

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08846

研究課題名(和文) GABA-A受容体可塑的变化を利用した麻酔調節の開発

研究課題名(英文) Study of regulatory system for anesthetic efficacy using GABA-A receptor plasticity

研究代表者

上野 伸哉 (UENO, Shinya)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：00312158

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)：麻酔薬効果制御の新たなアプローチとして、GABA-A受容体のリン酸化によるGABA応答調節機構の解明を目指す。GABA-A受容体beta3サブユニットにHA-tagを組み込み受容体細胞内分布の動態を可視化した。コントロールとなる可視化beta、alphaおよびgammaの3種類のサブユニットを安定的に発現するNeuro2A細胞株を確立した。さらにbeta3のリン酸化部位に変異導入した同細胞株も確立し、コントロール細胞株とGABA-A受容体分布、GABA応答を比較検討した。リン酸化部位変異が、GABA-受容体の分布異常をもたらしその結果GABA応答の減弱を来すことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

吸入麻酔薬や静脈麻酔薬において全身麻酔効果発現にGABA応答の増強効果が認められている。GABA応答はGABA-A受容体を介しており、本研究結果からGABA-A受容体の応答がリン酸化調節によって可逆的に制御可能であることが示唆された。既に存在するGABA-A受容体増強作用をもつ麻酔薬の効果に対して、新たな調節機構を明らかとした。また、薬物代謝障害による麻酔薬の遅延などを、薬物投与後であっても反応進展を止める、いわゆる"麻酔状態からのリバース"を薬物種に依存せず可能とし、副作用発現の予防にも有効な手段となりうる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of GABA-A receptor trafficking through subunit phosphorylation. Control and mutation-induced cell lines were established using Neuro2A strain. These cell lines stably co-express three kinds of subunits, alpha-, beta3-, and gamma. HA-tag inserted in beta3 subunit introduced the visualization of GABA-A distribution. Confocal microscopy analysis revealed that mutation of phosphorylation sites of beta3 subunit caused to disturb the trafficking of GABA-A receptors from intracellular region to plasma membrane. Consequently, GABA-induced current in cell lines with mutated beta3 subunit decreased under patch-clamp recordings. These results suggest that phosphorylation of GABA-A receptor regulate the efficacy of anesthetics with the enhancing effect on GABA.

研究分野：神経生理学

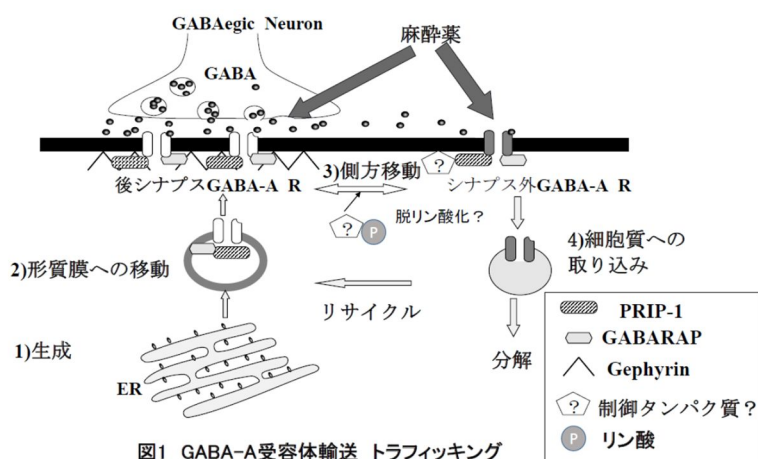
キーワード：GABA-A受容体 麻酔薬 受容体トラフィックング 受容体リン酸化変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 麻酔薬開発の歴史は、個々の病態、個体レベルでの麻酔導入、深度、覚醒をより安全により容易に制御できることを目指し開発されてきた。近年では短時間作用薬の開発や、麻酔作用の要素 鎮静・意識消失 鎮痛 有害反射の抑制 筋弛緩のそれぞれに特異的な薬物を組み合わせることで利用し、麻酔効果の調節性および安全性向上を目指している。新規麻酔薬の合成は続いている一方で、主要な麻酔作用に関わる基本的な標的は GABA-A 受容体、NMDA 受容体、ノルアドレナリン α 2受容体であり、特に吸入麻酔薬や静脈麻酔薬において全身麻酔効果発現に GABA 応答の増強作用が認められている。特に吸入麻酔薬や静脈麻酔薬において全身麻酔効果発現に GABA 応答の増強作用が指標となっている。麻酔作用発現のメカニズムが明らかとなる一方で、生体側の麻酔薬の感受性を規定するメカニズムはいまだその詳細は不明である。事実、臨床的にチアミラール 5mg/kg で就眠しない、精神科患者へ Diazepam20mg 筋注でも就眠効果がないなど、麻酔薬が非常に効きにくい状態の存在は認識されているが、そのメカニズムに迫る実験的アプローチがなかった。

(2) 申請者は、GABA-A 受容体トラフィック障害動物である Phospholipase C-Related But Catalytically Inactive Protein

欠損動物(PRIP1-KO)の表現型解析の過程で”麻酔薬作用が極端に減弱する”(GABA 応答を増強できない)状態を発見した。さらに脱リン酸化阻害によりこの麻酔効果減弱を正常動物レベルに回復させた[H23 萌芽研究、H27 基盤研究(C)、引用文献]。この結果をふまえて GABA-A 受容体のトラフィック(図1)に注目し、トラフィック障害動物をもちい、GABA-A 受容体のトラフィックを介した可塑的变化のメカニズム解明と制御への応用の可能性が示唆された。



2. 研究の目的

(1) GABA-A 受容体側の機能、感受性調節機構の解明し、麻酔効果の制御、すなわち“麻酔の効きおよび導入覚醒時間の調節法”の開発を目的とする。受容体の可塑性を利用し薬物効果調節に応用するという事は、新たなコンセプトである。既存の麻酔薬作用に対して、新たな調節機構をもたらす画期的なものである。

(2) 薬物代謝障害による薬物作用の遷延などの、薬物投与後であっても反応進展を止める、いわゆる“麻酔状態からのリバース”を薬物種に依存せず可能とし、副作用発現の予防にも有効な手段を探索する。

3. 研究の方法

(1) GABA-A 受容体 α , β , γ の3種のサブユニットの野生型および β サブユニットリン酸化部位に変異導入したプラスミドを作成する。GABA-A 受容体は $\alpha\beta\gamma$ サブユニットによるヘテロマーを形成する。神経系の培養細胞系に野生型 $\alpha\beta\gamma$ サブユニットを導入し、安定的に発現する細胞株を作製する。さらに変異 β サブユニット+ $\alpha\beta$ サブユニット導入した細胞株を作製する。

(2) 方法(1)で作製した細胞株を用い、GABA-A 受容体の細胞内分布を、コンフォーカル顕微鏡を解析する。リン酸化部位変異導入による GABA-A 受容体細胞内分への影響を GABA 投与、麻酔薬投与下において評価する。

(3) 方法(1)で作製した細胞株を用い、パッチクランプ法を用い、GABA 応答、GABA に対する濃度反応曲線、麻酔薬の増強効果等の薬理的性質を解析し、受容体リン酸化変異の影響を評価する。

(4) 受容体トラフィックに関わるタンパク質を探索する。野生型 GABA-A 受容体 β サブユニットに HA タグを挿入し(WT- β 3-HA)、このサブユニットを安定発現する培養細胞からタンパク質抽出し、細胞分画毎に HA 抗体による免疫沈降を行う。

4. 研究成果

(1) GABA-A 受容体リン酸化部位変異による受容体細胞内分布変化の可視化とメカニズム探索
 野生型 GABA-A 受容体β-subunit に HA-tag を組み込み(WT-β3-HA)、細胞内分布の可視化を可能とした(図2)。さらにαおよびγ-subunit を、神経細胞に分化能をもつ Neuro2A 細胞に導入し安定発現する培養細胞系を確立した。HA-β-subunit のリン酸化部位に変異導入したものとαおよびγ-subunit を共発現する Neuro2A 細胞系も確立した。

(2) (1)で確立した細胞株を用いて GABA-A 受容体分布を HA タグにより解析した(図2)。野生型においては、GABA-A 受容体は細胞膜上に多く存在した。一方でリン酸化部位に変異導入した S408/9A および S408/9E 細胞株において、細胞膜上の受容体減少と細胞質内にとどまっている受容体増加が認められた。

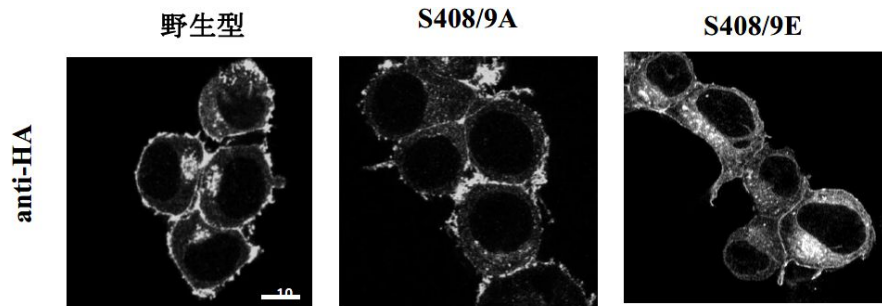


図2 HA signals of β3-HA expressing N2A stable line
 リン酸化変異導入による受容体分布異常 野生型と比較してリン酸化部位変異により膜上の受容体減少 (S408/9A)、細胞質内に留まる受容体増加(S408/9E)

(3) (1)で確立した細胞株を用いて GABA 応答をパッチクランプ法の適用下に解析した(図3)。

野生型は 100μMGABA 投与により一過性の Cl⁻内向き電流が観察され、そのピーク電流値も 1nA を超える大きなものであった。一方でリン酸化部位に変異導入した S408/9A および S408/9E 細胞株において、いずれも 100μMGABA 投与により一過性の Cl⁻内向き電流が観察されるものの、そのピーク電流値は野生型よりも小さく、不活性化過程のキネティクス変化が見られた。(2)、(3)の結果より、GABA-A 受容体βサブユニットのリン酸化部位が、受容体の細胞内分布ひいては受容体輸送に関わること、また受容体機能である GABA 応答を制御することを明らかにした(図3)。

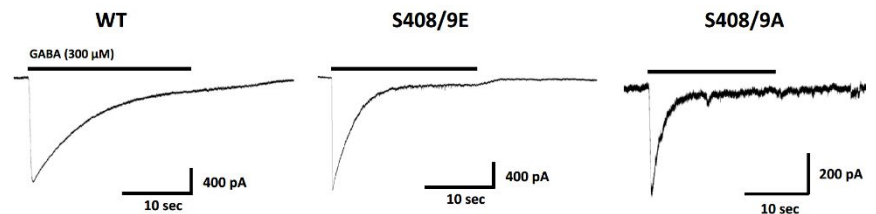


図3 GABA response of β3-HA expressing N2A stable line
 リン酸化部位変異導入によりGABA応答不活性化が増強

(4) GABA-A 受容体結合タンパク質探索がなされてきたが、Gephyrin、PRIP-1 などが知られているが、これらのタンパク質に依存しないトラフィッキングや、これらの欠損によっても麻酔効果が減弱しない麻酔薬も存在する[引用文献]。新規の制御タンパク質探索のためには、β-subunit に直接結合していないが、複合体タンパク質内の探索も行う必要がある(図4)。現在も探索をすすめている。

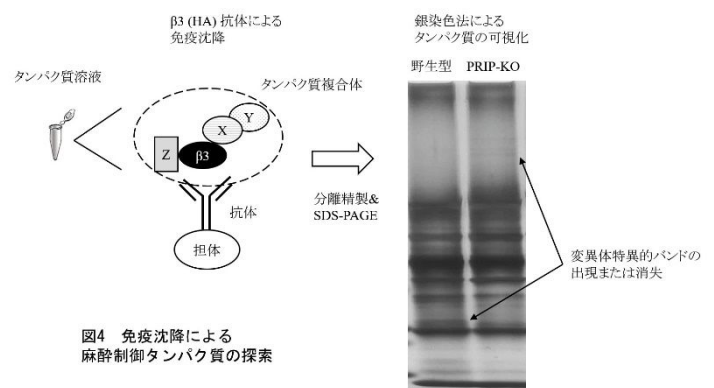


図4 免疫沈降による麻酔制御タンパク質の探索

< 引用文献 >

Propofol Anesthesia Is Reduced in Phospholipase C – Related Inactive Protein Type-1 Knockout Mice. (2017). Nikaido, Y., Furukawa, T (2 番目), Shimoyama, S., Kushikata, T(7 番目), Ueno, S*. (11 番目) (6 名省略). *J Pharmacol Exp Ther*, 361, 367–374

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ueno Toshiya, Oyama Keisuke, Hyung Youn Jae, Ueno Shinya, Oyama Yasuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Triphenyltin disrupts intracellular Zn ²⁺ homeostasis in rat thymic lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology in Vitro	6. 最初と最後の頁 104782 ~ 104782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tiv.2020.104782	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 -
1. 著者名 Shimoyama Shuji, Furukawa Tomonori, Ogata Yoshiki, Nikaido Yoshikazu, Koga Kohei, Sakamoto Yui, Ueno Shinya, Nakamura Kazuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Lipopolysaccharide induces mouse translocator protein (18 kDa) expression via the AP-1 complex in the microglial cell line, BV-2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222861	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 -
1. 著者名 Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Shimoyama Shuji, Ogata Yoshiki, Kushikata Tetsuya, Hirota Kazuyoshi, Kanematsu Takashi, Hirata Masato, Ueno Shinya	4. 巻 33
2. 論文標題 Phospholipase C-related inactive protein type-1 deficiency affects anesthetic electroencephalogram activity induced by propofol and etomidate in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 531 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-019-02663-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogata Yoshiki, Nemoto Wataru, Yamagata Ryota, Nakagawasai Osamu, Shimoyama Shuji, Furukawa Tomonori, Ueno Shinya, Tan No Koichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Anti hypersensitive effect of angiotensin (1-7) on streptozotocin induced diabetic neuropathic pain in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 739 ~ 749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejp.1341	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 -

1. 著者名 Nishijima Haruo, Miki Yasuo, Ueno Shinya, Tomiyama Masahiko	4. 巻 2018
2. 論文標題 Zonisamide Enhances Motor Effects of Levodopa, Not of Apomorphine, in a Rat Model of Parkinson's Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/8626783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Taku, Kumagai Gentaro, Liu Xizhe, Wada Kanichiro, Tanaka Toshihiro, Kudo Hitoshi, Asari Toru, Fukutoku Tatsuhiko, Sasaki Ayako, Nitobe Yohshiro, Nikaido Yoshikazu, Furukawa Ken-Ichi, Hirata Masato, Kanematsu Takashi, Ueno Shinya, Ishibashi Yasuyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Poor Motor-Function Recovery after Spinal Cord Injury in Anxiety-Model Mice with Phospholipase C-Related Catalytically Inactive Protein Type 1 Knockout	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 1379 ~ 1386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2017.5492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koga Kohei, Shimoyama Shuji, Yamada Akihiro, Furukawa Tomonori, Nikaido Yoshikazu, Furue Hidemasa, Nakamura Kazuhiko, Ueno Shinya	4. 巻 14
2. 論文標題 Chronic inflammatory pain induced GABAergic synaptic plasticity in the adult mouse anterior cingulate cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806918783478	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 T. Furukawa, Y. Nikaido, S. Shimoyama, Y. Ogata, T. Kushikata, K. Hirota, T. Kanematsu, M. Hirata, S. Ueno
2. 発表標題 PropofolおよびEtomidateの麻酔脳波におけるPRIP-1欠損の影響
3. 学会等名 弘前メディカルフォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Furukawa, Y. Nikaido, S. Shimoyama, Y. Ogata, and S. Ueno
2. 発表標題 Chronic diazepam administration impaired hippocampal CA3 LTP and spine morphology in aged mice
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Furukawa, S. Shimoyama, Y. Ogata, and S. Ueno
2. 発表標題 The effect of benzodiazepine on proliferation and survivals of CNS cells
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Nikaido, T. Furukawa, S. Shimoyama, Y. Ogata, T. Kushikata, K. Hirota, M. Hirata, T. Kanematsu, S. Ueno
2. 発表標題 Phospholipase C-related inactive protein type-1 deficiency alters propofol-induced EEG activity
3. 学会等名 第96回日本生理学会大会 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野伸哉
2. 発表標題 動物モデルにおける糖尿病性疼痛の解析
3. 学会等名 第53回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

弘前大学 大学院医学研究科 脳神経生理学講座
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~neurophysiol/>

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
研究分担者	古川 智範 (Furukawa Tomonori) (60402369)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	
研究分担者	櫛方 哲也 (Kushikata Tetsuya) (80250603)	弘前大学・医学研究科・准教授 (11101)	

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
---------	---------