

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591975

研究課題名（和文）

麻酔薬の心保護作用におけるミトコンドリアのカルシウム依存性カリウムチャネルの役割

研究課題名（英文） Isoflurane-induced postconditioning is mediated by activation of mitochondrial calcium-activated potassium channels

研究代表者

大下 修造（OSHITA SHUZO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60144945

研究成果の概要（和文）：

揮発性麻酔薬であるイソフルランはポストコンディショニング効果を有し、心筋の虚血再灌流傷害に対して保護的に作用する。その作用機序にミトコンドリアのカルシウム依存性カリウムチャネルの開口が関与していることがわかった。また、揮発性麻酔薬による心筋保護効果にはミトコンドリアの蛋白の O-Linked beta-N-acetylglucosamine による修飾が関与することもわかった。

研究成果の概要（英文）：

Volatile anesthetics isoflurane have an anesthetic postconditioning effects that induce cardioprotective effects against myocardial ischemia and reperfusion injury. We demonstrated that activation of mitochondrial calcium-activated potassium channels play a pivotal role on these action. Furthermore, we showed that volatile anesthetics induced modulation of mitochondrial protein by O-linked beta-N-acetylglucosamine also have an important for volatile anesthetics induced cardioprotection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：吸入麻酔薬、イソフルラン、心筋保護効果、Ca 依存性 K チャネル、ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

① 1997年 Kersten らは揮発性麻酔薬であるイソフルランを長時間の心筋虚血再灌流傷害を与える前に先行投与すると心筋梗塞サイズが有意に減少することを報告した。この現象は麻酔薬によるプレコンディショニング Anesthetic preconditioning (APC) と呼ばれ、その作用機序について多くの研究

がなされてきた。臨床試験でも APC の有用性が示されて、臨床応用の場においても大いに期待がもたれている。

②我々は、これまで APC の心筋保護効果の作用機序について以下のごとく報告してきた。Reactive oxygen species の関与 (Tanaka K, et al. Anesthesiology 2002;97:1485-90, Tsutsumi YM, et al. Life

Sci 2007;81:1223-7), Cyclooxygenase-2 の関与 (Tanaka K, et al. Anesthesiology 2004;100:525-31), 12-lipoxygenase の関与 (Tsutsumi, YM, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;291:H979-81), ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャンネルの関与 (Tanaka K et al. Anesthesiology 2003;998:935-43, Tsutsumi YM et al. Anesthesiology 2006;104:495-502

③近年、虚血再灌流時における心筋保護作用に KATP チャンネルのみならず別の K<sup>+</sup>チャンネルである Ca 依存性 K チャンネル (Kca チャンネル) も関与していることが報告された。

④揮発性麻酔薬は一度心筋虚血が起った後でも、再灌流前に投与すると、心筋保護効果を発揮することが報告され、その現象は APC と対比して、麻酔薬によるポストコンディショニングと呼ばれている。

⑤揮発性麻酔薬による心保護効果は、心筋虚血再灌流傷害時に心筋細胞ミトコンドリアの permeability transition pore (mPTP) が開口することを抑制して保護効果を発揮していると報告されている。

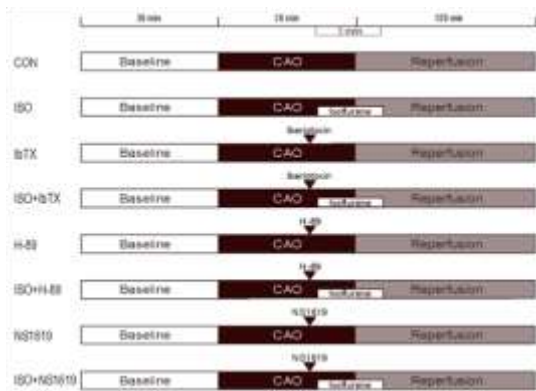
## 2. 研究の目的

①イソフルランの心筋細胞ミトコンドリア Kca チャンネルへの影響を明らかにして、イソフルランによるポストコンディショニングと関連があるか解明する。

②イソフルランの APC 心筋保護効果におけるミトコンドリア Kca チャンネルの mPTP 開口抑制へ果たす役割を解明する。

## 3. 研究の方法

①ウサギの in vivo 心筋虚血再灌流モデルを用いて、対照群、イソフルラン群、Kca チャンネル拮抗薬 (iberiotoxin) 群、protein kinase A (PKA) 拮抗薬 (H-89) 群、Kca チャンネル開口薬 (NS1619) 群を割り振り、心筋梗塞サイズを測定する。プロトコルを図に示す。



②マウスの心筋虚血再灌流モデルを用いて、ミトコンドリアの蛋白が O-Linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) によって修飾されるか検討した。

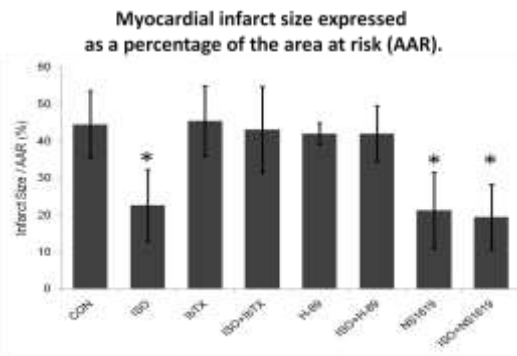
## 4. 研究成果

①ウサギの in vivo 心筋虚血再灌流モデルによる心梗塞サイズ測定の結果を図に示す。

上図に示すように、イソフルランの投与は対照群 (CON) に比較して有意に心筋梗塞サイズを縮小し心筋保護効果を発揮した。すなわち、イソフルランによるポストコンディショニング効果を確認した。この心筋保護効果は Kca チャンネル拮抗薬である (IbTX) によって棄却された。これは、イソフルランによるポストコンディショニングの作用機序に Kca チャンネルが密接に関与していることが示唆される。

さらに、PKA 拮抗薬である H-89 によって、イソフルランによる心筋保護効果は棄却された。このことは、イソフルランによるポストコンディショニングの作用機序に PKA 活性化が関与することを示唆している。

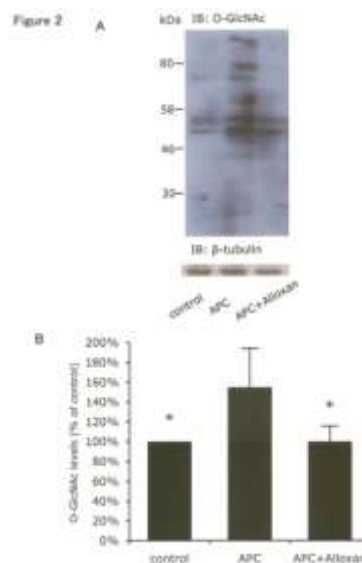
また、Kca チャンネル開口薬である NS-1619 の投与で心筋保護が発揮され、イソフルランと NS-1619 を両方投与した群では相乗効果を示唆している。



CON = control; ISO = isoflurane; IBTX = iberiotoxin. Data are mean  $\pm$  SD. \* Significantly ( $P < 0.05$ ) different from control.

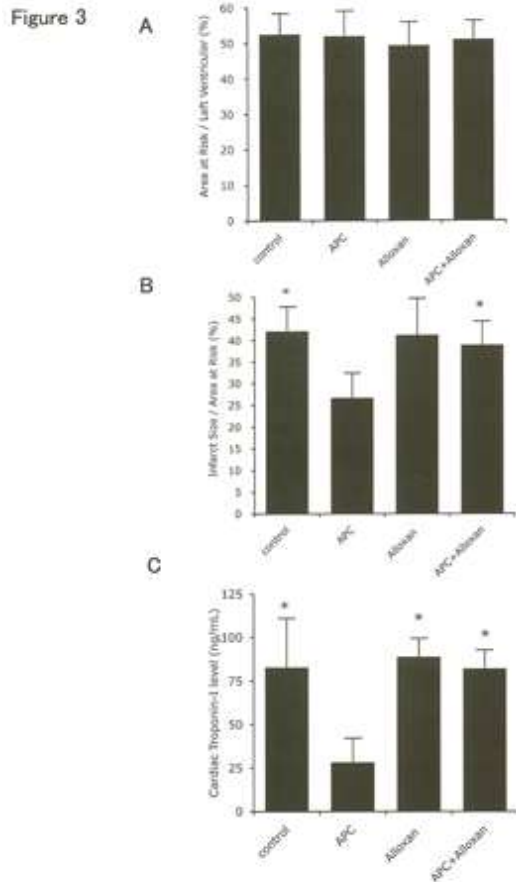
果を認めなかった。これらは、Kca チャンネル開口は心筋保護に関連があることを示唆している。

②マウスの心筋虚血再灌流モデルによる実験結果を示す。



上図は対照群、イソフルランによる APC 群、O-GlcNAC 阻害薬 Alloxan を投与した群の心筋をホモジェナイズして O-GlcNAC した蛋白を Western Blot 法で調べたものである。イソフルランによる APC で多くの蛋白が O-GlcNAC 化されていることが示唆された。

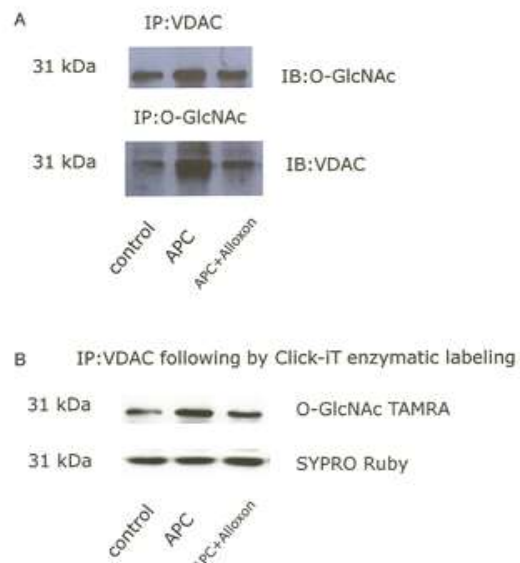
次にラットの *in vivo* 心筋虚血再灌流モデルによる心筋梗塞サイズの結果を示す。



Aは左室に対する area at risk の割合を示す。これは各群で有意差はなかった。これらは冠動脈の灌流域に差がなかったことを示す。Bは心梗塞サイズ、Cは心筋トロポニンIを示す。どちらもイソフルランによる APC で心筋保護効果を発揮し、その保護効果は Alloxan で棄却された。これらの結果はイソフルランによる心筋保護効果に蛋白の O-GlcNAC が関与していることを示唆している。

次にミトコンドリアの蛋白である mPTP の構成成分である VDCA がイソフルランによって O-GlcNAC されるか調べた結果を示す。

Figure 6



AもBも同じことを示していて、mPTPの構成成分であるVDACはイソフルランによるAPCによってO-GlcNACされ、その効果はO-GlcNAC阻害薬Alloxanによって棄却された。これらの結果から、イソフルランの投与によってVDACがO-GlcNAC化されることが示唆される。

以上、本研究によって、イソフルランはミトコンドリアのKcaチャネルを活性化して心筋保護効果を発揮すること、また、イソフルランはミトコンドリアmPTPをO-GlcNAC化し、そのことが心筋保護効果に関与することが判明した。

#### 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 3 件)

1. Hirose K, Tsutsumi Y, Tanaka K, Oshita S, et al. Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine in the cardioprotection induced by isoflurane. *Anesthesiology* 査読あり Vol. 115 2011; 955-962

DOI: [10.1097/ALN.0b013e31822fcede](https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31822fcede)

2. Tsutsumi Y, Tanaka K, Oshita S, et al. Compound K, a metabolite of ginsenosides, induces cardiac protection mediated nitric oxide via Akt/PI3K. *Life Sciences*. 査読あり Vol. 88, 2011; 725-729.

DOI: [10.1016/j.lfs.2011.02.011](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.02.011)

3. Tanaka K, Tsutsumi Y, Oshita S, et al. Differential effects of propofol and

isoflurane on glucose utilization and insulin secretion. Life Sciences. 査読あり Vol. 88, 2011; 96-103  
DOI: [10.1016/j.lfs.2010.10.032](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.032)

[学会発表] (計 5 件)

1 田中克哉: Effects of volatile anesthetics on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in various tissues. 日中麻酔科学会議シンポジウム (招待講演) 2011.11.3 沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

2 Kinoshita M, Tanaka K, Tsutsumi Y, Oshita S, et al. Role of calcium-activated potassium channel and cAMP-dependent protein kinase on isoflurane-induced postconditioning. American Society of Anesthesiologists 2011 Annual Meeting 2011.10.18 McCormic Place (Chicago, USA)

3 Hirose K, Oshita S, et al. The relation between isoflurane-induced O-linked beta-N-acetylglucosamine and mitochondria function. American Society of Anesthesiologists 2011 Annual Meeting 2011.10.16 McCormic Place (Chicago, USA)

4 田中克哉 Hyperglycemic impairs cardioprotection by volatile anesthetics. 日本臨床麻酔学会第30回大会 2010.11.4 アスティ徳島 (徳島市)

5 木下倫子、田中克哉、堤保夫、廣瀬佳代、大下修造: 高血糖のウサギにおいてイソフルランおよびインスリンによるポストコンディショニングが心筋梗塞に及ぼす影響。第30回日本循環制御医学会 2009. 6. 12 鹿児島市民文化ホール (鹿児島)

[図書] (計 2 件)

1 田中克哉 堤保夫 大下修造: 総合医学社、麻酔科学レクチャーVol 1 No4 2009 徹底ガイド心臓麻酔 Q&A ; Q18 心臓麻酔中の心筋保護 総ページ数 9 (901-909)

2 田中克哉: (稲田英一 編集): メディカル・サイエンス・インターナショナル社、セボフルラン -基礎をすれば臨床がわかる- 第9章 セボフルランの抗炎症作用と臓器保護作用 2010年 総ページ数 20 (125-144)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tokushima-u.ac.jp/article/0017600.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大下 修造 (OSHITA SHUZO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 60144945

### (2) 研究分担者

田中 克哉 (TANAKA KATSUYA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号: 30263841

堤 保夫 (TSUTSUMI YASUO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師  
研究者番号: 90523499