

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08922

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬が敗血症における筋萎縮に及ぼす予防効果の検討

研究課題名(英文) Preventive effect of inhaled anesthetics on muscle atrophy in sepsis

研究代表者

甲斐 慎一 (KAI, SHINICHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：30770177

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)：本研究では、吸入麻酔薬が骨格筋に及ぼす影響を検討した。C2C12細胞を用いたin vitro実験では、吸入麻酔薬(イソフルランとセボフルラン)が濃度依存性に筋管径を短縮した。その機序として、吸入麻酔薬がAkt経路を介して蛋白分解の二つの経路(ユビキチンプロテアソーム経路とオートファジーリソソーム経路)を亢進し蛋白合成を抑制することを示した。In vivo実験では、イソフルラン暴露群で二つの不動化モデル(坐骨神経切断と尾部懸垂)に比べマウス骨格筋におけるAktリン酸化の低下、蛋白分解の亢進と蛋白合成の低下を認めた。この結果から、吸入麻酔薬暴露が不動化とは関係なく筋萎縮を助長することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、in vitro実験から吸入麻酔薬が直接作用し骨格筋を萎縮させること、in vivo実験から吸入麻酔薬暴露が不動化に比べ筋萎縮を助長させる可能性を示した。呼吸循環動態の安定化や人工呼吸管理のため重症患者に鎮静を必要とすることは多いが、吸入麻酔薬による鎮静は骨格筋萎縮を助長するかもしれない。吸入麻酔薬には抗炎症作用を有するとの報告もあるため侵襲下における検討を重ねる必要はあるものの、吸入麻酔薬には鎮静による不動化だけでなく直接的に骨格筋に作用し骨格筋萎縮を助長する可能性がある。本研究の結果は、重症患者に対する鎮静を必要最小限に抑えるという現在の標準管理を支持するものかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of inhaled anesthetics on skeletal muscle. In vitro experiments using C2C12 cells showed that inhaled anesthetics, isoflurane and sevoflurane, reduced myotube diameter in a concentration-dependent manner. As a mechanism, we showed that inhaled anesthetics reduced the Akt phosphorylation, increased two protein degradation pathways (ubiquitin proteasome pathway and autophagy lysosome pathway) and decreased protein synthesis.

Through in vivo experiments using mice, we found decreased Akt phosphorylation, increased protein degradation and decreased protein synthesis on the skeletal muscle in the isoflurane exposure group compared to the two immobilization models (the sciatic nerve denervation and the tail suspension). These results suggest that inhaled anesthetics may impact on the skeletal muscle regardless of immobilization.

研究分野：麻酔

キーワード：筋萎縮 吸入麻酔 鎮静

1. 研究開始当初の背景

集中治療を要する重症患者の多くに重度の骨格筋萎縮と筋力低下が生じることが明らかになり、現在では ICU-Acquired Weakness (ICU-AW) という概念が提唱されている。ICU-AW の発症は、長期・短期死亡率の上昇、退院後の QOL の低下と関連する。ICU 患者の高齢化が進んでいる本邦においては、患者の社会復帰のためにも予防法の確立が喫緊の課題となっている。

ICU-AW の危険因子の一つとして敗血症が挙げられる。敗血症では引き起こされた全身炎症反応により早期からユビキチンプロテアソーム経路(UPP)やオートファジーリソソーム経路(ALP)を介して蛋白分解が亢進し筋肉量が低下する。これまで侵襲から早期回復を図るために蛋白分解の抑制と蛋白合成の促進を目指した治療法の開発を目指した研究が行われてきたが有効な治療方法は確立していない。

重症患者において呼吸循環動態の安定化や人工呼吸管理から鎮静は必要であるが、不動化を伴うため ICU-AW の危険因子として認識されている。そのため、重症患者の鎮静管理は鎮静薬を最小有効濃度で最短時間使用することが推奨される。一方、鎮静薬自体が筋萎縮に寄与するかは明らかになっていない。ICU ではこれまでプロポフォールを中心とした静脈麻酔薬が一般に使用されてきたが、近年新たな気化器が開発され手術室で主に使用されてきた吸入麻酔薬が ICU でも鎮静のために使用されるようになってきた。これまでの研究で、虚血再灌流障害に対する心筋保護や免疫作用への影響など、吸入麻酔薬はさまざまな臓器において非麻酔作用を有することが明らかになっている。また、近年吸入麻酔薬が敗血症モデルマウスの生存率を上昇させたことが報告された。そのため、鎮静薬は急性期に使用を避けられないが、その中でも吸入麻酔薬が ICU-AW の予防法となり得るかを検証するため吸入麻酔薬が骨格筋に及ぼす影響を検討することとした。

敗血症モデルを用いて吸入麻酔薬が骨格筋に及ぼす影響を検討したが、吸入麻酔薬自体が筋萎縮を引き起こすという結果を得た。そのため、まずは吸入麻酔薬が骨格筋に及ぼす影響について発生機序を含め詳細に検討することとした。骨格筋量は、蛋白分解と蛋白合成のバランスで決定される。蛋白分解に関与する主要な経路には、ユビキチン-プロテアソーム経路(UPP)とオートファジー-リソソーム経路(ALP)がある。2つの筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼ、Atrogin-1 と MuRF1 の発現量増加は筋萎縮に寄与している。LC3-II は、オートファゴソームの特異的マーカーと考えられており、オートファジーが誘導される際に発現量が増加する。これらの蛋白分解の制御には、転写因子 FOXO3a が関与している。一方、蛋白合成は、mTOR 経路を介して p70 S6K と 4E-BP1 が活性化される。そして、インスリン/IGF-1 経路の下流である Akt が、mTOR と FOXO3a の両方の活性を制御していることが明らかになっている。

吸入麻酔薬が骨格筋麻酔薬の直接的な影響を調べるために C2C12 筋管を用いた *in vitro* 実験を行い、吸入麻酔薬の影響を不動化モデルと比較して評価するためにマウスを用いた *in vivo* 実験を行った。

2. 研究の目的

集中治療を要する重症患者の多くにみられる筋萎縮と筋力低下を呈する ICU-AW は、長期・短期死亡率の上昇、退院後の QOL の低下と関連するため、予防法の確立が喫緊の課題である。重症患者において鎮静は避けられないが、不動化を伴うため ICU-AW の危険因子として挙げられる。一方、近年新たな気化器が開発され ICU でも使用され始めた吸入麻酔薬は、虚血再灌流障害に対する心筋保護や免疫作用への影響など、非麻酔作用を有することが報告されている。そのため、吸入麻酔薬が骨格筋に及ぼす影響を検討し、ICU-AW の予防法の確立に寄与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

培養細胞を用いた *in vitro* 実験とマウスを用いた *in vivo* 実験に分けて研究を遂行した。

(1) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験

マウス由来筋細胞株 (C2C12 細胞) を 10%FBS 含有 DMEM 培地で 37°C、5%CO₂ で培養し、細胞がコンフルエントに達した後 2%HS 含有 DMEM 培地に交換した。4 日間培養して筋管形成した細胞を用いて実験を行った。

吸入麻酔薬の曝露は、C2C12 筋管細胞を 37°C に維持したチャンバー内に静置し、混合ガス (21%O₂、74%N₂、5%CO₂) を 2 L/分 で供給しつつ麻酔薬気化器を用いて吸入麻酔薬を曝露させた。吸入麻酔薬として手術室や集中治療室で広く使用されているイソフルラン (1.4%、2.8%) とセボフルラン (2.5%、5.0%) を培養細胞に 8 時間または 16 時間曝露させた。吸入麻酔薬濃度

は、マウスにおける 1 最小肺胞濃度 (MAC) を参考に決定した; イソフルラン (1.4%)、セボフルラン (2.5%)。また、麻酔薬分析装置 (ATOM MEDICAL) を用いて麻酔薬濃度を連続的にモニターした。対照群は、チャンバー内に混合ガスを 2 L/分のみ送気させた。

Akt リン酸化剤である IGF-1 を用いた実験では、IGF-1 (50 ng/mL) を投与しその後吸入麻酔薬に暴露させた。

(2) マウスを用いた *in vivo* 実験

8 - 12 週齢の C57BL/6N マウスに吸入麻酔薬を暴露させた群を二つの不動化モデルと比較した。実験中はマウスを絶飲食とし 6 時間後に骨格筋 (前脛骨筋と腓腹筋) を採取した。本研究 (No.22580) は、京都大学動物実験委員会 (京都、日本) の承認を得た。

各群に関しては、下記の通りである。

吸入麻酔薬暴露群

気化器を用いて 1.0% イソフルランをチャンバー内に送気しマウスに暴露させ 6 時間後に骨格筋を採取した。

坐骨神経切断モデル群

イソフルラン麻酔下に左坐骨神経を切断し 6 時間後に骨格筋を採取した。

後肢懸垂モデル群

尾部を高所に結びつけて後肢の重力負荷を免じた状態を維持し 6 時間後に骨格筋を採取した。

検討項目の詳細は下記の通りである。

免疫蛍光染色法

C2C12 筋芽細胞は、L-リジンでコーティングしガラスカバースリップ上で培養した。分化 4 日目に、細胞を 4% パラホルムアルデヒド / リン酸緩衝液で固定し 0.1% Triton X-100/PBS で透過処理後、抗 MyHC 抗体 (R&D systems)、Alexa Flour 488 結合ヤギ抗マウス抗体 (CST) と反応させた。画像を ECLIPSE Ts2-FL 蛍光顕微鏡 (Nikon) で撮影し、筋管細胞の直径を、cellSens Standard イメージングソフトウェア (OLYMPUS) で測定した。

qRT-PCR 法

培養細胞および腓腹筋から Sepasol (ナカライテスク) を用いて RNA を抽出し、One Step TB Green PrimeScript RT-PCR Kit II (タカラバイオ) を用いて RT-PCR を施行した。リファレンス遺伝子として GAPDH を用い、Atrogin-1 及び MuRF1 mRNA の発現量を解析した。

Western blotting (WB) 法

培養細胞及びマウスの骨格筋から蛋白を抽出し、SDS-PAGE で分画後分離した蛋白を PVDF 膜に転写した。ブロッキングし一次抗体を 4°C で一晩反応させた後に二次抗体と反応させ化学発光試薬を用いて ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad Laboratories) で検出した。各蛋白発現量はソフトウェア Image J を用いて解析した。

一次抗体は以下の抗体を用いた; β -actin (proteintech)、Fbx32 [Atrogin-1] (Santa Cruz)、MuRF1 (Santa Cruz)、LC3B (CST)、phospho-mTOR [Ser2448] (CST)、mTOR (CST)、phospho-Akt [Ser473] (CST)、Akt (CST)、phospho-p70 S6 Kinase [Thr389] (CST)、p70 S6 Kinase (CST)、phospho-4E-BP1 [Thr37/46] (CST)、4E-BP1 (CST)、Puromycin (Merck Millipore)。

SUnSET 法

C2C12 筋管細胞に吸入麻酔薬を暴露後、1 μ M の Puromycin を含む分化培地に交換した。30 日間インキュベートした後、細胞を回収し WB 法を用いて解析した。

統計分析

統計的有意性は、Prism 10.0 (GraphPad Software) を用いて、対応のない t 検定または Tukey-Kramer 検定による一元配置分散分析により解析した。P \leq 0.05 を有意とみなした。

4. 研究成果

本研究は、吸入麻酔薬が骨格筋に及ぼす影響を検討した。

(1) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験

筋管細胞の直径の測定

吸入麻酔薬の筋管細胞直径への影響を検討するため、抗 MyHC 抗体を用いた免疫蛍光染色を用いて解析した。イソフルラン (1.4%, 2.8%) を暴露した結果、C2C12 筋管細胞の直径は濃度依存性に縮小した。また、セボフルラン (2.5%, 5.0%) を暴露した場合でも C2C12 筋管細胞の直径は濃度依存性に縮小した。これらの結果から、吸入麻酔薬は直接筋萎縮を引き起

こす可能性があることが示唆された。

蛋白分解に及ぼす影響

吸入麻酔薬による筋萎縮の機序を明らかにするため、蛋白分解と蛋白合成に分けて検討した。まず、蛋白分解に関与する二つの経路；UPP と ALP への影響を解析させた。

- ・イソフルラン暴露は濃度依存性に Atrogin-1, MuRF1 mRNA 及び蛋白発現量を増加させた。
- ・イソフルラン暴露は濃度依存性に LC3-II蛋白発現量を増加させた。
- ・セボフルラン暴露も濃度依存性に Atrogin-1, MuRF1 mRNA 及び蛋白発現量を増加させた。
- ・セボフルラン暴露も濃度依存性に LC3-II蛋白発現量を増加させた。

以上の結果から、吸入麻酔薬は UPP 及び ALP を介して蛋白分解を亢進することが示唆された。

蛋白合成に及ぼす影響

蛋白合成への影響を検討するため、SUnSET 法及び WB 法を用いて解析した。

- ・イソフルラン暴露は濃度依存性に Puromycin でラベルされた蛋白の発現量を減少させた。
- ・イソフルラン暴露は濃度依存性に p70S6K のリン酸化を低下させた。
- ・セボフルラン暴露も濃度依存性に Puromycin でラベルされた蛋白の発現量を減少させた。
- ・セボフルラン暴露も濃度依存性に p70S6K のリン酸化を低下させた。

以上の結果から、吸入麻酔薬は蛋白合成を低下することが示唆された。

関連するシグナル伝達経路の解明

吸入麻酔薬による蛋白分解亢進と蛋白合成低下に対する機序として、Akt-mTOR 経路および Akt-FOXO3a 経路について検討した。IGF-1 を用いた実験により、吸入麻酔薬による作用に Akt 経路が関与していることを確かめた。

- ・イソフルラン暴露は Akt および mTOR のリン酸化を減少させた。
- ・イソフルラン暴露は FOXO3a 発現量を増加させた。
- ・IGF-1 の前投与は、イソフルランによる筋管径の縮小を打ち消した。
- ・IGF-1 の前投与は、イソフルランによる Atrogin-1 及び MuFR1 mRNA の増加を抑制した。
- ・IGF-1 の前投与は、イソフルランによる Atrogin-1 及び MuFR1 mRNA の増加を抑制した。
- ・IGF-1 の前投与は、イソフルランによる LC3-II蛋白の増加を抑制した。
- ・IGF-1 の前投与は、イソフルランによる p70S6K のリン酸化低下を抑制した。
- ・IGF-1 の前投与は、イソフルランによる Akt のリン酸化低下を抑制した。

以上の結果から、吸入麻酔薬による筋管細胞の萎縮は Akt 経路を介していることが示唆された。

(2) マウスを用いた *in vivo* 実験

坐骨神経切断モデルとの比較

イソフルラン暴露群と坐骨神経切断モデル群に対して 6 時間後に骨格筋を採取し比較検討した。

- ・イソフルラン暴露は、坐骨神経切断モデルに比べて Akt リン酸化を低下させた。
- ・イソフルラン暴露は、坐骨神経切断モデルに比べて Atrogin-1 及び MuFR1 mRNA の発現量を増加させた。
- ・イソフルラン暴露は、坐骨神経切断モデルに比べて Atrogin-1 及び MuFR1 蛋白の発現量を増加させた。
- ・イソフルラン暴露は、坐骨神経切断モデルに比べて LC3-II蛋白発現量を増加させた。
- ・イソフルラン暴露は、坐骨神経切断モデルに比べて p70S6K 及び 4E-BP のリン酸化を低下させた。

後肢懸垂モデルとの比較

後肢懸垂モデル群、イソフルラン暴露群に対して、6 時間後に骨格筋を採取し比較検討した。

- ・イソフルラン暴露は、後肢懸垂モデルに比べて Akt リン酸化を低下させた。
- ・イソフルラン暴露は、後肢懸垂モデルに比べて Atrogin-1 及び MuFR1 mRNA の発現量を増加させた。
- ・イソフルラン暴露は、後肢懸垂モデルに比べて Atrogin-1 及び MuFR1 蛋白の発現量を増加させた。
- ・イソフルラン暴露は、後肢懸垂モデルに比べて LC3-II蛋白の発現量を増加させた。
- ・イソフルラン暴露は、後肢懸垂モデルに比べて p70S6K 及び 4E-BP のリン酸化を低下させた。

以上のイソフルラン暴露を二つの不働化モデルと比較した結果から、イソフルラン暴露が不働化モデルに比べて Akt 経路を介して蛋白分解を亢進し蛋白合成を低下させることが示唆された。

本研究では、C2C12 筋管細胞において吸入麻酔薬が蛋白分解を亢進させるだけでなく蛋白合

成を低下させて筋萎縮を引き起こすことを示した。また、IGF-1 を用いた実験を通して、吸入麻酔薬の効果は Akt 経路を介していることを明らかにした。マウスにイソフルランを曝露させた *in vivo* 実験では、イソフルラン曝露が不動化モデルに比べて骨格筋における Akt リン酸化を低下させ、蛋白分解の亢進と蛋白合成の低下を引き起こすことを示した。本研究の結果から、吸入麻酔薬の曝露が Akt 経路を介して骨格筋に直接作用することで単なる不動化よりも大きな影響を及ぼすことを明らかにした。

ICU 入室患者においては、運動機能障害 (ICU-Acquired Weakness を含む) を予防するために鎮静を最小限にすることが重症患者管理の標準となっている。本研究結果は、この標準的な鎮静管理を支持すると考えられる。一方で、敗血症患者においては様々な炎症性サイトカインが NF- κ B 経路を含む様々なシグナル伝達経路を活性化し筋萎縮を引き起こすことが報告されている。吸入麻酔薬は抗炎症作用を有するとの報告もあり、侵襲的条件下での骨格筋に対する吸入麻酔薬の効果についてはさらなる検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Shino Matsukawa, Shinichi Kai, Hideya Seo, Kengo Suzuki, Kazuhiko Fukuda | 4. 巻 16(5) |
| 2. 論文標題 Activation of the α -adrenergic receptor exacerbates lipopolysaccharide-induced wasting of skeletal muscle cells by increasing interleukin-6 production | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e0251921 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0251921 | 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 Akihisa Taguchi, Shinichi Kai, Moritoki Egi |
| 2. 発表標題 Inhaled anesthetics induce skeletal muscle atrophy via the Akt pathway |
| 3. 学会等名 The 24th KSCCM-JSICM Joint Congress（国際学会） |
| 4. 発表年 2023年～2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田口聡久、甲斐慎一、瀬尾英哉、松川志乃、江木盛時 |
| 2. 発表標題 吸入麻酔薬はAkt経路を介してマウス骨格筋細胞を萎縮させる |
| 3. 学会等名 第51回日本集中治療医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年～2024年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 甲斐慎一、田口聡久、松川志乃、江木盛時 |
| 2. 発表標題 敗血症モデルにおけるチオ硫酸による筋萎縮への予防効果 |
| 3. 学会等名 日本Shock学会 第37回学術集会 |
| 4. 発表年 2023年～2024年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 甲斐慎一 |
| 2. 発表標題 敗血症における筋萎縮と鎮静薬の影響 |
| 3. 学会等名 第50回日本集中治療医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023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 |

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 |
|---------|---------|