

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09317

研究課題名（和文）サルコペニアに対する全身麻酔薬の影響：オートファジー不全の分子機構に着目した解析

研究課題名（英文）Action of general anesthetic on sarcopenia: analysis of the mechanism of impairment of autophagy of sarcopenia

研究代表者

戸田 法子 (Toda, Noriko)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：50375052

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：長時間手術・集中治療管理における全身麻酔薬・鎮静薬の使用は、サルコペニア患者に周術期合併症増加や予後悪化をもたらすが、その機序は不明な点が多く残されている。申請者はサルコペニア病態における全身麻酔薬の影響についてオートファジーの分子機構解析から解明することを目的とし本研究に着手した。

サルコペニアモデル細胞であるマウス横紋筋芽細胞C2C12細胞をLPS処理すると細胞生存率が有意に低下し、このときLC3B発現は抑制されていた。LPS処理時にプロポフォルを同時に投与すると、細胞の生存率の有意な改善を示したことから、プロポフォルはサルコペニアを改善する可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長時間手術・集中治療管理における全身麻酔薬・鎮静薬の使用は、サルコペニア患者に周術期合併症増加や予後悪化をもたらすが、その機序は不明な点が多く残されている。本研究で、サルコペニアモデル細胞であるマウス横紋筋芽細胞C2C12細胞をLPS処理すると細胞生存率が有意に低下し、このときLC3B発現は抑制されていた。LPS処理時にプロポフォルを同時に投与すると、細胞の生存率の有意な改善を示した。今後のin vivoモデルでの検証も必要とするが、全身麻酔薬プロポフォル使用は、サルコペニアを改善する可能性があることを示唆し、サルコペニア治療法開発において新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The use of general anesthetics and sedatives during prolonged surgical and intensive care procedures causes increased perioperative complications and worse prognosis in patients with sarcopenia. However, the mechanism underlying these effects remains unclear. This study aimed to elucidate the effects of general anesthetics on the pathogenesis of sarcopenia by analyzing the molecular mechanisms of autophagy. LPS treatment of mouse rhabdomyoblast C2C12 cells, a model cell for sarcopenia, significantly decreased cell viability and suppressed LC3B expression, whereas co-administration of propofol during LPS treatment significantly improved cell viability, suggesting that propofol may ameliorate sarcopenia.

研究分野：薬理学、周術期治療学

キーワード：サルコペニア プロポフォル オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長時間手術・集中治療管理における全身麻酔薬・鎮静薬の使用はサルコペニア患者に周術期合併症増加や予後悪化をもたらす。しかし、その機序は不明な点が多く残されている。申請者はサルコペニア病態における全身麻酔薬の影響についてオートファジーの分子機構解析から解明することを目的とし本研究に着手した。オートファジーは、細胞内に蓄積する毒性高分子(変性タンパク質)等を分解することで細胞内恒常性を維持する。一方、全身麻酔薬が酸化ストレス亢進をもたらすことにより、オートファジー不全をもたらすと考えられているが、まだ未解明な点も多い。

2. 研究の目的

全身麻酔薬・鎮静薬の効果、特にオートファジーへの影響について評価を行う。

3. 研究の方法

本申請研究は、全身麻酔薬・鎮静薬の効果、特にオートファジーに対する影響を検討する。この検討からサルコペニアに対する全身麻酔薬・鎮静薬の効果を、オートファジーの観点から解明する。さらに筋細胞をモデルとして筋細胞の生存率に対する全身麻酔薬・鎮静薬の効果を検討する。以下の項目について検討を行う。

薬物のオートファジーに対する影響の評価

(1) オートファジー活性の評価

薬物によるオートファジー阻害の確認には、オートファゴソームマーカーLC3B-II の量的変化を指標として LC3B に対する特異抗体を用いる Western blot 法で評価した。

(2) オートファジー活性のレポーター遺伝子を用いた評価

オートファジーマーカーの LC3B 遺伝子を蛍光タンパク質遺伝子 EGFP との融合遺伝子をレンチウイルスベクターを用いて細胞に導入した。さらに新規に、成熟したオートファゴソームに組み込まれる Syntaxin17 タンパク質遺伝子(STX17)を EGFP と融合させた遺伝子を同様に細胞に遺伝子導入した。FACS により上記レポーター遺伝子の発現量を定量した

(3) 細胞生存率をマーカーとしたオートファジー活性の影響評価

サルコペニアモデルとして用いるマウス横紋筋由来 C2C12 細胞に対して H2O2 あるいは LPS 処理を行い、細胞生存率の変化について検討を行った。さらにオートファジー誘導罪を LPS と同時処理した際の細胞生存率に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) オートファジー活性の評価

実験に用いた C2C12 細胞をオートファジー誘導すると、未処理の対照に比べて、オートファジーマーカーである LC3B の発現が亢進したことが Western blot で確認され、本細胞のオートファジー活性が確認出来た。さらに LPS で処理すると LC3B の発現が亢進した。さらに全身麻酔薬である Propofol は、LC3B の発現を亢進させ、オートファジーを誘導することが観察された。

(2) オートファジー活性のレポーター遺伝子を用いた評価

遺伝子導入細胞において LC3B, STX17 に由来する EGFP 蛍光標識されたオートファゴソームが蛍光顕微鏡下で観察することが確認した。さらにこれらの細胞を血清不含培地で培養してオートファジーを誘導すると、オートファゴソーム形成促進され LC3B, STX17 に由来する EGFP 蛍光標識されたオートファゴソームが増加すること、特に EGFP-STX17 で標識された中空のオートファゴソームが観察された。オートファジー誘導により、オートファゴソーム成熟がもたらされていることを確認した。

C2C12 細胞を LPS 処理するとオートファゴソームが蓄積すること、さらにオートファジー誘導でオートファゴソーム蓄積が解消することを、蛍光顕微鏡および Flowcytometry で確認出来た。

(3) 細胞生存率をマーカーとしたオートファジー活性の影響評価

マウス横紋筋由来 C2C12 細胞に対して各種薬物処理を行い、細胞生存率の変化について検討を行った。その結果 H2O2 あるいは LPS 処理を行うと、用量依存的に細胞生存率が低下することを 2 種類の定量法により確認した。デキサメタゾン処理も C2C12 の細胞生存率を低下させると論文には報告されている。しかし、今回の検討においてはデキサメタゾン処理による細胞生存率の低下は観察されなかった。一方、LPS 処理と同時にオートファジーを誘導する薬物で処理すると、LPS 処理により低下した細胞生存率が有意に回復することを観察した。このことより、LPS は C2C12 に対してオートファジー不全をおこしていること、さらにオートファジーを

回復させることが細胞の生存に重要であるということを見出すことが出来た。さらに LPS 処理と同時に Propofol を同時に投与すると、細胞の生存率の有意な改善を示した。さらに LPS によるオートファジー阻害が Propofol で改善を示した。

以上の検討結果より、全身麻酔薬 Propofol がオートファジー促進効果を持つことが明らかになった。文献的には Propofol のオートファジーに対する影響には、オートファジー促進あるいは阻害効果があることが報告されていた。今回の検討では、Propofol がオートファジー促進効果を持ち、オートファジー阻害剤と共存してもオートファジー改善効果を持ち、細胞生存率を改善することから、今回の研究目的であるサルコペニア患者における筋細胞の生存率が Propofol の処置で改善する可能性を見出すことが出来た。Propofol のオートファジー改善効果については、その分子機構については更なる詳細な検討が必要とするが、本研究において Propofol のサルコペニア改善効果の可能性について見出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito Masaki, Hirano Marina, Izumi Tomohiro, Mori Yu, Ito Kentaro, Saitoh Yurika, Terada Nobuo, Sato Takeya, Sukegawa Jun	4. 巻 23
2. 論文標題 Cytoskeletal Protein 4.1G Is Essential for the Primary Ciliogenesis and Osteoblast Differentiation in Bone Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2094 ~ 2094
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042094	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 Saito Masaki, Chiba Ayano, Sato Takeya, Moriya Takahiro, Sukegawa Jun, Nakahata Norimichi	4. 巻 145
2. 論文標題 Tctex-1 augments G protein-coupled receptor-mediated Gs signaling by activating adenylyl cyclase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 150 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.11.011	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 Masaki Saito, Linran Cui, Marina Hirano, Guanjie Li, Teruyuki Yanagisawa, Takeya Sato and Jun Sukegawa	4. 巻 96
2. 論文標題 Activity of Adenylyl Cyclase Type 6 Is Suppressed by Direct Binding of the Cytoskeletal Protein 4.1G	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 441-451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/mol.119.116426	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 斎藤将樹、佐藤岳哉	4. 巻 153
2. 論文標題 シグナル受容器・一次繊毛研究の現状：繊毛病の病因解明にむけた基礎研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 117-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.153.117.	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 Noriko Toda, Takeya Sato, Mikio Muraoka, Delan Lin, Masaki Saito, Guanje Li, Qui-Chao Song, Teruyuki Yanagisawa, Masanori Yamauchi	4. 巻 195
2. 論文標題 Doxorubicin induces cardiomyocyte death owing to the accumulation of dysfunctional mitochondria by inhibiting the autophagy fusion process	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 47-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.082	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13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 斎藤 将樹, 阪路 健祐, Sara Ebrahimi Azar, 張替 康皓, 佐藤 岳哉
2. 発表標題 Tctex-1 リン酸化を介した一次繊毛短縮と細胞増殖の分子制御機構
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第87回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤岳哉、李冠傑、戸田法子、斎藤将樹、山内正憲、谷内一彦
2. 発表標題 The use of digitonin for the assessment of the effect of doxorubicin on autophagy flux
3. 学会等名 第72回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeya Sato, Noriko Toda, Masanori Yamauchi, Takaaki Abe
2. 発表標題 Doxorubicin impaired mitochondrial respiration lead to cause the lethal cardiotoxic damage
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeya Sato, Mikio Muraoka, Noriko Toda, Guanjie Li, Masanori Yamauchi, Masaki Saito, Teruyuki Yanagisawa
2. 発表標題 Molecular mechanisms of Doxorubicin-induced cardiomyopathy, involvement in the impairment of mitophagy
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Guanjie Li, Delan Lin, Noriko Toda, Masaki Saito, Masanori Yamauchi, Kazuhiko Yanai, Takeya Sato
2. 発表標題 EGFP-tagged Syntaxin 17 (STX17) localized on autophagosome is increased by Doxorubicin
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Saito, Ayano Chiba, Takeya Sato, Jun Sukegawa
2. 発表標題 Tctex-1 augments parathyroid hormone receptor-mediated Gs signaling by activating adenylyl cyclase
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Saito, K. Sakaji, S. Ebrahimi Azar, T. Sato, C. Sung
2. 発表標題 Mechanism of primary ciliary resorption by phosphorylated Tctex-1
3. 学会等名 American Society of Cell Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤岳哉、村岡幹夫、戸田法子、山内正憲、斎藤将樹、柳澤輝行
2. 発表標題 ドキシルピシンの心筋障害の分子機構 ミトコンドリア選択的オートファジー、ミトファジー障害による
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 冠傑、林 徳嵐、戸田 法子、斎藤 将樹、山内 正憲、谷内 一彦、佐藤 岳哉
2. 発表標題 完成オートファゴソーム定量系の構築
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sara Ebrahimi Azar、阪路 健祐、佐藤 岳哉、斎藤 将樹
2. 発表標題 MAST4 accelerates primary ciliary resorption and cell cycle re-entry through activation of Cdc42
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斎藤 将樹、阪路 健祐、Sara EbrahimiAzar、佐藤 岳哉
2. 発表標題 Tctex-1を介した一次繊毛の短縮・消失におけるCdc42の活性化機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李冠傑、戸田法子、斎藤将樹、山内正憲、谷内一彦、佐藤岳哉
2. 発表標題 ドキシルピシン誘発心筋症の分子機構 -オートファジー融合過程の阻害-
3. 学会等名 東北大学大学院医学系研究科第13回リトリート大学院生研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李冠傑、戸田法子、山内正憲、斎藤将樹、佐藤岳哉
2. 発表標題 致死性心筋症を誘発する薬物性オートファジー障害の分子機構
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第85回例会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.molpharm.med.tohoku.ac.jp/fen_zi_yao_lihomupei/HOME.html

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	佐藤 岳哉 (Sato Takeya) (10312696)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	齋藤 将樹 (Saito Masaki) (50400271)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	野村 亮介 (Nomura Ryosuke) (90400358)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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