

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15682

研究課題名(和文) ミトコンドリアサイブリッド細胞を用いたプロポフォール注入症候群の分子機構解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanisms of propofol toxicity by using mitochondria cybrids

研究代表者

広田 喜一 (HIROTA, Kiichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00283606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロポフォールは麻酔・集中治療領域で広く用いられている鎮静剤であるが、プロポフォール注入症候群(propofol infusion syndrome; PRIS)という稀ながらも致死的な合併症を生じる可能性があり、その機序の解明が求められている。PRISは代謝性アシドーシス・横紋筋融解・腎不全等全身の様々な臓器に障害をもたらす事から、我々は神経・腎・筋系など多様な出自の細胞、そしてPRISの発症機序として細胞のミトコンドリア機能の障害が示唆されることからミトコンドリアDNA異常をもつ細胞やミトコンドリア機能を抑制する薬剤を用いて、プロポフォールが細胞にもたらす影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The intravenous anesthetic propofol has been used for the induction and maintenance of anesthesia and sedation in critical patient care. However, the rare but severe complication propofol infusion syndrome (PRIS) can occur. In vivo and in vitro evidence suggests that the propofol toxicity is related to the impaired mitochondrial function. Therefore we investigated effects of propofol on cell metabolism and death using a series of established cell lines of various origins, including trans-mitochondrial cybrids, with defined mitochondrial DNA deficits. We demonstrated that supraclinical concentrations of propofol in not less than 50 μ M disturbed the mitochondrial function and induced a metabolic switch, from oxidative phosphorylation to glycolysis, by targeting mitochondrial complexes I, II and III. This disturbance in mitochondrial electron transport caused the generation of reactive oxygen species, resulting in apoptosis.

研究分野：麻酔科学

キーワード：プロポフォール ミトコンドリア サイブリッド 細胞死

1. 研究開始当初の背景

プロポフォール (propofol, 2,6-diisopropylphenol) は中枢神経抑制作用をもち手術室において麻酔薬として、また集中治療室においては鎮静薬として使用され患者管理に必須な薬剤である。疫学的にも高い安全性を持つ薬剤と考えられているがプロポフォール注入症候群 (propofol infusion syndrome, PRIS) と呼ばれる致死的な副作用を惹起することが知られていて臨床使用における大きな問題点となっている。

このような病態から推察されるように細胞の代謝不全や細胞死が PRIS 発症の細胞学的基盤にあると考えられていて、この方向性で従来研究が進められてきている。にもかかわらずいまだに病態の分子機構の詳細や発症予測因子・治療法の同定には至っていない。申請者らは、PRIS の病態の分子機構を解明する目的でプロポフォールの標的としてミトコンドリアを想定した研究を提案する。ミトコンドリアの関与は従来から指摘されているものの分子機構の解明など直接的な関与の証明はなされていない。本研究でそれを証明する研究を提案する。

様々なタイプのミトコンドリア遺伝子の変異体を細胞質移植法を用いて細胞に導入した transmitochondrial cybrids 細胞 (Cybrids 細胞) を作出して、またミトコンドリア機能に影響を与える事が判明している薬剤の影響下にプロポフォールが細胞の有酸素・無酸素代謝のモード変換に与える影響と細胞の生死に与える影響を、様々な臓器・組織由来の細胞を用いて明らかにする研究を構想した。

2. 研究の目的

研究の目的は以下の通りであった。

(1) プロポフォールが酸素代謝へ与える影響とエネルギー代謝への影響を細胞内 ATP、細胞外の乳酸・ピルビン酸を測定することで明らかにする。

(2) プロポフォールが細胞死へ与える影響を明らかにする。

(3) プロポフォールのミトコンドリア電子伝達系への影響を各呼吸鎖複合体の活性を測定することで明らかにする。

(4) ミトコンドリア機能異常が A, B, C に与える影響を、ミトコンドリア DNA 変異を持つ transmitochondrial cybrids (Cybrid) 細胞、ミトコンドリア電子伝達系 (ETC) 修飾剤を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酸素代謝・代謝モードへの影響の検討

クラーク電極を用いた OCR 測定
細胞内酸素消費量の測定はクラーク電極を測定原理とした測定器 Oxytherm (Hansatech Instruments、研究機関に配備済み) を用いた。

細胞内 ATP、細胞外の乳酸・ピルビン酸測定
生化学的な手法をもちいて測定した。

(2) FACS を用いた解析

FACS
フローサイトメーターは FACSCalibur (ベクトンディッキンソン社、研究機関に配備済み) を用いて蛍光標識した annexin-V との結合で初期アポトーシスを検出を行う。同時に propidium iodide を用いて後期アポトーシスまたはネクローシスの検出を行った。

Caspase 活性の測定
細胞 Caspase3/7,9 の活性を生化学的に測定して apoptosis の指標とする。Promega 社製の測定キットを用いた。
また Caspase9, の活性化を抗 cleaved caspase 9 抗体、抗 PARP 抗体を用いた Western blot で測定した。

(3) ミトコンドリア電子伝達系への影響の検討

C-1 単離ミトコンドリアを用いた各呼吸鎖複合体の活性の測定
ヒト・ラット由来の細胞からミトコンドリアを単離して定法に基づいて活性を測定する実験系を構築してプロポフォールがその活性に与える影響を測定した。
ミトコンドリア電子伝達系複合体別に測定することでプロポフォールの直接の標的が同定できた。

(4) ミトコンドリア DNA 変異と機能異常との関連の検討

Cybrid 細胞の作出
0 細胞が存在する HeLa 細胞、P29 細胞を元に申請者らで確立している手法を用いて transmitochondrial cybrids を作出する。

Cybrid 細胞の性質の確認
平成 28 年に作出した Cybrid 細胞の OCR、細胞内 ATP 産生、細胞外の乳酸・ピルビン酸測定を行い基礎データとした。

Cybrid 細胞を対照に 〃 の検討を行った。

ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の阻害薬であるピグアナイド系薬剤フェンフォルミン・メトフォルミン、コエンザイム Q10 の阻害薬であるスタチン製剤 (アトロバスタチンなど) を用いて軽微なミトコンドリア機能障害を作出してプロポフォールの A, B への作用が修飾を受けるかどうかを検討した。

4. 研究成果

まず神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞にプロポ

フォル(2,6-diisopropylphenol)を 12.5~150 μM で 3~12 時間投与し、PI-anexin 染色を用いたフローサイトメトリー(FCM)やカスパーゼ活性測定を行い、プロポフォルへの暴露濃度・時間に対する細胞死への影響を検討した。筋原細胞 C2C12 細胞、子宮頸癌細胞 HeLa 細胞、肺癌細胞 P29 細胞といった様々な細胞でも同様に検討を行った。続いて 12.5~100 μM のプロポフォルに 6 時間暴露し、フラックスアナライザーを用いた細胞内代謝の変化(OCR・ECAR)を評価し、又ミトコンドリア代謝過程におけるプロポフォルの作用部位を同定した。そしてプロポフォルによる細胞死にミトコンドリアでの活性酸素(ROS)の産生が関与していることを示す為、25~100 μM のプロポフォルに 3~6 時間暴露させて ROS 産生を定量し、続いてプロポフォル 50~100 μM に抗酸化剤である N-アセチルシステイン(NAC)10mM を併用し細胞死への影響を検討した。

さらに、ミトコンドリア DNA の部分変異を持ち基礎状態で complex 活性の部分低下を持つ P29mtA11 細胞やミトコンドリア DNA を持たない 0 細胞に対し、12.5~100 μM のプロポフォルを投与し前述の細胞死や代謝をカスパーゼ活性やフラックスアナライザーを用いて評価した。最後にミトコンドリア機能を薬剤的に抑制した場合のプロポフォルによる細胞障害への影響を検討するために、ビッグアナイド系糖尿病薬の metformin 2.5~20 μM ・phenformin 5~15 μM をプロポフォル 12.5~100 μM と併用し、同様の細胞死・代謝の評価を行った。

SH-SY5Y 細胞ではプロポフォル 50 μM 以上を 6 時間投与した場合に細胞死が惹起され、25 μM ではより長時間の 12 時間暴露すると細胞死が引き起こされた。これは C2C12 細胞、HeLa 細胞、P29 細胞でも同様であった。また細胞死を引き起こしたプロポフォル暴露条件において、ミトコンドリアの complex . . . を抑制することで好気性代謝が抑制され嫌気性代謝へのシフトが生じ、ROS 産生の増加が生じた。そしてこの作用は NAC で ROS を消去することにより打ち消された。又ミトコンドリア機能低下を基礎に持つ P29mtA11 細胞では、12.5~25 μM の低濃度のプロポフォルであっても細胞死が誘導され、metformin・phenformin でミトコンドリア機能を抑制した場合にも同様のプロポフォルへの脆弱性が示された。逆に 0 細胞では 50 μM 6 時間のプロポフォル暴露による細胞死に抵抗性になった。

プロポフォルはミトコンドリアの complex . . . を抑制することで細胞の代謝変化を惹起し ROS を産生して細胞死を誘導する。この作用は遺伝的・薬剤的なミトコンドリア機能抑制状態においてより増強され、臨床使用濃度・時間にであっても細胞に影響を及ぼ

すと結論できた。

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 12 件)

松尾 禎之, 広田 喜一: 小胞体内レドックスバランスの維持機構. 細胞 2018, 50(4):208-209. (査読あり)

Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, Nishi K, Kusunoki M, Shoji T, Uba T, Matsuo Y, Adachi T, Hayashi JI, Takenaga K, Hirota K: Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner. PLoS ONE 2018, 13(2):e0192796.

DOI:10.1371/journal.pone.0192796 (査読あり)

Hirai K, Furusho H, Hirota K, Sasaki H: Activation of hypoxia-inducible factor 1 attenuates periapical inflammation and bone loss. Int J Oral Sci 2018, 10(2):12. DOI:10.1038/s41368-018-0015-0 (査読あり)

松尾 禎之, 広田 喜一: 「酸素はいつも足りていない」の生物学の建設 - 2016 年度アルバート・ラスカー基礎医学研究賞の発表に寄せて. Life Support and Anesthesia 2017, 24:194-196. (査読なし)

Okamoto A, Sumi C, Tanaka H, Kusunoki M, Iwai T, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Takenaga K, Bono H, Hirota K: HIF-1-mediated suppression of mitochondria electron transport chain function confers resistance to lidocaine-induced cell death. Sci Rep 2017, 7(1):3816.

DOI:10.1038/s41598-017-03980-7 (査読あり)

Matsuo Y, Hirota K: Transmembrane thioredoxin-related protein TMX1 is reversibly oxidized in response to protein accumulation in the endoplasmic reticulum. FEBS Open Bio 2017, 7(11):1768-1777. DOI:10.1002/2211-5463.12319 (査読あり)

Inada T, Sumi C, Hirota K, Shingu K, Okamoto A, Matsuo Y, Kamibayashi T: Mitigation of inflammation using the intravenous anesthetic dexmedetomidine in the mouse air pouch model. Immunopharmacol Immunotoxicol 2017, 39(4):225-232. DOI:10.1080/08923973.2017.1327964 (査読あり)

甲斐 慎一, 広田 喜一: 硫化水素はミトコンドリア依存的に低酸素誘導性遺伝子応答を調節する. ICU と CCU 2016, 40:549-554. (査読なし)

広田 喜一: Oxygen, Hypoxia & Beyond -2016 年アルバート・ラスカー基礎医学研究

賞に寄せて. 医学のあゆみ 2016, 259(9):961-963. (査読なし)

Yamaguchi R, Harada H, Hirota K: VHL-deficient renal cancer cells gain resistance to mitochondria-activating apoptosis inducers by activating AKT through the IGF1R-PI3K pathway. *Tumour Biol* 2016, 37(10):13295-13306. DOI:10.1007/s13277-016-5260-2 (査読あり)

Okamoto A, Tanaka M, Sumi C, Oku K, Kusunoki M, Nishi K, Matsuo Y, Takenaga K, Shingu K, Hirota K: The antioxidant N-acetyl cysteine suppresses lidocaine-induced intracellular reactive oxygen species production and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. *BMC Anesthesiol* 2016, 16(1):104. DOI:10.1186/s12871-016-0273-3 (査読あり)

Daijo H, Hoshino Y, Kai S, Suzuki K, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Hirota K: Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner. *Sci Rep* 2016, 6:34424. DOI:10.1038/srep34424 (査読あり)

〔学会発表〕(計 11 件)

田中宏昌, 角 千里, 松尾 禎之, 広田 喜一: HIF-1 活性化はミトコンドリア電子伝達系を抑制してプロポフォールの細胞障害を軽減する (第 15 回がんとハイポキシア研究会 2017/11/10 淡路夢舞台国際会議場 淡路市)

角 千里, 廣田 喜一, 楠 宗矩, 岡本 明久, 西 憲一郎, 松尾 禎之: サイブリッド細胞を用いたプロポフォール細胞毒性の検討 (第 15 回がんとハイポキシア研究会 2017/11/10 淡路夢舞台国際会議場 淡路市)

松尾 禎之, 広田 喜一: グルタチオンシステムと連動した小胞体酸化還元酵素の活性制御およびレドックス恒常性維持の分子機構解析 (第 15 回がんとハイポキシア研究会 2017/11/10 淡路夢舞台国際会議場 淡路市)

松尾 禎之, 広田 喜一: 小胞体内レドックスバランスの維持とストレス感知機構の解析: タンパク質のレドックス状態を指標としたストレスモニタリング (第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会 2017/6/28 つくば国際会議場 つくば市)

角 千里, 廣田 喜一, 楠 宗矩, 岡本 明久, 西 憲一郎, 松尾 禎之: サイブリッド細胞を用いたプロポフォール細胞毒性の検討-プロポフォール注入症候群の病態生理学 (第 64 回日本麻酔科学会学術集会 2017/6/9 神戸国際展示場 神戸市)

岡本 明久, 楠 宗矩, 角 千里, 西 憲一郎, 松尾 禎之, 広田 喜一: 抗酸化物質の N-アセチルシステインはリドカインが誘導する活性酸素種産生や細胞死を抑制する

(第 64 回日本麻酔科学会学術集会 2017/6/8 神戸国際展示場 神戸市)

松尾 禎之, 広田 喜一: 膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング (第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/30 パシフィコ横浜 横浜市)

広田 喜一, 角 千里, 楠 宗矩, 岡本 明久, 田中 宏昌, 西 憲一郎, 松尾 禎之: trans-mitochondrial cybrids 細胞を用いたプロポフォール細胞毒性の検討-プロポフォール注入症候群の病態生理学 (第 23 回日本静脈麻酔学会 2016/11/19 コラッセ福島 福島市)

松尾 禎之, 広田 喜一: 膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング (第 14 回がんとハイポキシア研究会 2016/11/5 岐阜グランドホテル 岐阜市)

広田 喜一: 2016 年アルバート・ラスカー基礎医学賞を記念して (第 14 回がんとハイポキシア研究会 2016 11/5 岐阜グランドホテル 岐阜市)

鈴木堅悟, 広田 喜一, 甲斐慎一, 西憲一郎: 揮発性吸入麻酔薬は転写因子 HIF-1 依存的に腓 細胞のグルコース刺激誘導性インスリン分泌を阻害する (第 63 回日本麻酔科学会学術集会 2016/5/27 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 福岡市)

〔図書〕(計 1 件)

Hirota K: Fentanyl and Its Impact on Cell Functions. In: *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse* Volume 3: General Processes and Mechanisms, Prescription Medications, Caffeine and Areca, Polydrug Emerging Addictions and Non-Drug Addictions Volume 3, edn. Edited by Preedy V: Academic Press; 2016: 497-507.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ
<http://hypoxia.jp/hss/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
広田 喜一 (HIROTA, Kiichi)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00283606

(2) 研究分担者
竹永 啓三 (TAKENAGA, Keizo)
島根大学・医学部・准教授

研究者番号:80260256

(3)連携研究者

松尾 禎之(MATSUO, Yoshiyuki)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号:50447926

(4)研究協力者

なし