

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791603

研究課題名(和文) 周術期関連薬剤によるインスリン抵抗性発現機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of insulin resistance induced by the drugs on the perioperative period

研究代表者

与那覇 哲 (YONAHA, TETSU)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70468023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔薬セボフルランはマウス繊維芽細胞由来脂肪細胞(3T3L1)のグルコース代謝速度を低下させ、グルコースの取り込みを抑制していると考えられた。また、セボフルランは3T3L1細胞膜へのグルコース輸送体GLUT4のtranslocationを抑制している可能性がある。また、インスリン受容体蛋白質の増加、PKC 蛋白質の減少傾向が認められ、グルコース輸送に関わる経路の蛋白質発現に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glucose metabolic rate was decreased in sevoflurane treated murine fibroblast-derived adipocytes (3T3L1), suggesting suppressed glucose uptake. In addition, sevoflurane may suppress the translocation of glucose transporter GLUT4 to the cell membrane 3T3L1. Further, the increase of insulin receptor protein, decrease of PKC zeta protein was observed in sevoflurane treated 3T3L1, and are involved in protein expression of pathways involved in glucose transport was suggested.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：グルコース インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

1. ストレス性高血糖の疫学

重症疾患患者や術後患者において生じるストレス性高血糖は、以前は無害かあるいは有益な反応と考えられていた。近年、心筋梗塞後や術後の高血糖に対するインスリンを用いた血糖コントロールで予後が改善するという報告がなされ、その後も多くの有益性の報告がなされている。

(Malmberg K et al. J Am Coll Cardiol 1995;26:57-65, Berghe et al. New Eng J Med 2001;345:1359-67)

目標血糖値の範囲に関しては、低血糖のリスクも含め様々な反論もあるが、高血糖を維持した方が予後がよいという成績は存在しない。

2. 高血糖の有害性

高血糖の有害性の機序は自然免疫の抑制、炎症性サイトカインの活性化、活性酸素産生増加等により、感染リスクの増加や血管内皮障害が生じることによると考えられている。(Marik PE et al. Intensive Care Med 2004;30:748-56)

3. ストレス性高血糖の発生の機序

重症疾患患者や術後患者ではインスリン拮抗ホルモンとサイトカインの相互作用の結果、肝におけるグルコース生成亢進と、末梢組織のインスリン抵抗性が上昇することと考えられている。(Dungan KM et al. Lancet 2009;373:1798-807) 周術期関連薬剤については、イソフルレンがインスリン分泌を低下させ、その結果グルコースの体内利用に変化を及ぼし、高血糖をもたらすことが報告されている。

(Tanaka Anesthesiology 2009;111:1044-51) また、アドレナリン、ノルアドレナリンは 刺激を介して GLUT4 の translocation を阻害すると報告されている。(Alexandra H et al. Am J Physiol Endocrinol Metab

2005;289:E627-633)

しかし、麻酔薬等の周術期関連薬剤が直接的に末梢組織のインスリン抵抗性に関与しているかは不明な点が多い。そこで、研究代表者は麻酔薬そのものが細胞レベルでのインスリン抵抗性を亢進させる作用があると仮定し、以下の予備実験を行った。

a. セボフルレン曝露でラット L6 細胞(筋芽細胞由来筋管細胞)による蛍光標識グルコース 2NBDG 取り込みが抑制されるかを検証

96 ウェルプレートにて L6 細胞を培養し、セボフルレン曝露後に蛍光標識グルコース 2NBDG の取り込みをプレートリーダーで測定した。セボフルレン曝露後の 2NBDG 取り込みは減少し、セボフルレンが細胞レベルでグルコース取り込みを抑制することが示唆された。

b. セボフルレン曝露 L6 細胞の、細胞内グルコース輸送体 (GLUT4) の細胞表面への移動に関わる蛋白の Western blotting による定量

筋細胞におけるグルコース取り込みには、インスリン刺激を介した細胞内グルコース輸送体 (GLUT4) の細胞膜表面への移動 (translocation) および、細胞質への移動 (internalization) が関わっている。インスリン受容体以降の経路としては 3 経路が関わっているとされているが、最終的に Akt、PKC、 のリン酸化により translocation が促進され、internalization が抑制されると説明されている。研究代表者はセボフルレン曝露後 L6 細胞の phospho-Akt phospho-PKC を Western blotting にて解析した。セボフルレン曝露後の phospho-Akt、 phospho-PKC はインスリン刺激による反応性増加を認めず、セボフルレンによる GLUT4 の translocation が阻害されて

いる可能性が考えられた。この予備実験の結果を踏まえ、セボフルレン濃度依存性のインスリン抵抗性出現の検証、曝露時間によるインスリン抵抗性の検証、その他の周術期関連薬剤(プロポフォール、ケタミン、フェンタニル、レミフェンタニル、デクスメトミジン、アドレナリン、ノルアドレナリン、ドパミン等)について、インスリン抵抗性出現の検討を行い、またラットを用いた動物実験において薬剤曝露や薬剤の組み合わせにおけるインスリン抵抗性の程度の検証を行いたい。

2. 研究の目的

重症疾患患者や大手術後患者ではストレス性高血糖が発生することが以前から知られていた。近年、その予後、合併症などに関与することが多く報告されている。その機序についてストレスホルモンによるインスリン分泌低下や肝臓の糖新生、グリコゲン分解の亢進等の報告があるが、麻酔薬を含む周術期関連薬剤がグルコースの細胞内取り込みに及ぼす影響については不明な点が多い。

そこで周術期関連薬剤が細胞内グルコース取り込みに与える影響について、またその機序についてグルコース輸送体およびその周辺領域を中心に研究を行う。

具体的には、1.細胞モデルにおいて周術期関連薬剤の細胞内ブドウ糖取り込みへの影響を明らかにする 2.細胞モデルにおいて周術期関連薬剤のグルコース輸送体(GLUT4)への影響を明らかにする

3. 研究の方法

(1) 酵素サイクリングを利用した細胞内2-デオキシグルコース取り込み実験

本実験で用いる細胞は3T3-L1(マウス繊維芽細胞由来脂肪細胞)とした。本細胞はGLUT4を多く発現し、関連した多くの研

究に用いられている細胞である。

(Endocrinology

2005,146(12):5071-5078)

細胞の培養は10% fetal bovine serum 添加 Dulbecco 's Modified Eagle

Medium(DMEM)を用いた。分化誘導

は 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), dexamethasone, insulin を添加し5日間

培養したのち、insulin 添加 DMEM で2日間培養した。その後、DMEM で5日間培養

し、顕微鏡的に細胞内脂肪滴を確認した。これらの分化させた細胞を5%セボフル

レンを6時間曝露し、洗浄した後、酵素サイクリング法を用いた2DG代謝速度測定

キット(コスモバイオ)を用い、細胞内に取り込まれた2DGの代謝産物である2DG6P

を測定した。観察法としてはプレートリーダーを用いて吸光度測定を行った。

(2) 細胞膜分画、細胞質分画のWestern blottingによる GLUT4 蛋白質定量実験

分化させた3T3L1細胞にセボフルレンを6時間曝露し、洗浄した後、超音波破碎装置

にて細胞を破碎し、遠心分離を行い、細胞膜成分、細胞質成分に分別した。それぞれ

をゲルにて電気泳動を行い、膜に転写後、1次抗体(rat-GLUT4)を反応させ、標識2

次抗体を用いて目的蛋白質を測定した。

(3) 全細胞成分のwestern blottingによる Insulin receptor 蛋白質定量実験

分化させた3T3L1細胞にセボフルレンを6時間曝露し、洗浄した後、超音波破碎装置

にて細胞を破碎し、ゲルにて電気泳動を行い、膜に転写後、1次抗体(rabbit-Insulin

receptor)を反応させ、標識2次抗体を用いて目的蛋白質を測定した。

(4) 全細胞成分のwestern blottingによる PKC- 蛋白質定量実験

分化させた3T3L1細胞にセボフルレンを6時間曝露し、洗浄した後、超音波破碎装置

にて細胞を破碎し、ゲルにて電気泳動を行

い、膜に転写後、1次抗体 (rabbit-PKC) を反応させ、標識2次抗体を用いて目的蛋白質を測定した。

4. 研究成果

(1) 酵素サイクリングを利用した細胞内 2-デオキシグルコース (2DG) 取り込み実験
 分化培養した 3T3-L1 細胞を 5%セボフルランに 6 時間暴露した後、インスリンを作用させた。酵素サイクリング法を用いた 2DG 代謝速度測定キット (コスモバイオ) を用い、2DG が細胞内に取り込まれた代謝産物である 2DG6P をプレートリーダーを用いて吸光度測定をおこなった。(図 1)

セボフルラン暴露後にインスリンを作用させた細胞では、セボフルランを暴露させずにインスリンを作用させた細胞に比較して、インスリン作用後の細胞内 2DG6P 濃度が低い傾向にあった。セボフルランが細胞内へのグルコース取り込みを抑制している可能性が示唆された。

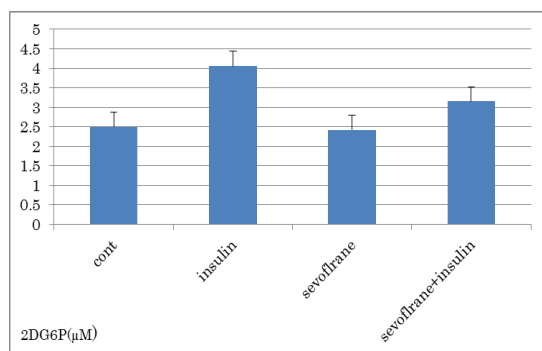


図 1

(2) 細胞膜分画、細胞質分画の Western blotting による GLUT4 蛋白質定量実験
 分化させた 3T3L1 細胞にセボフルランを 6 時間暴露し、洗浄した後、超音波破碎装置にて細胞を破碎し、遠心分離を行い、細胞膜成分、細胞質成分に分別した。それぞれをゲルにて電気泳動を行い、膜に転写後、1次抗体 (rat-GLUT4) を反応させ、標識2次抗体を用いて目的蛋白質を測定した。(図 2)

2)

セボフルラン暴露後にインスリンを作用させた細胞では、セボフルランを暴露させずにインスリンを作用させた細胞に比較して、細胞膜分画の GLUT4 蛋白質が減少していた。セボフルランの暴露が GLUT4 の細胞膜上への translocation を抑制している可能性が示唆された。

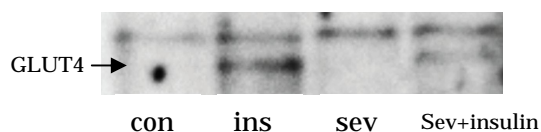


図 2

(3) 全細胞成分の western blotting による Insulin receptor 蛋白質定量実験

分化させた 3T3L1 細胞にセボフルランを 6 時間暴露し、洗浄した後、超音波破碎装置にて細胞を破碎し、ゲルにて電気泳動を行い、膜に転写後、1次抗体 (rabbit-Insulin receptor) を反応させ、標識2次抗体を用いて目的蛋白質を測定した。(図 3)

セボフルラン暴露後にインスリンを作用させた細胞では、セボフルランを暴露させずにインスリンを作用させた細胞に比較して、Insulin receptor 蛋白質が増加していた。このことは課題(1)でセボフルランの暴露がグルコースの取り込みを減少させる傾向と矛盾していた。この結果について今後さらなる研究と検証が必要であると考えられた。

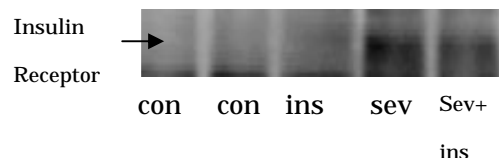


図 3

(4) 全細胞成分の western blotting による PKC- 蛋白質定量実験

分化させた 3T3L1 細胞にセボフルレンを 6 時間暴露し、洗浄した後、超音波破碎装置にて細胞を破碎し、ゲルにて電気泳動を行、膜に転写後、1 次抗体(rabbit--PKC) を反応させ、標識 2 次抗体を用いて目的蛋白質を測定した。

セボフルラン曝露後にインスリンを作用させた細胞では、セボフルランを暴露させずにインスリンを作用させた細胞に比較して、PKC 蛋白質が減少している傾向にあった。

(図 4)

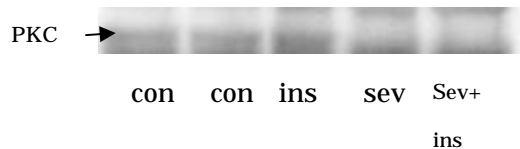


図 4

セボフルランの曝露は 3T3L1 細胞に対しインスリンの作用を抑制する傾向が見られた。しかし、インスリン受容体蛋白質はむしろ過剰発現傾向であった。セボフルランは GLUT4 の細胞膜への translocation に影響している可能性と同時にインスリン刺激から GLUT4 までの経路の蛋白質発現に影響している可能性が考えられた。今後さらなる研究によってその作用点について調査する必要があると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

与那覇 哲 (YONAHA, Tetsu)

宮崎大学医学部手術部・助教

研究者番号 : 70468623

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :