

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463081

研究課題名(和文)揮発性麻酔薬の虚血心筋保護作用におけるユビキチン・プロテアソーム系の役割の解明

研究課題名(英文)The role of ubiquitin proteasome system in cardioprotection by volatile anesthetics

研究代表者

宮前 雅見(Miyamae, Masami)

大阪教育大学・保健センター・教授

研究者番号：20298821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Ubiquitin-proteasome system (UPS)はシグナル伝達などの生命現象に関わっている。我々は揮発性麻酔薬による虚血心筋保護作用を報告して来た。この作用におけるUPSの役割を検討した。揮発性麻酔薬投与群では虚血再灌流後の心機能回復が良好であり、心筋組織の免疫組織化学染色ではミオグロビン陰性細胞が少なく、Ubiquitin染色強度が有意に高かった。電子顕微鏡ではオートファゴソームが多く見られ、特にコントロール群では麻酔薬投与群よりオートリソソームが多く消化段階での遅延が示唆された。この結果はUPSがオートファジーと密接に関連して虚血心筋細胞保護に働いていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Administration of sevoflurane prior to ischemia-reperfusion confers cardioprotective effects (sevoflurane preconditioning). We examined the role of ubiquitin proteasome system in this protective effects. Isolated guinea pigs hearts were subjected to 30 min ischemia, followed by 120 min reperfusion (CTL). Anesthetic preconditioning was elicited with 2% sevoflurane for ten minutes prior to ischemia (SEVO). Infarct size was reduced in SEVO compared with CTL. Immunohistochemical analysis revealed that there were less myoglobin-negative cells and ubiquitin and LC 3 stain were increased in SEVO. Electron microscopic study showed that there were more abundant autophagosomes in SEVO. These results suggests that ubiquitin proteasome system plays a role in cardioprotective effects of sevoflurane associated with autophagy.

研究分野：循環器内科

キーワード：sevoflurane ischemia-reperfusion heart ubiquitin-proteasome guine pig

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- ζ 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- δ 、glycogen synthase kinase 3 (GSK-3 β) 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。上記の如く、我々は揮発性麻酔薬の心筋保護効果においてもネクローシス、アポトーシスの抑制を明らかにし、近年はオートファジーの関与も明らかにした (Eur J Pharmacol 724:58-66, 2014, J Anesth 28:593-600, 2014)。オートファジーがミトコンドリアなどの大きな細胞内器官をリソゾームを介して貪食するのに対して、小さいタンパク質は ubiquitin-proteasome system (UPS) によりリソゾームを介さずにユビキチン修飾を受けプロテアソームにて

分解される。近年、ユビキチン修飾がエンドサイトーシス・DNA 修飾・翻訳調節・シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わることが判明している。オートファジーと UPS は心筋のホメオスター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。Suらは病的な蛋白質異常が生じるとオートファジーと UPS は並行して活性化するか、または一方が阻害されると代償的にどちらかが活性化することを報告した (Su et. al Cardiovasc Res 2010)。IPC ではオートファジーは保護的に働くとの報告が多いが、UPS についての報告はほとんど見られない。

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。我々は揮発性麻酔薬がネクローシス、アポトーシスを抑制し、オートファジーを upregulation することにより虚血心筋保護作用を発揮することを報告した。近年、ユビキチン修飾がエンドサイトーシス・DNA 修飾・翻訳調節・シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わることが判明している。オートファジーと UPS は心筋のホメオスター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。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 UPS の役割を明らかにし、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。

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 分間の虚血後 120 分間再灌流 (IR) を行った。これをコントロール群とした (SEVO, n=8)。セボフルラン群 (SEVO, n=8) では sevoflurane (2%) を虚血前 10 分間投与し、コントロール群と同様の虚血再灌流を行った。Sham 群として同様の処置を行うが虚血再灌流を行わない群も作成した (n=4)。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)免疫組織化学染色によるユビキチン等の発現の検討：虚血再灌流後、心筋を採取しホルマリン固定・パラフィン包埋後4ミクロン切片を作成、これに対し抗ミオグロビン抗体、抗ユビキチン抗体、オートファジー関連蛋白である抗LC3抗体、抗p62抗体を一次抗体として免疫染色(ABC法)を行った。

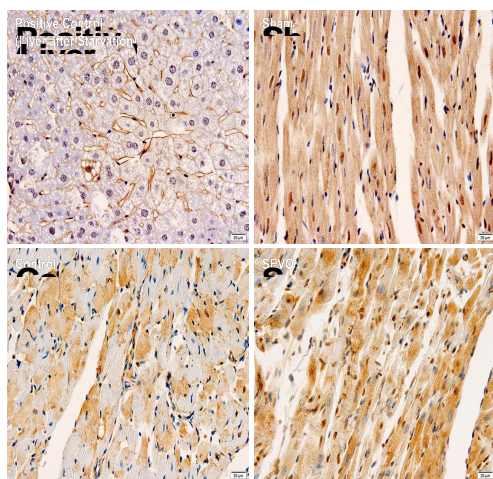
3)電子顕微鏡によるオートファゴゾームの出現程度の検討：上記の群のそれぞれで虚血再灌流後に心筋を採取し、細切後2.5%グルタルアルデヒドで固定、さらにオスミウムで後固定後、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を透過型電子顕微鏡(日立HT7700)にて観察した。それぞれの群でオートファゴゾームの出現程度、protein aggregationを比較検討した。

4. 研究成果

1)虚血再灌流実験:血行動態ではIR後SEVO群でLVDPが高く、LVDEP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:54±8% vs. CTL:28±6%, p<0.05)。冠血流量(CF)はすべての群で有意差はなかった。

2)免疫組織化学染色によるユビキチン等の発現の検討：SEVO群ではCTLに比べてミオグロビン陰性細胞が有意に少なかった。ユビキチン染色、LC3染色ではSEVO群ではCTLに比べて有意に強かった。P62染色ではCTL、SEVO両群でsham群に比べて強かった。

抗ユビキチン染色(弱拡大)



上段：左；positive control、右；Sham

下段：左；CTL、右；SEVO

3)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：autophagosomeは、CTL、SEVO両群でsham群に比べて増加していた。

特にCTL群ではオートリソゾームが目立った。Protein aggregationはすべての群で見られなかった。

4)以上の結果から以下のことが考察される。ミオグロビン染色においてSEVO群ではCTLに比べてミオグロビン陰性細胞が有意に少なかったことはセボフルランが虚血心筋保護効果を有することを示唆する。これは虚血再灌流実験の結果と合致するものである。さらにユビキチン、LC3染色の結果からはSEVO群ではUPSとオートファジーがともに亢進していると考えられる。CTLでもオートリソゾームが観察されるが、p62の結果からは消化段階での遅延が示唆された。protein aggregationがどの群でも見られなかったのは組織採取のタイミングの問題の可能性があり今後の検討を要する。上記の結果はセボフルランが心筋細胞保護効果を有することを示唆するものである。また、その機序の一つとしてユビキチンがオートファジーと関連して重要な役割を担っていることを示唆するものである。UPSと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12件)

Takemura G, Kanamori H, Okada H, Tsujimoto A, Miyazaki N, Takada C, Hotta Y, Takatsu Y, Fujiwara H. Ultrastructural aspects of vacuolar degeneration of cardiomyocytes in human endomyocardial biopsies. *Cardiovasc Pathol*. 査読無 2017 Jul 4;30:64-71. DOI: 10.1016/j.carpath.2017.06.012.

Kuno T, Imaeda S, Asakawa Y, Nakamura H, Takemura G, Asahara D, Numasawa Y. Mitochondrial cardiomyopathy diagnosed with histological and genetic analyses. *Case Rep Cardiol* 査読無 2017; Volume 2017, ArticleID 9473917. DOI: org/10.1155/2017/9473917

Okada H, Takemura G, Suzuki K, Oda K, Takada C, Hotta Y, Miyazaki N, Tsujimoto A, Muraki I, Ando Y, Zaikokuji R, Matsumoto A, Kitagaki H, Tamaoki Y, Usui T, Doi T, Yoshida T, Yoshida S, Ushikoshi H, Toyoda I, Ogura S. Three dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and septic conditions. *Critical Care*. 査読無 2017; 26:261. DOI: 10.1186/s13054-017-1841-8

Myoren T, Kobayashi S, Oda S, Nanno T, Ishiguchi H, Murakami W, Okuda S, Okada M, Takemura G, Suga K, Matsuzaki M, Yano M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative stress for prediction of cardiovascular-related death in patients with cardiac sarcoidosis. *Int J Cardiol.* 査読有 2016 Jun 1;212:206-213.
DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.03.003.

Takemura G, Onoue K, Kashimura T, Kanamori H, Okada H, Tsujimoto A, Miyazaki N, Nakano T, Sakaguchi Y, Saito Y. Electron microscopic findings are an important aid for diagnosing mitochondrial cardiomyopathy with mitochondrial DNA mutation 3243A>G. *Circ Heart Fail.* 査読有 2016 Jul;9(7). pii: e003283.
DOI:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003283.

Kanamori H, Takemura G, Goto K, Tsujimoto A, Mikami A, Ogino A, Watanabe T, Morishita K, Okada H, Kawasaki M, Seishima M, Minatoguchi S. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes. *Autophagy.* 査読有 2015 Jul 3;11(7):1146-1160.
DOI: 10.1080/15548627.2015.1051295

Okada H, Takemura G, Suzuki K, Miyazaki N, Kuroda E, Ito Y, Chikaishi T, Ushikoshi H, Ogura S. Substitution of chronic insulin therapy with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors. *Diabetes Res Open J.* 査読有 2015;1(3):77-78.
DOI:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001746

Morishita K, Takemura G, Tsujimoto A, Kanamori H, Okada H, Chousa M, Ushimaru S, Mikami A, Kawamura I, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Goto K, Morishita M, Ushikoshi H, Kawasaki M, Ogura S, Minatoguchi S. Postinfarction cardiac remodeling normally proceeds in granulocyte colony-stimulating factor knockout mice. *Am J Pathol.* 査読有 2015 Jul;185(7):1899-1911.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.018

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, 2014, 724:58-66.
DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.12.027.

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, 2014.28:593-600
DOI: 10.1007/s00540-013-1755-9

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, 2014, 28:235-241.
DOI: 10.1007/s00540-013-1716-3.

Figueredo VM, Okusa C, Kaneda K, Inamura Y, Miyamae M: Regular dipyridamole therapy produces sustained protection against cardiac ischemia-reperfusion injury: Is it time to revisit PARIS? *Int J Cardiol* 査読有 176:822-827, 2014.
DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.08.013.
Epub 2014 Aug 9

[学会発表](計7件)

Suzuki K, Okada H, Takemura G, Yamaji F, Takada C, Oda K, Hotta Y, Miyazaki N, Doi T, Yoshida T, Yoshida S, Ushikoshi H, Ogura S. Neutrophil Elastase Plays a Pivotal Role in Sepsis-induced Myocardial Dysfunction. 2017 Annual Meeting of American Heart Association, Anaheim, USA

Yamaji F, Okada H, Takemura G, Suzuki S, Takada C, Miyazaki N, Ogura S. Recombinant Thrombomodulin Attenuates Sepsis-induced Myocardial Dysfunction via Protection of Endothelial Glycocalyx Structure. 2017 Annual Meeting of American Heart Association, Anaheim, USA

Kanamori H, Naruse G, Yoshida A, Minatoguchi S, Komaki H, Baba S, Yamada Y, Mikami A, Kawasaki M, Nishigaki K,

Takemura G, Minatoguchi S. Metformin Displays Cardioprotection in -sarcoglycan Deficiency Induced Cardiomyopathy Through Autophagic Activation via AMPK-mTOR Pathway. 2017 Annual Meeting of American Heart Association, Anaheim, USA

Okada H, Suzuki K, Takemura G, Takada C, Mann D, Komatsu M, Ogura S. Highly effective treatment of endothelial disorders in sepsis by CAR peptide adjuvant for hydrocortisone therapy. American Thoracic Society 2016 International Conference, San Francisco, USA.

Okada H, Takemura G, Takahashi T, Goto K, Kanamori H, Kawamura I, Watanabe T, Morishita K, Tsujimoto A, Ushikoshi H, Kawasaki M, Mikami A, Kosai K, Minatoguchi S, Ogura S. Intravenous Administration of Endothelial Colony-Forming Cells Overexpressing Integrin $\beta 1$ Augments Angiogenesis in Ischemic Legs. 2015 Annual Meeting of American Heart Association, Orland, USA

Higashi K, Yamada Y, Kumazaki M, Aoyama T, Baba S, Minatoguchi S, Nishigaki N, Takemura G, Akao Y, Minatoguchi S. Post Infarct Treatment With Microrna145 Protects the Heart Against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through Acceleration of Myocyte Autophagy. 2014 Annual Meeting of American Heart Association, Chicago, USA

Morishita K, Takemura G, Tsujimoto A, Kanamori H, Kawamura I, Mikami A, Okada H, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Goto K, Ogino A, Morishita M, Ushikoshi H, Kawasaki M, Ogura S, Minatoguchi S. Postinfarction Cardiac Remodeling Normally Proceeds in Granulocyte Colony-Stimulating Factor Knockout Mice. 2014 Annual Meeting of American Heart Association, Chicago, USA

竹村 元三 (TAKEMURA, Genzou)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：40283311

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮前 雅見 (MIYAMAE, Masami)
大阪教育大学・保健センター・教授
研究者番号：20298821

(2) 研究分担者