

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20046

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬のポストコンディショニング効果におけるGLP-1受容体の役割

研究課題名(英文) Role of GLP-1 receptor in volatile anesthetic-induced postconditioning in mice.

研究代表者

浜口 英佑 (HAMAGUCHI, Eisuke)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60709575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000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、心筋梗塞サイズを測定することで、吸入麻酔薬イソフルラン・グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) にポストコンディショニング刺激による心筋保護作用が存在することを確かめた。また、この吸入麻酔薬の心筋保護作用にGLP-1受容体が関与していることを明らかにした。さらに、GLP-1受容体を介した吸入麻酔薬の心筋保護作用に関連する作用経路についての考察を加えた。

研究成果の概要(英文)：We confirmed volatile anesthetic-induced and GLP-1-induced cardiac postconditioning protects against ischemia-reperfusion injury in mice. Additionally, our results show that volatile anesthetic-induced cardiac postconditioning protection is dependent on GLP-1 activation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 イソフルラン ポストコンディショニング 心筋保護 虚血再灌流障害 GLP-1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 2003年、長時間の虚血の直後に短時間の虚血再灌流操作をくり返すことによって、心筋梗塞サイズが減少するという報告がなされた (Zhao et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:579-588)。短期虚血によるポストコンディショニング (IPostC) 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は、心筋梗塞患者の救命につながるため、その後長年にわたり IPostC 作用における分子経路の解明が試みられてきたが、その内容は未だ明らかではない。

(2) 近年、オピオイドやアデノシンなど IPostC 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同様の心筋保護効果が得られることが報告された (Chiari PC et al., *Anesthesiology* 2005;102: 102-109)。この吸入麻酔薬によるポストコンディショニング (APostC) は IPostC 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有するものと考えられている。

(3) GLP-1 は小腸の L 細胞から分泌されるペプチドで、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。近年の研究により、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* 2002;173:465-473)、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た。さらに、GLP-1 が IPostC 作用に関与していることが明らかになっている (Salling et al., *Regul Pept* 2012;178: 51-55)

## 2. 研究の目的

先の研究で我々は、GLP-1 の心筋保護作用には細胞膜マイクロドメインの構造タンパクである caveolin-3 の発現が必要であることを明らかにした (*Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 132)。Caveolin-3 は吸入麻酔薬の心保護作用に重要であることがすでに判明しているが、GLP-1 と吸入麻酔薬の心保護作用の関連を直接的に示した研究はこれまでに存在しない。これらの知見にもとづき、申請者は以下の仮説を立てた。

**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て心筋保護作用が発現する。**

上記の仮説を検証するため以下の実験を行

なう。

### 実験 1.

マウス in vivo 虚血再灌流モデルを用いて、APostC 群 (対照群) と APostC+GLP-1 受容体阻害薬投与群の心筋梗塞サイズを測定比較し、APostC 作用の関与を明らかにする。

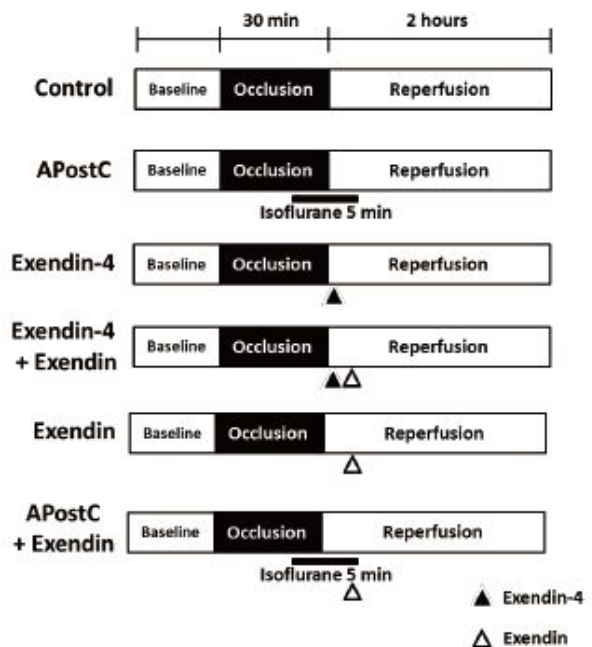
### 実験 2.

APostC 刺激後の GLP-1 受容体タンパクの発現をイムノプロットング法にて確認する。また、心保護作用経路に関与する既知のメディエーターの蛋白発現量が GLP-1 受容体拮抗薬投与により、どのように影響を受けるかを検討する。

## 3. 研究の方法

### 実験 1.

マウスを人工呼吸下に開胸、血行動態を測定する。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。虚血末期から再灌流早期にかけてイソフルランの吸入を 5 分間行う。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、Triphenyltetrazolium chloride 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 受容体拮抗薬 Exendin を APostC 刺激に併用し、同様の虚血再灌流実験を行ない、GLP-1 の APostC 作用に対する影響を明らかにする。



実験1のスキーム

### 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、APostC 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

ッティング法にて検討する。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

(1) GLP-1 誘導体である Exendin-4、GLP-1 受容体拮抗薬 Exendin をイソフルラン 1MAC (Minimum Alveolar Concentration) 5 分間のポストコンディショニング 刺激に併用し、同様の虚血再灌流実験を行ない、GLP-1 の APostC 作用に対する影響を明らかにした結果、イソフルランは心筋保護作用を有し、GLP-1 受容体はその作用を増強、受容体拮抗剤では祖の心筋保護作用が棄却された。

(2) 各群の心臓を取り出し、ホモジナイズし、タンパク定量を行い心筋保護ポストコンディショニング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ブロットング法にて検討した。何も刺激をしていない虚血再灌流のみのコントロール群と比較した結果、Akt、GSK3、PI3K のタンパク発現がイソフルランおよび GLP-1 によってポストコンディショニング 刺激を行った場合に増加していることが明らかとなった。さらに、摘出心臓を用い組織切片を作成し、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。その結果、イソフルランによるポストコンディショニング 刺激を行うと GLP-1 受容体抗体 (赤色蛍光物質を結合) と上記タンパク質 (緑色蛍光物質を結合) が共発現している黄色発光割合がコントロール群と比較して増加していることが共焦点顕微鏡にて認められた。これらの結果からイソフルランにおけるポストコンディショニング様心筋保護作用は Akt、GSK3、PI3K の経路を介し、それらの発現には GLP-1 受容体も重要な役割を演じていることが明らかになった。

これらによって GLP-1 の心筋保護作用経路における APostC に及ぼす影響が明らかとなった。

#### 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5件)

Siho Satomi, Asuka Kasai, Eisuke Hamaguchi, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuya Tanaka. Normothermic cardiopulmonary bypass in patient with Waldenstrom's macroglobulinemia and

cryoglobulinemia: Case report. A&A Case Reports. 2017 印刷中 査読有  
Naoji Mita, Shinji Kawahito, Tomohiro Soga, Toshiko Katayama, Narutomu Wakamatsu, Tomiya Kawahara, Nami Kakuta, Eisuke Hamaguchi, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuya Tanaka, Kazumi Takaishi, Hiroshi Kitahata. Anesthetic management of a patient with unruptured sinus of Valsalva aneurysm with right ventricular outflow tract obstruction. Circulation Control. 37: 195-198, 2016. 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ccm/37/3/37\\_195/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ccm/37/3/37_195/_pdf)  
Rie Tsutsumi, Nami Kakuta, Takako Kadota, Takuro Oyama, Katsuyoshi Kume, Eisuke Hamaguchi, Noriko Kiki, Katsuya Tanaka, Yasuo M. Tsutsumi. Effect of oral carbohydrate with amino acid solution on the metabolic status of patients in the preoperative period: a randomized, prospective clinical trial. Journal of Anesthesia. 30:842-849, 2016. 査読有  
DOI: 10.1007/s00540-016-2217-y.  
Eisuke Hamaguchi, Yasuo M. Tsutsumi, Katsuyoshi Kume, Yoko Sakai, Nami Kakuta, Yuta Uemura, Shinji Kawahito, Katsuya Tanaka. General anesthesia of a Japanese infant with Barber-Say syndrome: a case report. JA Clinical Report 2, 2016. 査読有  
DOI: 10.1186/s40981-016-0033-x  
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>

[学会発表](計5件)

瀧口英佑、堤保夫、神邊紀子、角田奈美、田中克哉 術前の経口保水が患者の代謝状態に及ぼす効果 第36回日本臨床麻酔学会総会 2016年11月3日 かるぼーと高知(高知県・高知市)  
瀧口英佑、福田浩平、久米克佳、堤保夫、田中克哉 腹部の局所混合血酸素飽和度モニタリング下に周術期管理を行った一例 第53回日本麻酔科学会中国・四国支部学術集会 2016年9月10日 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)  
田中克哉、瀧口英佑、堤保夫 AS患者の

非心臓手術の麻酔 第63回日本麻酔科学  
会総会 2016年5月27日 マリンメッセ  
福岡(福岡県・博多市)

堤保夫、香留希実子、瀧口英佑、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・博多市)

堤保夫、香留希実子、笠井飛鳥、瀧口英  
佑、酒井陽子、田中克哉 侵襲時の代謝  
破綻と糖負荷の影響 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・博多市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜口 英佑 (HAMAGUCHI, Eisuke)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60709575