作用することから、NLRP1インフラマソームに対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では呼吸器系組織由来培養細胞に対する静脈麻酔薬プロポフォールの作用を検討したところ、Akt伝達経路を介して抗アポトーシス作用を示すことが示唆された。気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患などの呼吸器疾患の既往を持った患者の周術期呼吸管理を行うにあたり、それらの患者に対する静脈麻酔薬の影響を検討することは、静脈麻酔薬の適正かつ有効な使用に貢献するものと思われる。本研究成果は基礎研究段階であるが、プロポフォールの適正使用を検討するにあたり重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Propofol is an intravenous anesthetic agent widely used to introduce and maintain anesthesia during oral surgical procedures. It is quite important to know the effect of intravenous anesthetic agent on perioperative management of patients with respiratory diseases. The present investigation was undertaken to clarify the effect and mechanism of propofol on apoptosis in respect to Akt signaling pathway in human bronchial smooth muscle cell and alveolar epithelial cells. Propofol decreased P21Waf1/Cip1 expression through decreasing Akt phosphorylation and increasing GSK-3 phosphorylation. These results suggest that propofol reduces apoptosis by affecting cell cycle through the Akt/GSK-3/P21Waf1/Cip1 pathway in alveolar epithelial cells. Furthermore, there is a possibility that propofol has the inhibitory effect to expression of NLRP1 inflammasome, because propofol up-regulated the reduction of Bcl-2 and Bcl-xL expression induced by hydrogen peroxide in alveolar epithelial cells.

研究分野：薬理学

キーワード：静脈麻酔薬 プロポフォール 抗アポトーシス作用

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 , CK - 19 (共通)

1 . 研究開始当初の背景

静脈麻酔薬 プロポフォールは急性肺傷害患者における静脈内鎮静法にしばしば使用されている . プロポフォールの抗炎症・免疫作用や抗アポトーシス作用が注目されており , それらの作用が急性肺傷害患者の予後を改善する可能性が示唆されている . しかしながら , その作用機序に関しては不明な点が多い .

我々はこれまでに , プロポフォールはリポ多糖 (lipopolysaccharide ; LPS) による Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) , macrophage migration inhibitory factor (MIF) , interleukin-6 (IL-6) , interleukin-8 (IL-8) および SERPINE1 の分泌を抑制することを報告している . 中でも , MCP-1 の抑制率が 40.79% と顕著であったことから , MCP-1 mRNA 発現について検討したところ , プロポフォールは LPS によって誘導された MCP-1 mRNA 発現を抑制した . また , プロポフォールは LPS によって誘導された p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPKinase)(Thr202/Thr204) , SAPK/JNK (Thr183/Thr185) および p38 MAPK (Thr180/Thr182) のリン酸化を抑制した . 同様に p38 MAPK の酵素基質である ATF-2 (Thr71) や SAPK/JNK の酵素基質である c-Jun (Ser73) のリン酸化も抑制した . したがって , プロポフォールは MAP kinase や転写因子のリン酸化を抑制することにより , MCP-1 の発現を抑制する可能性が示唆された . 一方 , プロポフォールは hydrogen peroxide (H₂O₂) による細胞増殖抑制に対して拮抗的に作用すると共に , Sub-G1 相への細胞の移行を抑制した . さらに , プロポフォールは LPS と同様に H₂O₂ によって誘導された c-Jun (Ser73) のリン酸化を抑制した . さらに , プロポフォールは H₂O₂ によって誘導された Bim 発現を抑制し , Bcl-2 と Bcl-xL の発現に対して拮抗的に作用した . したがって , プロポフォールは c-Jun (Ser73) のリン酸化を介して Bcl-2 family member の発現を調節することによって抗アポトーシス作用を示すことが示唆された .

2 . 研究の目的

プロポフォールは , 作用時間が短く , 投与後の蓄積効果が少ないことから , 歯科領域でも広く使われている静脈麻酔薬である . 近年 , プロポフォールの抗炎症・免疫作用や抗アポトーシス作用が注目されており , それらの作用が急性肺傷害患者の予後を改善する可能性が示唆されている . しかしながら , その作用機序に関しては不明な点が多い .

我々はこれまでに , 肺胞上皮細胞において静脈麻酔薬 プロポフォールは MAP kinase や転写因子のリン酸化を抑制することにより , MCP-1 の発現を抑制し , SAPK/JNK と c-Jun (Ser73) のリン酸化を介して Bcl-2 family member の発現を調節することにより , 抗炎症・免疫作用や抗アポトーシス作用を示すことを報告している . 一方 , Akt はサイクリンや CDK 阻害因子に作用し細胞周期を調節すると共に , アポトーシス関連因子に作用し細胞の生存を媒介する主要なメディエーターであることが知られている . また , アポトーシス誘導能を有し , 様々な自己免疫疾患や炎症性疾患に関与することが知られているインフラマソームは caspase-1 , PYCARD , NALP あるいは caspase-5 や caspase-11 から構成されるタンパク質複合体であり , Bcl-2 family member の下流に位置している .

本研究では , 気管支組織由来細胞と肺由来培養上皮細胞を用いて静脈麻酔薬の抗炎症・免疫作用および抗アポトーシス作用のメカニズムについて解明するため , インフラマソームの発現と Akt シグナル伝達経路の調節について検討した .

3 . 研究の方法

(1) アポトーシス解析

肺由来培養上皮細胞 (AECs) にプロポフォール (PPF , 25 μ M) を作用させ , 30 分後に 1 μ M H₂O₂ で刺激した . 刺激 12 時間後に細胞を回収し , ヘキスト染色にてアポトーシス細胞数を測定した .

(2) Western blot analysis

気管支平滑筋細胞 (HBSMC) または肺由来培養上皮細胞 (AECs) にプロポフォール (PPF , 25 μ M) を作用させ , 30 分後に Interleukin-1 β (IL-1 β , 5g/ml) または 1 μ M H₂O₂ で刺激した . 刺激 1 時間または 6 時間後にプロテアーゼ阻害薬を含む Tris-SDS- β ME サンプル処理液にて細胞を回収した . Western blotting 法を用いて炎症関連因子 (SAPK/JNK , cJun , NF- κ B) や Akt シグナル伝達経路関連物質 (Akt , GSK-3 β , PTEN , PDK1 , P21 Waf1/Cip1 , P27 Kip1) の発現とリン酸化について検討した .

4 . 研究成果

(1) 気管支平滑筋細胞における interleukin-1 β 刺激に対するプロポフォールの影響

気管支平滑筋細胞 (HBSMC) にプロポフォール (PPF , 25 μ M) を作用させ , 30 分後に 5g/ml IL-1 β で刺激し , 6 時間後に細胞を回収し , Western blotting 法にて SAPK/JNK , cJun , NF- κ B の発現とリン酸化を検討した .

プロポフォールは IL-1 β によって誘導された cJun の発現と SAPK/JNK と cJun のリン酸化を亢進した。しかしながら、NF- κ B のリン酸化は亢進しなかった。

我々はこれまでに、肺由来培養上皮細胞においてプロポフォールは LPS によって誘導された p44/42 MAPKinas (Thr202/Thr204), SAPK/JNK (Thr183/Thr185) および p38 MAPK (Thr180/Thr182) のリン酸化を抑制し、p38 MAPK の酵素基質である ATF-2 (Thr71) や SAPK/JNK の酵素基質である c-Jun (Ser73) のリン酸化も抑制したことを報告している。したがって、上皮細胞と平滑筋細胞ではプロポフォールに対する感受性が異なる可能性が示唆された。

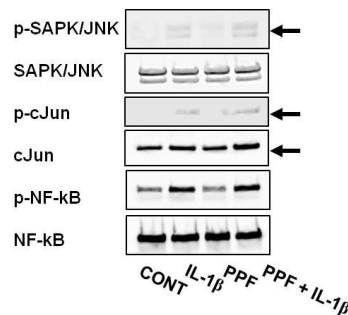


Fig.1. Effect of propofol on H₂O₂-induced Akt activation in AECs.

(2) 肺由来培養上皮細胞 (AECs) におけるアポトーシス誘導に対するプロポフォールの影響

肺由来培養上皮細胞 (AECs) にプロポフォール (PPF, 25 μ M) を作用させ、30 分後に 1 μ M H₂O₂ で刺激し、刺激 12 時間後に細胞を回収し、ヘキスト染色にてアポトーシス細胞数を測定した。

H₂O₂ によってアポトーシス細胞数は増加したが、H₂O₂ でクロマチン凝集を起こしたアポトーシス細胞の割合がプロポフォールによって減少した。

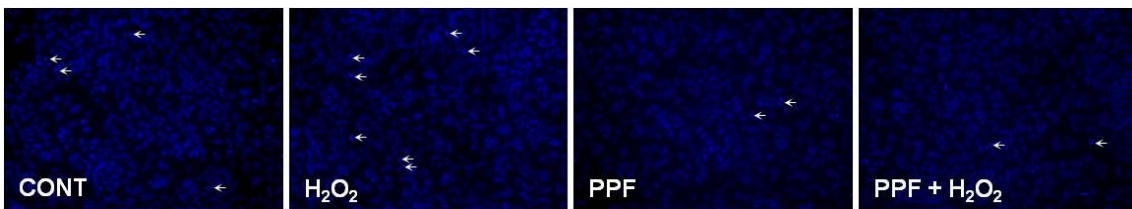


Fig 2. Effect of propofol on the expression of apoptotic cells in AECs.

(3) 肺由来培養上皮細胞 (AECs) における Akt シグナル伝達経路に対するプロポフォールの影響

肺由来培養上皮細胞 (AECs) にプロポフォール (PPF, 25 μ M) を作用させ、30 分後に 1 μ M H₂O₂ で刺激し、1 時間後に細胞を回収し、Western blotting 法にて Akt, GSK-3 β , PTEN, PDK1, P21 Waf1/Cip1, P27 Kip1 の発現とリン酸化を検討した。

プロポフォールは H₂O₂ によって誘導された Akt (Ser473) のリン酸化と P21^{Waf1/Cip1} の発現を抑制する一方で、GSK-3 β (Ser9) のリン酸化を促進した。Akt は GSK-3 β に対して抑制的に作用し、さらに GSK-3 β は CDK 阻害因子である P21^{Waf1/Cip1} に対して抑制的に作用することから、プロポフォールは GSK-3 β のリン酸化を促進することによって細胞周期を進行させ、その結果として抗アポトーシス作用を現す可能性が示唆された。さらに、プロポフォールは H₂O₂ による Bcl-2 や Bcl-xL の発現抑制に対して拮抗的に作用することから、NLRP1 インフラマソームに対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

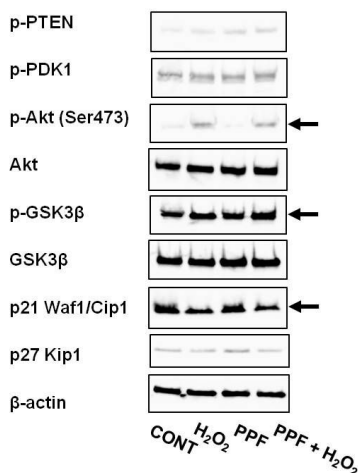


Fig.3. Effect of propofol on H₂O₂-induced Akt activation in AECs.

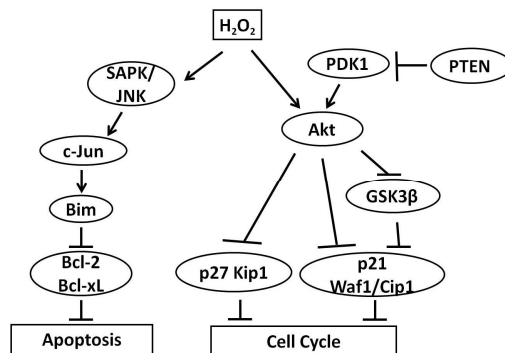


Fig.4. Summary of the findings regarding propofol on signaling pathway.

< 引用文献 >

Wei L, Matsumoto H, Yamaguchi H: Propofol Attenuates Lipopolysaccharide- induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production through p38 MAPK and SAPK/JNK in Alveolar Epithelial Cells, J Anesthesia, 27 (3): 366-373, 2013.

Wei L, Yamaguchi H, Takeuchi R, Matsumoto H, Shibutani K: Propofol Reduces Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis through Down-regulating Bim Expression in Alveolar Epithelial Cells, Int J Oral-Med Sci, 11(4):274-279, 2013.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

Matsumoto H, Yamaguchi H, Takeuchi R, Nishimura H, Komiya M, Shibutani K, Propofol reduces apoptosis through PI3K/Akt pathway in alveolar epithelial cells, 97th IADR, 2019.

松本裕子, 山口秀紀, 小野真紀子, 竹内麗理, 小宮正道, 渋谷 鑛, H2O2 によって誘導された Akt 活性化に対するプロポフォールの影響, 第 38 回日本歯科薬物療法学会, 2018.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 渋谷 鑛

ローマ字氏名: SHIBUTANI, koh

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 松戸歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 70130523

研究分担者氏名: 山口 秀紀

ローマ字氏名: YAMAGUCHI, hidenori

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 松戸歯学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 50220273

研究分担者氏名: 小宮 正道

ローマ字氏名: KOMIYA, masamichi

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 松戸歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40186812

研究分担者氏名: 小野 真紀子(池田 真紀子)

ローマ字氏名: ONO, makiko (IKEDA, makiko)

所属研究機関名: 日本大学

部局名: 松戸歯学部

職名: 助手

研究者番号(8桁): 00267113

(2018年4月24日 研究分担者から削除)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。