

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：15401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：19K09353
研究課題名（和文）吸入麻酔薬の心筋保護作用とマイクロドメイン・ミトコンドリアダイナミクスの役割

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

研究代表者
堤 保夫（TSUTSUMI, Yasuo）
広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：90523499
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）：吸入麻酔薬であるイソフルランには心筋保護効果があることが知られているが、そのメカニズムの全容は明らかではない。そこで本研究は、in vivo および in vitro マウスモデルを用いて、虚血再灌流障害に対する吸入麻酔薬の心筋保護作用が、細胞膜マイクロドメインを介することを明らかにするとともに、ミトコンドリアダイナミクスも同様にその心筋保護作用に重要な役割を演じ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

日本では、ガンが死亡原因の1位であるが、脳卒中・心筋梗塞・心不全・腎不全など心血管障害に基づく死亡はガン以上になると推測される。すでに欧米各国では心血管死亡が非常に多く、また、我が国では超高齢化社会を迎えて加齢による心血管障害が急速に増加しており、その対策は患者自身のQOLや生命予後のみならず、医療経済面からも極めて重要な課題である。申請者は細胞膜マイクロドメインであるカベオラ、カベオリンの影響に注目し、循環器障害について新たな面からアプローチし、そのメカニズムを明らかにしている。

研究成果の概要（英文）：The volatile anesthetic, isoflurane, is known to have the myocardial protective effects, but the full mechanism of this effect is not clear. Additionally, the full contribution of mitochondrial dynamics to cardiac physiology and function remains poorly understood. Using in vivo and in vitro mouse models, this study demonstrated that the cardioprotective effects of volatile anesthetics against ischemia-reperfusion injury are mediated by membrane microdomains, and that mitochondrial dynamics play an important role in the cardioprotective effects as well.

研究分野：麻酔科学

キーワード：心筋保護作用 吸入麻酔薬 細胞膜マイクロドメイン ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

吸入麻酔薬であるイソフルランには、虚血再灌流前に前投与することで心筋保護作用がある(プレコンディショニング様心筋保護効果)ことが知られている(Anesthetic Preconditioning: APC)が、そのメカニズムの全容は明らかではない。

細胞膜マイクロドメインであるカベオラは細胞膜に存在する直径 50-100 nm 前後の陥凹であり、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ膜ドメインと称され、細胞膜のシグナル伝達などの性質を持っている。カベオリンはカベオラを構成する構成タンパクであり、特に心臓においてはカベオリン-3 が多く発現している。骨格ドメインと呼ばれる部分は多くのシグナル伝達関連分子に結合するだけでなくそれらの機能制御にも関与すると考えられている。申請者はこれまで、吸入麻酔薬の心筋保護作用が細胞膜マイクロドメインを起点に発現していることを明らか

細胞膜のくぼみがカベオラ



にしてきた (*Circulation* 121: 2012-2022, 2010)。

さらに、虚血再灌流障害時にはミトコンドリアにおける Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP)の開口が起こり細胞死へと繋がるとされており、虚血再灌流障害時に mPTP の開口を抑制することが心筋保護作用の発現に重要であることが明らかになってきた。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。しかし、細胞膜マイクロドメインを介した APC 心筋保護作用に対してミトコンドリア機能調節がどのように作用するかは明らかではない。

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。申請者の研究グループは、吸入麻酔薬の心筋保護作用の研究に着手し、新たな発想のもと早くから細胞膜マイクロドメインであるカベオラ、カベオリンの影響に注目し、その影響を明らかにしてきた。

本研究は、吸入麻酔薬の APC 心筋保護作用に対し、細胞膜マイクロドメイン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、APC 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) マウス *in vivo* 虚血再灌流モデルを用いて対照群、APC 群において心筋梗塞サイズを測定比較する。また、カベオリン-3 ノックアウトマウスを用い心筋梗塞サイズを測定し、カベオリン-3 の影響を明らかにする。

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 分間閉塞し、その後、2 時間再灌流を行う。吸入麻酔薬 (イソフルラン 1.0 MAC) 群は、虚血再灌流前に 30 分間イソフルランを吸入させる。その後、15 分間吸入麻酔薬をウォッシュアウトさせた後、虚血再灌流を行う。コントロール群、吸入麻酔薬群において心筋梗塞サイズを測定比較する。比較の方法は通常領域サイズ、リスク領域サイズ (Area at risk: AAR)、心筋梗塞サイズ (Infarct size: IS) を測定し、IS/AAR で各群の心筋梗塞サイズを比較する。同様の方法でマウスをカベオリン-3 ノックアウト (Cav-3 KO) マウスに替えて虚血再灌流実験を行う。

(2) マウス *in vitro* 遊離心筋細胞を用い、低酸素モデルにて心筋細胞死亡率が APC により低下することを明らかにする。各群について APC 作用がミトコンドリアダイナミクスを含むミトコンドリア機能に与える影響について調べる。

マウスの摘出心臓をランゲンドルフ酵素法にて灌流、得られた遊離心室筋細胞に対して通常培養液を「グルコースなし」のものに置き換え、1 時間低酸素状況 (95%N₂, 5%CO₂) 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 1 時間通常の培養状態に戻すことで再灌流状態とする。吸入麻酔群では、イソフルラン 1.0MAC にて 30 分間刺激を与え、APC による心筋保護作用を明らかにする。Methyl-β-cyclodextrin (MBCD) はコレステロール枯渇剤であり、カベオラの崩壊をもたらす。MBCD を前投与し、同様の実験を行なうことでカベオラの心筋細胞保護作用が明らかになる。

各群についてプレコンディショニング作用がミトコンドリアダイナミクスを含むミトコンドリア機能に与える影響について調べる。

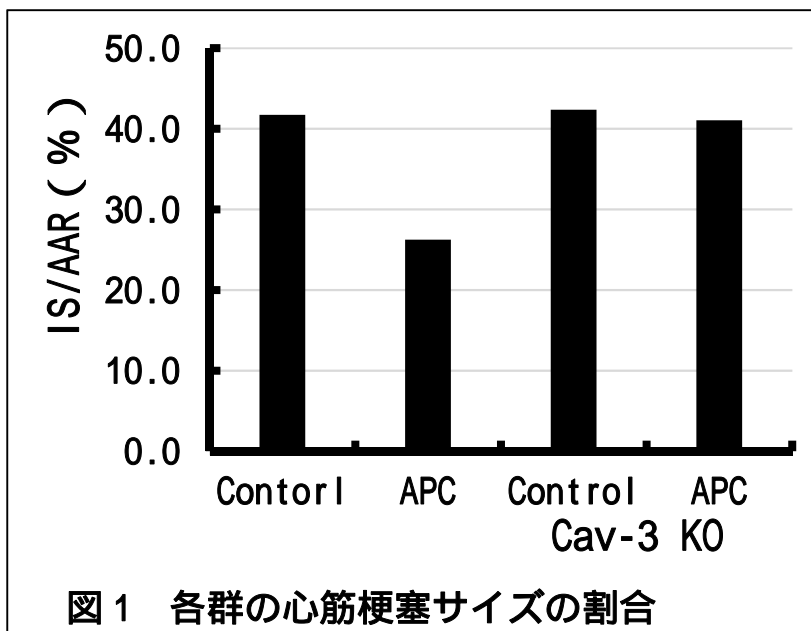
(3) ミトコンドリア融合に関与する Opa-1 の影響を明らかにするため、Opa-1 をノックダウンした細胞を用いて上記実験を行う。

ミトコンドリア融合に関与する Opa-1 の影響を明らかにするため、Opa-1 siRNA を電気穿孔法にて細胞に注入、トランスフェクションさせた細胞を用い、各群の心筋保護作用が棄却するかを

調べる。

4. 研究成果

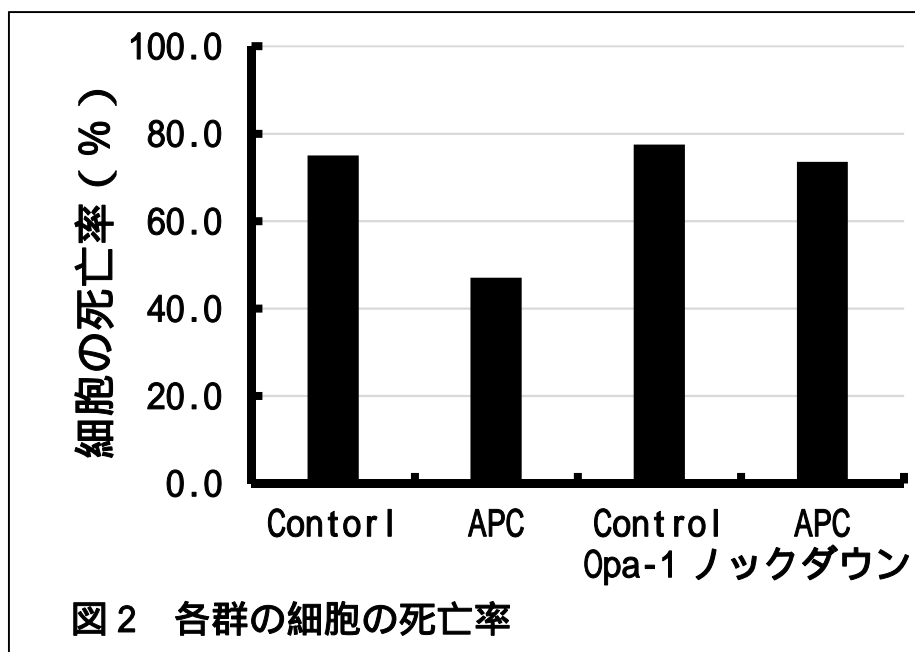
(1) マウス *in vivo* 虚血再灌流実験より各群のIS/AARを測定した。コントロール群、APC群、Cav-3群、Cav-3+APC群のIS/AARはそれぞれ、 $41.7 \pm 4.9\%$ 、 $26.2 \pm 4.8\%$ 、 $42.3 \pm 1.2\%$ 、 $41.0 \pm 5.6\%$ となった(図1)。これによって吸入麻酔薬の心筋保護作用が明らかになった。また、Cav-3 KOマウスを用いることでイソフルランの心筋保護作用が棄却されることから、カベオリン-3を介した経路が心筋保護作用に関与していることが明らかとなった。



(2) マウス *in vitro* 遊離心筋細胞を用い、低酸素モデルにて心筋細胞死亡率を測定した。心筋細胞死亡率はコントロール群、APC群でそれぞれ、 $74 \pm 4\%$ 、 $56 \pm 5\%$ となりAPCにより低下することが明らかになった。MBCDを前投与し、同様の実験を行なうことでAPCの心筋保護作用が棄却されたことから、カベオラが心筋細胞保護作用に重要な役割を演じていることが明らかになった。

ミトコンドリア膜電位を JC-1 assay にて蛍光検出し、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。分裂・融合タンパクについてイムノプロット・real-time PCR を用いて調べることで、ミトコンドリアの融合タンパクである Opa-1 が有意に増加することを明らかにした。

(3) ミトコンドリア融合に関与するOpa-1の影響を明らかにするため、Opa-1をノックダウンした細胞を用いて実験を行った。



した細胞を用いて実験を行った。ミトコンドリア融合に関与するOpa-1の影響を明らかにするため、Opa-1 siRNAを電気穿孔法にて細胞に注入、トランスフェクションさせた細胞を用い、コントロール群、吸入麻酔薬群、各群の心筋保護作用が棄却するかを調べた(図2)。その結果、吸入麻酔薬は心筋保護作用があり、そ

れらの作用にOpa-1が重要な役割を演じていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Morio A, Tsutsumi R, Satomi S, Kondo T, Miyoshi H, Kato T, Kuroda M, Kitamura T, Hara K, Saeki N, Sakaue H, and Tsutsumi YM	4. 巻 13
2. 論文標題 Leucine imparts cardioprotective effects by enhancing mTOR activity and mitochondrial fusion in a myocardial ischemia/reperfusion injury murine model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetol Metab Syndr	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13098-021-00755-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morio A, Tsutsumi R, Kondo T, Miyoshi H, Kato T, Narasaki S, Satomi S, Nakaya E, Kuroda M, Sakaue H, Kitamura T, Tsutsumi YM	4. 巻 31
2. 論文標題 Leucine induces cardioprotection in vitro by promoting mitochondrial function via mTOR and Opa-1 signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutr Metab Cardiovasc Dis	6. 最初と最後の頁 2979-2986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.numecd.2021.06.025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Satomi S, Morio A, Miyoshi H, Nakamura R, Tsutsumi R, Sakaue H, Yasuda T, Saeki N, Tsutsumi YM	4. 巻 245
2. 論文標題 Branched-chain amino acids-induced cardiac protection against ischemia/reperfusion injury.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 117368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.117368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kondo T, Saeki N, Otsuki S, Tsutsumi YM.	4. 巻 34
2. 論文標題 Evaluation of a new face mask concept for oxygen administration: a crossover study in healthy volunteers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 950-952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02861-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriwaki K, Watanabe T, Yasuda M, Katagiri T, Ueki M, Kurita S, Sanuki M, Tsutsumi YM.	4. 巻 38
2. 論文標題 An outcome study of adult in-hospital cardiac arrests in non-monitored areas with resuscitation attempted using AED.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Emerg Med	6. 最初と最後の頁 2524-2530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajem.2019.12.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urabe T, Yanase Y, Motoike S, Harada K, Hide I, Tanaka S, Tsutsumi YM, Kawamoto M, Sakai N.	4. 巻 884
2. 論文標題 Propofol induces the elevation of intracellular calcium via morphological changes in intracellular organelles, including the endoplasmic reticulum and mitochondria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 173303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 Nobuto Nakanishi, Rie Tsutsumi, Yoshihiro Okayama, Takuya Takashima, Yoshitoyo Ueno, Taiga Itagaki, Yasuo Tsutsumi, Hiroshi Sakaue, and Jun Oto.	4. 巻 7
2. 論文標題 Monitoring of muscle mass in critically ill patients: comparison of ultrasound and two bioelectrical impedance analysis devices.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Intensive Care	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40560-019-0416-y.	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Morio A, Satomi S, Miyoshi H, Toyota Y, Tsutsumi YM
2. 発表標題 Chlorogenic acid ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mouse models.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morio A, Satomi S, Toyota Y, Watanabe T, and Tsutsumi YT.
2. 発表標題 Amino acids-induced cardiac protection by promoting mitochondrial function via mTOR and Opa-1 signaling.
3. 学会等名 Experimental Biology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazumi Takaishi, Tomohiro Aoyama, Shigeki Fujiwara, Ryo Otsuka, Satoru Eguchi, Yasuo M. Tsutsumi, Shinji Kawahito, Hiroyuki Kinoshita, and Hiroshi Kitahata.
2. 発表標題 Pleth variability index predicts hemodynamic derangements in patients undergoing oral surgery.
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologist Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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 分担者	森尾 篤 (Atsushi MORIO) (60868389)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	
研究 分担者	三好 寛二 (Hirotsugu Miyoshi) (50645364)	広島大学・病院(医)・講師 (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
---------	---------