

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16450

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬ポストコンディショニング心筋保護作用におけるサーチュインの役割

研究課題名(英文) Role of Sirtuine in volatile anesthetic-induced postconditioning

研究代表者

大山 拓朗(OYAMA, Takuro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：30792949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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を虚血再灌流後に暴露することで、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。この作用にサーチュインが関与していることをサーチュインの阻害薬を使用して明らかにした。また、吸入麻酔薬イソフルランのポストコンディショニングによってサーチュインが増加することを明らかにした。さらに、サーチュインを介した吸入麻酔薬イソフルランの心筋保護作用にミトコンドリアの膨化が関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポスト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。近年、心筋梗塞リスクを有する患者の周術期管理において吸入麻酔薬が有効であることが示されつつあり、イソフルランのポストコンディショニング作用経路を明らかにすることは、虚血性心疾患のハイリスク患者の安全な周術期管理に寄与すると考えられる。このことより、虚血性心疾患に対してサーチュインを標的とした新たな治療法の開発を目指した研究基盤の開拓にも貢献する可能性があり、近年わが国においても増加中の虚血性心疾患患者に対する治療戦略として、本研究の成果は非常に重要であると思われる。

研究成果の概要(英文)：An in vivo model of ischemia-reperfusion injury was tested in anesthetic (isoflurane)-induced postconditioning mice. Mice were randomly assigned to receive anesthetic postconditioning (APostC) with/without sirtuine inhibitor. Biochemical and mitochondrial swelling assays were also performed.

Mice treated with APostC had a significant reduction in infarct size as a percentage of the area at risk compared to controls, whereas mice treated with the sirtuine inhibitor were not protected by APostC. Western blot analysis revealed that sirtuine were increased by APostC. Furthermore, APostC prevented swelling which was reversed by the addition of sirtuine inhibitor.

APostC exhibits a protective effect in myocardial ischemia-reperfusion injury and that sirtuine plays an important role in this postconditioning effects.

研究分野：麻酔科学

キーワード：サーチュイン 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 吸入麻酔薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における心血管病変による死亡率は増加の一途をたどっている。その理由として、近年の食生活の欧米化や人口の高齢化および生活習慣病の増加が考えられる。そのため、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。

虚血再灌流障害に対し

て、再灌流前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あり、プレコンディショニング・ポストコンディショニング様心筋保護作用と呼ばれている。特に、ポストコンディショニング (IPostC) と呼ばれるこの現象 (図1) 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 (Zhao et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285: 579-588)。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なされてきたが、その全容は未だ明らかではない。

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

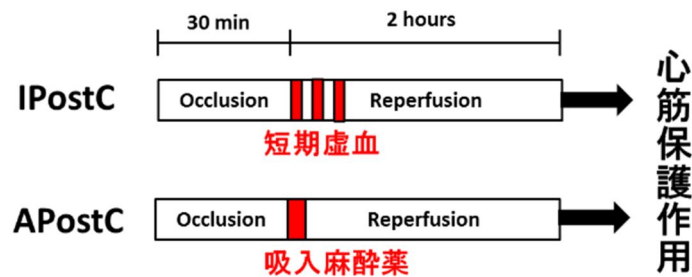
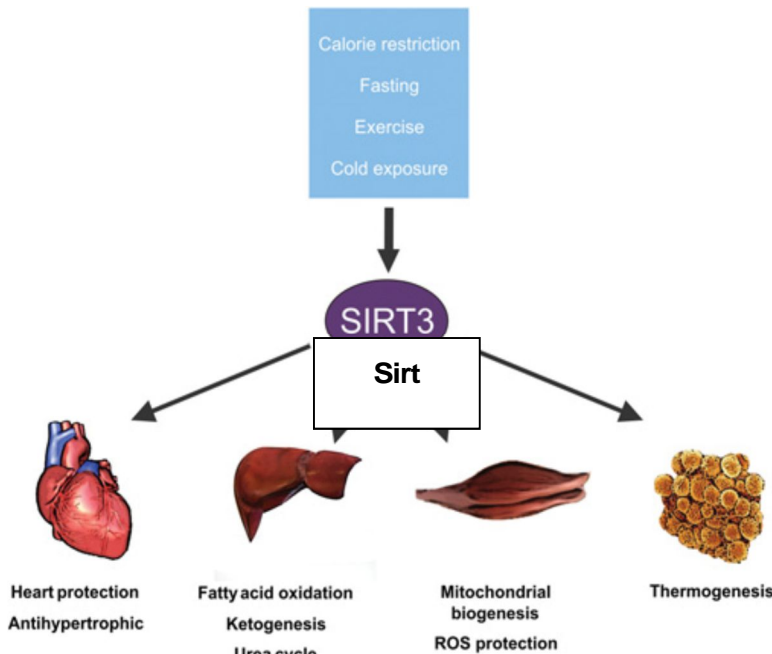


図1. 虚血再灌流モデルのスキーマ

PC et al., *Anesthesiology* 2005;102: 102-109) (図1)。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共有するものと考えられている。

Sirt 遺伝子はサーチュイン sirtuin 遺伝子とも呼ばれ、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果たしていることで知られている (図2)。さらに Sirt は心血管系に作用することが報告され、近年の研究によると心機能の制御や虚血に対する心筋耐性をコントロールする作用についても報告されている (Chen et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430: 798-803)。



(Giralt et al., *Biochem J* 2012;444:1-10)

図2. サーチュインの作用

2. 研究の目的

ポスト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。申請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 APostC に注目し、その経路を明らかにしてきた。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。しかし、APostC による心筋保護作用と Sirt との関与を示した報告はなく、APostC の心保護作用が Sirt により誘導されるかどうかは知られていない。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。そこで、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、虚血再灌流障害に対してミトコンドリアを介した心筋保護作用が誘導されることを明らかにする。また、Sirt による mPTP 抑制の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 Sirt の生体内の役割が明らかになると思われる。さらに、Sirt 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。

3. 研究の方法

実験 1. マウスを人工呼吸下に心臓冠動脈を 30 分間閉塞し、2 時間の再灌流を行う。虚血後半に

吸入麻酔薬イソフルランを 1.0MAC 吸入させた後 (APostC 刺激)、心臓を取り出しホモジナイズし RT-PCR、イムノプロットを用い RNA 及びタンパクレベルにおいて Sirt の発現が増加していることを明らかにする。

実験 2 . マウスの心臓冠動脈を 30 分間閉塞し、2 時間の再灌流を行う。その後、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。APostC 刺激、Sirt の阻害剤である nicotinamide を前投与し、同様の虚血再灌流実験を行ない、Sirt の APostC 作用に対する影響を明らかにする。

実験 3 . 申請者らの研究グループはこれまでにイソフルランによる心保護作用においてミトコンドリアの mPTP の開口抑制が関与することを報告している。Sirt がミトコンドリアを中心に発現していることから、Sirt の心保護作用と mPTP 開口との関与を明らかにする。実験 2 . における各群の心臓を取りだし、ホモジナイズし、密度勾配遠心法にてミトコンドリア分画を得た後、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 APostC 刺激による Sirt を介した心筋保護効果にどのように影響するかを調べる。さらにこの影響を可視化するため、calsein-AM 試薬を用いて細胞を蛍光ラベルし、mPTP 開閉を観察する。

4 . 研究成果

マウスを人工呼吸下に心臓冠動脈を 30 分間閉塞し、2 時間の再灌流を行った。虚血後半に吸入麻酔薬イソフルランを 1.0MAC 吸入させた後、心臓を取り出しホモジナイズした。RT-PCR を用いて、Sirt が発現していることを確かめた。また、イムノプロットを用いタンパクレベルにおいて Sirt の発現が増加していることも確かめた。

マウスの心臓冠動脈を30分間閉塞し、2時間の再灌流を行う。その後、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した。APostC刺激によって心筋梗塞サイズが減少した。また、Sirtの阻害剤であるnicotinamideを前投与し、同様の虚血再灌流実験を行なった結果、心筋保護作用が棄却されたことから、Sirtが APostC作用に重要な役割を演じていることが明らかとなった。

また、同様に APostC を行った心臓を取りだし、ホモジナイズし、密度勾配遠心法にてミトコンドリア分画を得た後、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を調べた。その結果、APostC によってミトコンドリアの開口が制限されることが明らかとなった。また、この作用は Sirt の阻害剤によって抑制された。これにより、ミトコンドリアを介して APostC 刺激の心筋保護作用が Sirt を介して発現することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6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 transcatherter 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 Yuki Ishikawa, Yuki Hari, Chiaki Murakami, Yasuhiro Honda, Takuro Oyama, Ryosuke Kawanishi, Nami Kakuta, Yoko Sakai, Takashi Kaji, Yasuo M. Tsutsumi, and Katsuya Tanaka.	4. 巻 67
2. 論文標題 Early diagnosis of the cardiopulmonary collapse type of amniotic fluid embolism with obstetrical disseminated intravascular coagulation during elective cesarean section: a case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 207-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.67.207.	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 single-injection 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 Takuro Oyama, Nami Kakuta, Naoji Mita, Shinji Kawahito, Katsuya Tanaka, and Yasuo M. Tsutsumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Jelly-type carbohydrate supplement in healthy subjects suppresses the catabolism of adipose tissue and muscle protein and improves their satisfactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Nutrition Experimental	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nami Kakuta, Yasuo M. Tsutsumi, Chiaki Murakami, Yoko Sakai, Takuro Oyama, Asuka Kasai, Katsuyoshi Kume, and Katsuya Tanaka.	4. 巻 65
2. 論文標題 Effectiveness of using non-invasive continuous arterial pressure monitoring with ClearSight in hemodynamic monitoring during living renal transplantation in a recipient: a case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 139-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.65.139.	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 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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村上千晶、角田奈美、堤保夫、里見志帆、大山拓朗、田中克哉
2. 発表標題 術後嘔気・嘔吐に対するNeurokinin-1受容体拮抗薬と5-hydroxytryptamine type 3受容体拮抗薬の効果：システムティックレビューとメタ解析
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuro Oyama, Yuta Uemura, Nami Kakuta, Yasuo M. Tsutsumi, and Katsuya Tanaka.
2. 発表標題 Glucose transporter-4 mediates acute isoflurane-induced preconditioning in vivo rabbits.
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologist Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山拓朗、角田奈美、川西良典、石川雄樹、堤保夫、田中克哉
2. 発表標題 最重症大動脈弁狭窄症(AS)に対し緊急TAVIを施行し救命し得た一例
3. 学会等名 第39回日本循環制御医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮内弥子、石川雄樹、村上千晶、大山拓朗、堤保夫、田中克哉
2. 発表標題 局所麻酔薬で中毒症状をきたした既往のある偽性コリンエステラーゼ(ChE)欠損症患者の麻酔経験
3. 学会等名 第55回日本麻酔科学会中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2018年

〔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
研究協力者	堤 保夫 (TSUTSUMI Yasuo)		
研究協力者	角田 奈美 (KAKUTA Nami)		
研究協力者	酒井 陽子 (SAKAI Yoko)		