

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593008

研究課題名(和文)揮発性麻酔薬による虚血心筋保護効果におけるオートファジーの役割の解明

研究課題名(英文)The role of autophagy in cardioprotection by volatile anesthetics

研究代表者

宮前 雅見(MIYAMAE, Masami)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20298821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：セボフルランプレコンディショニング(SEVO-PC)の虚血心筋保護効果は虚血時間が長いと消失する。そこで、虚血前のオートファジー誘導によりこの効果を回復できるかを検討した。モルモット灌流心で30分または45分間の虚血後120分間再灌流を行った。30分虚血ではSEVO-PCの梗塞縮小効果は見られたが、45分間虚血では消失した。オートファジー誘導剤クロラムフェニコールを虚血前に投与すると梗塞サイズ縮小効果は回復した。Calceinによるmitochondrial permeability transition pore(MPTP)の検討で、この現象にはMPTP開口抑制が関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Sevoflurane preconditioning(SEVO-PC) is lost if the ischemic insult is too long. We examined whether induction of autophagy prolongs SEVO-PC protection during a longer ischemic insult. Isolated guinea pigs hearts were subjected to 30 or 45min ischemia, followed by 120min reperfusion. Anesthetic preconditioning was elicited with 2% sevoflurane for ten minutes prior to ischemia. Infarct size sparing effect of SEVO-PC was seen in 30min ischemia, but not 45min ischemia. Induction of autophagy by chloramphenicol prior to ischemia restored the infarct size limiting effect of SEVO-PC lost by 45min ischemia. Western blot analysis showed that expression of Akt and glycogen synthase kinase 3beta was enhanced by induction of autophagy. The effect of autophagy on calcium-induced mitochondrial permeability transition pore(MPTP) opening in isolated mitochondria from cardiomyocytes was assessed. The restoration of SEVO-PC lost by 45min ischemia is associated with enhanced inhibition of MPTP by autophagy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：sevoflurane heart cardioprotection autophagy ischemia

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会により高血圧、虚血性心疾患、動脈硬化などの循環器疾患を有する患者の全身麻酔の機会が増加している。これらの患者は術中、術後に急性冠症候群に陥り、広範囲急性心筋梗塞からポンプ失調をきたし、死に至ることもある。このような high risk 患者の致死合併症を防ぐためには心筋に虚血耐性を惹起させるような全身麻酔法の確立が急務である。一般に揮発性麻酔薬は循環抑制があることが知られている。しかし、近年イソフルラン、セボフルランなどの揮発性麻酔薬が心筋に対して Ischemic Preconditioning (IPC: 長時間虚血前の反復する短時間虚血再灌流が、続発する長時間虚血による心筋梗塞巣を劇的に縮小する現象) 様の虚血心筋保護効果を有することが明らかとなり、Anesthetic Preconditioning (APC) と呼ばれている。IPC のメカニズムとして我々はこれまで再灌流後の心筋代謝が改善すること (Circulation 88:223-234, 1993)、短時間虚血再灌流時の ROS 産生が重要な役割を果たすこと (Exp Clin Cardiol 7:173-179, 2003) を報告した。一方、揮発性吸入麻酔薬と同様に薬理的プレコンディショニングを惹起できるものとして我々は慢性軽度～中等度のアルコール摂取を世界で初めて提唱し、この虚血心筋保護効果は IPC に匹敵すること (Proc Natl Acad Sci USA 94: 3235-3239, 1997)、そのメカニズムには種差があること (Am J Physiol 275:H50-56, 1998)、protein kinase C (PKC) が関与すること (Proc Natl Acad Sci USA 95:8262-8267, 1998) を報告した。また、揮発性麻酔薬の心保護のメカニズムとしてセボフルランが抗アポトーシス効果を有すること (Anesthesiology 339, 2004, J Anesth 24: 215-224, 2010)、アルコールによる IPC 効果をさらに増強すること (Anesth Analg 106: 9-16, 2008)、効果の持続には心筋細胞内 PKC- $\beta$  の細胞膜への translocation が関与すること (Eur J Anaesthesiol 26:582-588, 2009)、再灌流後の protein kinase C- $\beta$ 、glycogen synthase kinase 3 (GSK-3 $\beta$ ) のリン酸化が重要であること (Anesthesiology 111:1036-1043, 2009) を報告した。

不全心の細胞死のメカニズムとしてネクローシス、アポトーシス、オートファジーなどが知られている。我々は揮発性麻酔薬の心筋保護効果においてネクローシス、アポトーシスの抑制を明らかにしたが、オートファジーの関与は未だ報告がない。オートファジー (自食作用、自己貪食) は飢餓応答、細胞内浄化、老化などとの関連が考えられてきたが、最近、遺伝学研究により多数のオートファジー関連遺伝子 (Atg 遺伝子) 群が発見され、新たな役割が次々と解明されてきた。心筋では虚血や圧負荷などのストレス応答としても誘導される。一方、オートファジーが過度

に誘導されることが、心筋の変性や細胞死の実行に深く関与している可能性も示唆され、心筋のホメオスタシス維持に多面的な役割を果たしていると考えられている。現在、オートファジーの誘導が虚血心筋に対して保護的に働くか細胞死の誘導になるのか意見の一致を見ておらず、揮発性麻酔薬の虚血心筋保護作用におけるオートファジーの関与については未だ報告を見ない。最近、antimicrobial agent である Sulfaphenazole による虚血心筋保護にはオートファジーと PKC が必要であることが報告されており、セボフルランによる心筋保護でのオートファジーの関与を示唆するものである。我々はセボフルランを虚血再灌流直後に投与することでアポトーシスに関与する caspase 3, 9 の活性化阻止を介して梗塞サイズが縮小できることを報告した (J Anesth 24: 215-224, 2010)。

上述より、アポトーシスとオートファジーは密接に関連することから、セボフルランによる心筋保護においてオートファジーがどのように作用しているかを明らかにしたい。これらの解明は全身麻酔時における心筋保護に最も有効な麻酔方法の確立に大きく寄与するものと思われる。

## 2. 研究の目的

不全心の心筋細胞死のメカニズムとしてネクローシス、アポトーシス、オートファジーなどが提唱されている。揮発性麻酔薬はネクローシス、アポトーシスを抑制し、虚血心筋保護作用を有することが明らかとなっている。しかし、オートファジーの関与については未だ報告がない。本研究の目的は、臨床で用いられる揮発性麻酔薬の心筋保護作用におけるオートファジーの関与を明らかにし、全身麻酔時における周術期心筋保護に最も有効な麻酔方法の確立を分子生物学的手法を用いて解明することである。セボフルランプレコンディショニング (Sevo PC) は周術期の虚血心筋を保護するが、その効果は、虚血時間が長すぎると消失する。我々は虚血前のオートファジーの誘導が長時間虚血により消失した Sevo PC の心筋保護効果を回復できるか検討した。

## 3. 研究の方法

1) 虚血再灌流実験: 体重約 600 g のモルモットを用い腹腔内に pentobarbital (60mg/kg) を投与後、心臓を摘出した。Langendorff 灌流装置で灌流圧 70mmHg にて定圧灌流を行った。20 分間血行動態安定後、大動脈ラインを遮断し、30 分または、45 分間の虚血後 120 分間再灌流 (IR) を行った (CTL-30, CTL-45, 各 n=8)。これにそれぞれセボフルラン (2%) を虚血前 10 分間投与した群 (SEVO-30, n=8, SEVO-45, n=9) と、オート

ファジー誘導剤クロラムフェニコール (CAP: 300  $\mu$ M) を 45 分の虚血前 20 分間と IR 中投与した群 (CAP-45, n=8)、これに SEVO を加えた群 (SEVO-45+CAP, n=8)、さらにこれにオートファジーの阻害薬である 3-methyladenine (3-MA: 10  $\mu$ M) を投与した群 (SEVO+CAP+3-MA, n=8) を作製した。これらの群で、左心室圧 (LVDP)、左心室終末拡張期圧 (LVEDP)、冠血流量 (CF)、梗塞サイズ (IS) を比較した。梗塞サイズの同定は再灌流終了後、心臓を水平方向にカットし、37 にて 1% の 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) で 10 分間 incubate して梗塞領域と非梗塞領域を区別した。Adobe Photoshop image にて梗塞サイズを算出した。

2) 電子顕微鏡によるオートファゴゾームの出現程度の検討: 上記の群のそれぞれで虚血前に心筋を採取し、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、電子顕微鏡でオートファゴゾームの出現程度を比較検討した。

3) Western blot によるシグナル伝達物質の発現の検討: オートファジー関連蛋白である LC3-II/LC3-I、心保護に関与するとされる Akt, Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) の発現を調べ、オートファジーの出現程度との関連を検討した。

4) Flow cytometry によるミトコンドリア内膜透過性遷移ポア (MPTP) の検討: 虚血心筋の細胞残存にはミトコンドリア内膜透過性遷移ポア (MPTP) の開口抑制が重要であることがわかっている (West MB et al. Circulation 2008)。上記のそれぞれの群から単離ミトコンドリアを採取し、蛍光色素である calcein (1  $\mu$ mol/L) を負荷した。その後、Ca<sup>2+</sup> (50-100  $\mu$ mol/L) を加え、MPTP の開口による fluorescence の低下を検討した。

#### 4. 研究成果

1) 虚血再灌流実験: 血行動態では IR 後 SEVO-30 のみ他の群に比し LVDP が高く、LVEDP が低かった。梗塞サイズは 30 分虚血ではセボフルランを投与した群でコントロールに比べ有意に縮小した (Sevo-PC: SEVO-30: 24  $\pm$  8% vs. CTL-30: 48  $\pm$  6%, p<0.05)。しかし、この効果は 45 分では消失した (SEVO-45: 53  $\pm$  6% vs. CTL-45: 54  $\pm$  11%, p=NS)。45 分虚血に対し、クロラムフェニコールを虚血前に投与した群ではこの効果が回復した (SEVO-45+CAP: 34  $\pm$  8% vs. SEVO-45: 52  $\pm$  10%, p<0.05)。しかし、これにオートファジーの阻害薬である 3-MA を投与するとこの回復効果は消失した (SEVO-45+CAP+3MA: 51  $\pm$  8% vs. CTL-45: 54  $\pm$  11%, p=NS)。冠血流量 (CF) はすべての群で有意差はなかった。

2) 電子顕微鏡によるオートファゴゾームの出現程度の検討: オートファゴゾームは、

SEVO-45+CAP で他群に比して有意に増加した。しかし、3-MA を投与した群ではオートファゴゾームは見られなかった。

3) Western Blot による蛋白発現の検討: オートファジーの指標である LC3-II/I はクロラムフェニコールを投与した群では有意に上昇した (SEVO-45+CAP)。しかし、3-MA を投与した群では上昇しなかった。Akt, GSK3 のリン酸化の発現も同様の結果が見られた。

4) Flow cytometry による MPTP の検討: 50  $\mu$ M calcium 負荷ではどの群でも fluorescence の低下は見られなかった。しかし、150  $\mu$ M calcium 負荷では SEVO, CAP を投与しなかった群、および 3-MA を投与した群では有意に低下した (MPTP の開口)。特に SEVO と CAP の両方を投与した群 (SEVO-45+CAP) では最も fluorescence の低下が小さかった。

以上の結果は、長時間虚血により消失した Sevo PC の心筋保護効果が虚血前のオートファジーの誘導により回復することを示唆する。その効果には MPTP の開口阻止によるミトコンドリアの保護が重要な役割を果たしていることが明らかになった。虚血前のオートファジーの誘導は周術期の心筋保護における新しい戦略となりうる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Shiomi M, Miyamae M, Takemura G, Kaneda K, Inamura Y, Onishi A, Koshinuma S, Momota Y, Minami T, Figueredo VM. Induction of autophagy restores the loss of sevoflurane cardiac preconditioning seen with prolonged ischemic insult. Eur J Pharmacol. 査読有, 724 巻, 2014, 58-66. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.12.027.

Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. J Anesth. 査読有, 28 巻, 2014, 235-241. DOI: 10.1007/s00540-013-1716-3.

Shiomi M, Miyamae M, Takemura G, Kaneda K, Inamura Y, Onishi A, Koshinuma S, Momota Y, Minami T, Figueredo VM. Sevoflurane induces cardioprotection through reactive oxygen species-mediated upregulation of autophagy in isolated guinea pig hearts. J Anesth. 査読有, 2014. (in press) DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.12.027.

Onishi A, Miyamae M, Inoue H, Kaneda K, Okusa C, Inamura Y, Shiomi M, Koshinuma S,

Momota Y, Figueredo VM. Sevoflurane confers additive cardioprotection to ethanol preconditioning associated with enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 査読有, 27 巻, 2013, 916-924. DOI: 10.1053/j.jvca.2012.10.002.

Yamabayashi K, Momota Y, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J. Lidocaine protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in anesthetized rabbits. *J Osaka Dent Univ*. 査読有, 47 巻, 2013, 201-207.

Miyamae M, Kaneda K, Inamura Y, Shiomi M, Koshinuma S, Momota Y, Figueredo VM. Sevoflurane increases p38 mitogen activated protein kinase phosphorylation during ischemia, but its cardioprotective effect is not blocked by SB 203580. *J Oral Tissue Engin*. 査読有, 11 巻, 2013, 17-28.

Pressman GS, Qasim A, Verma N, Miyamae M, Arishiro K, Notohara Y, Crudu V, Figueredo VM. Periodontal disease is an independent predictor of intracardiac calcification. *Biomed Res Int*. 査読有, Volume 2013, Article ID 854340, 6 pages. DOI: 10.1155/2013/854340.

Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes: Comparison with cyclosporine A. *Eur J Pharmacol*. 査読有, 657 巻, 2012, 40-46. DOI:10.1016/j.ejphar.2011.11.040.

[学会発表](計 18 件)

越沼 静, 宮前雅見, 金田一弘, Figueredo VM, 小谷順一郎. 心筋虚血再灌流障害におけるネクロプトーシス, アポトーシス阻害による相乗効果. 第 540 回大阪歯科学会例会 2013.10.19.大阪歯科大学, 枚方市.

Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, Figueredo VM, Kotani J. Synergistic effects of necroptosis and apoptosis inhibition against myocardial ischemia-reperfusion injury. The Anesthesiology 2013 Annual Meeting. 2013.10.13. San Francisco, USA.

越沼 静, 宮前雅見, 金田一弘, 大草知佳, 稲村吉高, 大西杏奈, 小谷順一郎. 心筋虚血再灌流障害におけるネクロプトーシス RIP1 の役割とアポトーシスとの関連. 第 41

回日本歯科麻酔学会総会・学術集会. 2013.10.4. 新横浜国際ホテル, 横浜市.

山林一公, 百田義弘, 宮前雅見, 金田一弘, 小谷順一郎. 麻酔下ウサギ心筋虚血再灌流モデルを用いたリドカインの心筋保護効果. 第 539 回大阪歯科学会例会 2013.6.8. 大阪歯科大学, 枚方市.

越沼 静, 宮前雅見, 金田一弘, 大草知佳, 稲村吉高, 大西杏奈, 小谷順一郎. 心筋虚血再灌流障害における necroptosis の関与. 第 40 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会. 2012.10.6.アクロス福岡, 福岡市.

稲村吉高, 宮前雅見, 金田一弘, 大草知佳, 越沼 静, 大西杏奈, 小谷順一郎. セボフルランポストコンディショニングの虚血心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要である. 第 40 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会. 2012.10.6.アクロス福岡, 福岡市.

大西杏奈, 宮前雅見, 金田一弘, 大草知佳, 稲村吉高, 塩見真由美, 越沼 静, 小谷順一郎, 高瀬奈緒, 古北まゆ子, 立石智子, 高石和美, 江口 覚, 富岡重正, 北畑 洋. セボフルラン・エタノールによる心筋プレコンディショニングの細胞内メカニズムの解明. 第 9 回日本歯科麻酔学会中国・四国地方会. 2012.7.29. 岡山大学, 岡山市.

稲村吉高, 宮前雅見, 金田一弘, 大草知佳, 塩見真由美, 小谷順一郎. セボフルランポストコンディショニングの虚血心筋保護効果にはオートファジーの誘導が必要である. 日本麻酔科学会第 59 回学術集会. 2012.6.8. 神戸ポートピアホテル, 神戸市.

塩見真由美, 宮前雅見, 金田一弘, 稲村吉高, 竹村元三, 南 敏明. 心筋虚血前のオートファジーの誘導は長時間虚血により消失したセボフルランプレコンディショニング効果を回復させる. 日本麻酔科学会第 59 回学術集会. 2012.6.8. 神戸ポートピアホテル, 神戸市.

Momota Y, Shibata H, Nakagomi T, Nakano-Doi A, Okusa C, Miyamae M, Matsuyama T, Kotani J. Cerebral protection effects of lidocaine using a transient cortical ischemia model. 13<sup>th</sup> International Dental Congress on Anesthesia, Sedation, and Pain Control. 2012.3.2. Cona, Hawaii USA.

Yamabayashi K, Momota Y, Miyamae M, Okusa C, Kaneda K, Figueredo VM. Lidocaine

postconditioning attenuates myocardial infarct size *in vivo* rabbits hearts: role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 ERK 1/2. 13<sup>th</sup> International Dental Congress on Anesthesia, Sedation, and Pain Control. 2012.3.2. Cona, Hawaii USA.

大西杏奈, 宮前雅見, 金田一弘, Figueredo VM, 小谷順一郎. セボフルランプレコンディショニングは cyclosporine A と同程度にミトコンドリア膜遷移透過性ポア開口を抑制し心筋保護をもたらす. 第531回大阪歯科学会例会. 2011.12.10. 大阪歯科大学, 枚方市.

Inamura Y, Miyamae M, Kaneda K, Okusa C, Onishi A, Okamura S, Shiomi M, Momota Y, Figueredo VM, Kotani J. Sevoflurane postconditioning reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by induction of autophagy in isolated guinea pig hearts. 9<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD) from Prevention to Intervention 2011. 2011.10.25. Venice, Italy.

Okusa C, Miyamae M, Kaneda K, Inamura Y, Onishi A, Shiomi M, Okamura S, Momota Y, Kotani J, Figueredo VM. Dipyrindamole-induced cardiac preconditioning persists for 3 days after discontinuing therapy and is mediated through Akt activation. 9<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD) from Prevention to Intervention 2011. 2011.10.24. Venice, Italy.

Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Sevoflurane enhances ethanol preconditioning associated with augmenting phosphorylation of GSK3; and inhibition of MPTP opening. American Society of Anesthesiology 2011. 2011.10.18. Chicago, USA.

Shiomi M, Miyamae M, Kaneda K, Figueredo VM, Minami T. Induction of autophagy restores the loss of sevoflurane preconditioning. American Society of Anesthesiology 2011. 2011.10.16. Chicago, USA.

Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes:

Comparison with cyclosporine A. The 4<sup>th</sup> Annual Meeting of Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies. 2011.10.8. 神戸国際会議場, 神戸市.

Momota Y, Nakagomi T, Nakano-Doi A, Saino O, Kasahara Y, Taguchi A, Tanaka M, Tsukamoto Y, Miyamae M, Kotani J, Matsuyama T. Expression of neural stem cells induced by transient cortical ischemia in mice. Abstracts XXV<sup>th</sup> International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism, and Function 2011. 2011.5.25-28. Barcelona, Spain.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮前 雅見 (MIYAMAE, Masami)  
大阪歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 20298821

### (2) 研究分担者

堂前 尚親 (DOMAE, Naochika)  
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授  
研究者番号: 60115889

金田一弘 (KANEDA, Kazuhiro)  
大阪歯科大学・歯学部・講師 (非常勤)  
研究者番号: 90533886

杉岡 伸悟 (SUGIOKA, Shingo)  
大阪歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 90278573  
(削除: 平成 24 年 5 月 8 日)

小谷 順一郎 (KOTANI, Junichiro)  
大阪歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 40109327