

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08817

研究課題名（和文）吸入麻酔薬の心保護作用に対するオートファジー・ミトコンドリアダイナミックスの影響

研究課題名（英文）Cardiac protection by volatile anesthetic -Role of autophagy and mitochondrial regulation-

研究代表者

酒井 陽子（SAKAI, Yoko）

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号：90711862

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：In vivoおよびIn vitro実験によって、吸入麻酔薬の心筋保護作用が示された。また特に、吸入麻酔薬のプレコンディショニング様心筋保護作用は、オートファジー抑制群ではその保護作用が棄却されることから、オートファジーがその作用に重要な役割を演じていることが明らかになった。さらに、吸入麻酔薬はミトコンドリア融合に作用し心筋保護作用を発揮することが示唆され、加えて吸入麻酔薬はmPTPを閉鎖し、心筋保護作用をあらわすことが明らかになった。これらのミトコンドリア作用は、オートファジーの誘導によっても引き起こされることから、吸入麻酔薬の心筋保護作用にはこれらの関与が重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プレコンディショニング作用がある様々な薬剤が研究されているが、臨床応用に至っている薬剤は少ない。研究代表者の研究グループは、早くから吸入麻酔薬の心筋保護作用に注目し、その経路を明らかにしてきた。また、オートファジーの活性化により引き起こされる虚血再灌流障害に対する反応は近年注目を浴びている。そのため、これらの関連を明らかにすることは、極めて重要であると思われる。これらを介した詳細な機序について検討していくことで心筋虚血再灌流障害などによる細胞死に対する生体内の役割が明らかになるとと思われる。また、これによって虚血性心疾患患者の予後改善が行われ、社会的意義が非常に高いと思われる。

研究成果の概要（英文）：Both an in vivo and in vitro model of ischemia-reperfusion injury was tested in anesthetic (isoflurane)-induced preconditioning mice. Mice were randomly assigned to receive anesthetic preconditioning with/without autophagy agonist/antagonist. Biochemical and mitochondrial swelling assays were also performed. Mice treated with volatile anesthetic-induced preconditioning had a significant reduction in infarct size as a percentage of the area at risk compared to controls, whereas mice treated with the autophagy inhibitor were not protected by anesthetic preconditioning. Furthermore, anesthetic preconditioning prevented swelling which was reversed by the addition of autophagy inhibitor. Volatile anesthetic, isoflurane, exhibits a protective effect in myocardial ischemia-reperfusion injury and that autophagy plays an important role in this preconditioning effects.

研究分野：麻酔科学

キーワード：オートファジー イソフルラン 吸入麻酔薬 心筋保護 虚血再灌流障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 虚血再灌流障害は、本邦において死亡率の上位を占めており、その発生および予防、治療の解明は患者の予後にとって重要な因子となっている。1986年、短期の虚血を長期の虚血の前に行う事によって、虚血再灌流障害の心筋梗塞サイズが減少することが Murry らによって報告された (Circulation 74: 1124-1136, 1986)。これは短期虚血によるプレコンディショニングと呼ばれ、臨床的にも有用性の高い発見であった。また、同様のプレコンディショニング様心筋保護作用は吸入麻酔薬や、オピオイドなどにも存在することが証明され、注目を浴びてきた。これらのプレコンディショニング様心筋保護作用の機序は、類似した部分が多く、心筋保護作用には共通の経路を有するものと考えられてきた。

(2) オートファジーは自食作用と呼ばれ、細胞内タンパク分解機構であり、不要なタンパク質やダメージを受けた器官を除去して細胞を正常に保つ働きも行っており、虚血再灌流時にオートファジーの誘導が心筋に対し保護的に作用することが示唆されている (Autophagy 2006;2: 305-306)。また近年の研究によると、ミトコンドリア機能の調節も心筋保護作用に関与していることも明らかになっている (Circulation 121: 2012-2022, 2010)。しかしながら、吸入麻酔薬の心筋保護作用、特にプレコンディショニング様心筋保護作用に関して、オートファジーとミトコンドリアの機能調節についての関連性は未だ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

プレコンディショニング作用がある様々な薬剤が研究されているが、臨床応用に至っている薬剤は少ない。研究代表者の研究グループは、早くから吸入麻酔薬の心筋保護作用、特にプレコンディショニング様心筋保護作用に注目し、その経路を明らかにしてきた。また、オートファジーの活性化により引き起こされる虚血再灌流障害に対する反応は近年注目を浴びている。しかしながら、吸入麻酔薬の心筋保護作用をオートファジー・ミトコンドリアダイナミクスと関連付けた報告は、国内外を含め知る限りにおいて存在しないため、これらを明らかにすることは、極めて重要であると思われる。そのため、これらを介した詳細な機序について検討していくことで心筋虚血再灌流障害などによる細胞死に対する生体内の役割が明らかになると思われる。さらに、これらを標的とした新たな心筋梗塞・心筋障害の治療開発へとつながるものと思われる。そこで本研究は、イソフルランのプレコンディショニング様心筋保護作用に対し、オートファジーとミトコンドリアダイナミクスが与える影響を明らかにすることで、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。

### 3. 研究の方法

(1) In vivo マウス実験として、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分間閉塞する。その後、2時間再灌流したのち、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。コントロール群、吸入麻酔薬 (イソフルラン 1.0 MAC) 群、オートファジー誘導剤 (ラパマイシン) 群、オートファジー抑制剤 (3-メチルアデニン: 3-MA) 群において心筋梗塞サイズを測定比較する (図1)。

(2) 各群のマウスの摘出心に対し関連タンパクについてイムノブロットング法にて比較する。

(3) In vitro 実験として、マウスの摘出心をランゲンドルフ酵素法を用い得られた遊離心室筋細胞に対し、1時間低酸素状況に暴露することで心室筋細胞に虚血状態をつくりだす。その後通常の培養状態に戻すことで再灌流状態とする。ミトコンドリア染色色素 (MitoTracker)、光褪色後蛍光回復法 (FRAP assay) を用いて各群のミトコンドリアダイナミクス (ミトコンドリアの分裂と融合) を明らかにする。また、ミトコンドリア膜電位を蛍光検出し、プレコンディショニング作用が与える影響について考察を加える。さらに、ミトコンドリア膨化アッセイにより吸光度の変化によって  $Ca^{2+}$  依存性ミトコンドリア膨化が吸入麻酔薬のプレコンディショニング刺激による心筋保護効果にどのように影響するかを calsein-AM 試薬を用いて細胞を蛍光ラベルし、mPTP 開閉を観

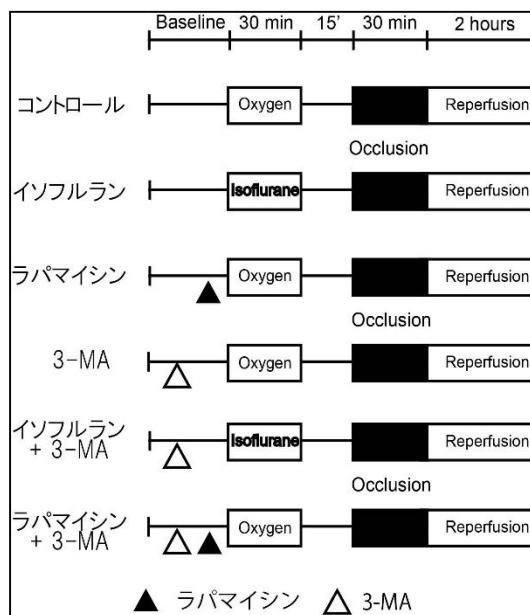


図1. 虚血再灌流実験のスキーマ

察する。

#### 4. 研究成果

(1) コントロール群、吸入麻酔薬 (イソフルラン1.0 MAC) 群、オートファジー誘導剤 (ラパマイシン) 群、オートファジー抑制剤 (3-メチルアデニン: 3-MA) 群において心筋梗塞サイズを測定比較した結果、吸入麻酔薬群においてはコントロール群と比較して心筋梗塞サイズが減少した。このことは以前から報告のある、吸入麻酔薬のプレコンディショニング作用を示すものとして相違はなかった。また、オートファジー誘導群においては吸入麻酔薬群と同等の心筋梗塞サイズの減少を認めた。オートファジー抑制群では心筋梗塞サイズの減少は認めず、コントロール群同様、心筋保護効果がないことが明らかとなった。

次に、吸入麻酔薬イソフルランにオートファジー抑制剤 (3-メチルアデニン: 3-MA) を加えた群、およびオートファジー誘導剤 (ラパマイシン) にオートファジー抑制剤 (3-メチルアデニン: 3-MA) を加えた群について虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを測定した。その結果、両群ともに心筋梗塞サイズの減少は認められず、オートファジー抑制剤 (3-メチルアデニン: 3-MA) によって、吸入麻酔薬やオートファジー誘導剤の心筋保護効果が棄却されることが明らかになった。

(2) 各群のマウスの摘出心 (コントロール群、吸入麻酔薬イソフルラン群、オートファジー誘導剤群、オートファジー抑制剤群) についてイムノプロット法にて関連タンパクを比較した。特に、オートファジーの評価については、LC3を用いたオートファジーの定量を用い、LC3-II/LC3-Iを指標とし、オートファジー誘導タンパクであるBeclin1を測定した。その結果、吸入麻酔イソフルラン群ではコントロール群と比較してオートファジーの誘導が高かった。これにより、吸入麻酔薬の虚血再灌流障害に対する心筋保護作用、特に吸入麻酔薬によるプレコンディショニング様心筋保護作用は、オートファジーの影響が考えられた。

(3) ミトコンドリア染色色素 (MitoTracker)、光褪色後蛍光回復法 (FRAP assay) を用いて各群のミトコンドリアダイナミクス (ミトコンドリアの分裂と融合) を明らかにした結果、吸入麻酔薬はミトコンドリア融合に作用し心筋保護作用を発揮することが示唆された。さらに calsein-AM試薬を用いて細胞を蛍光ラベルし、ミトコンドリアmPTP開閉を観察した。吸入麻酔薬はmPTPを閉鎖し、心筋保護作用をあらわすことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mayu Sebe, Rie Tsutsumi, Takuro Oyama, Yousuke T. Horikawa, Yuta Uemura, Nami Kakuta, Yoko Sakai, Atsushi Morio, Hirotsugu Miyoshi, Takashi Kondo, Tomoaki Urabe, Yuko Noda, Satoshi Kamiya, Noboru Saeki, Masashi Kuroda, Katsuya Tanaka, Yasuo M. Tsutsumi, and Hiroshi Sakaue.	4. 巻 67
2. 論文標題 Assessment of postoperative nutritional status and physical function between open surgical aortic valve replacement and transcatheter aortic valve implantation in elderly patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 139-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.67.139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuta Uemura, Yoko Sakai, Yasuo M. Tsutsumi, Nami Kakuta, Chiaki Murakami, Shiho Satomi, Takuro Oyama, Naohiro Ohshita, Tomoya Takasago, Daisuke Hamada, Koichi Sairyō, and Katsuya Tanaka.	4. 巻 66
2. 論文標題 Postoperative nausea and vomiting following lower limb surgery: a comparison between singleinjection intraarticular anesthesia and continuous epidural anesthesia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 303-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.66.303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoko Sakai, Yasuo M. Tsutsumi, Takuro Oyama, Chiaki Murakami, Nami Kakuta, and Katsuya Tanaka.	4. 巻 65
2. 論文標題 Noninvasive continuous blood pressure monitoring by the ClearSight system during robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 69-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2152/jmi.65.69.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	角田 奈美  (KAKUTA Nami)  (00622606)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師   (16101)	
研究分担者	田中 克哉  (TANAKA Katsuya)  (30263841)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授   (16101)	
研究分担者	堤 保夫  (TSUTSUMI Yasuo)  (90523499)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授   (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------