

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09408

研究課題名(和文) 麻酔科領域で使用されるアトロピンの効果を改善するアトロピンエステラーゼ製剤の開発

研究課題名(英文) Development of atropine esterase formulation to improve the effect of atropine used in the anesthesiology field

研究代表者

山崎 悟 (Satoru, Yamazaki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70348796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：救急医療においてアトロピンは、麻酔からの覚醒、心筋梗塞における洞性徐脈からの回復などの目的で広く使用されている。しかしながら、ヒトにおいてはアトロピンを代謝する機構がないため、副作用を防ぐには効果的にリバースする製剤の開発が望まれる。そこでアトロピンエステラーゼを有している傍証のあるウサギより、アトロピンエステラーゼの単離を試みた。ACh誘導カリウムチャンネルの徐脈性不整脈における変異型がアトロピン感受性を示すことがわかったのは1つの成果だが、結果的には遺伝子の単離には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに未解明であったアトロピンエステラーゼの実態を明らかにできることが、本研究にまず期待されることであった。しかしながら、本申請ではアトロピンエステラーゼの単離は成功しなかった。アトロピンエステラーゼの実態が明らかになれば、救急医療におけるアトロピン拮抗剤の開発に将来的につながる可能性があるので、今後もその方向での研究が期待される

研究成果の概要(英文)：In emergency medicine, atropine is widely used for the purpose of awakening from anesthesia and recovery from sinus bradycardia in myocardial infarction. However, since there is no mechanism for metabolizing atropine in humans, it is desired to develop a drug that effectively reverses it in order to prevent side effects. Therefore, we attempted to isolate atropine esterase from rabbits with evidence of atropine esterase. It was one of the results that the mutant form of ACh-induced potassium channel in bradycardic arrhythmia was found to be atropine-sensitive, and as a result, the gene was not isolated.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：アセチルコリン受容体拮抗薬 アトロピン 迷走神経緊張 麻酔覚醒 洞性徐脈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ムスカリン性アセチルコリン受容体遮断薬アトロピンは、救急医療をはじめとする様々な臨床の現場で使用されている。麻酔覚醒時にアトロピンとネオスチグミン(コリンエステラーゼ阻害薬)は、手術中に残存する非脱分極性筋弛緩薬の作用を減弱し、患者の自発呼吸を速やかに回復させ、かつ副作用を抑えるために混合して使用される。急性心筋梗塞などの場面で過度に迷走神経が緊張することにより引き起こされた洞性徐脈に対して、迷走神経を遮断する目的でアトロピンが使用される。眼科領域では、アトロピンを点眼することにより、瞳孔散大(瞳孔拡張)を引き起こし、診断に応用されている。しかしながら、アトロピンは外因性の天然アルカロイドであり、生体内に代謝酵素は存在しない。それゆえアトロピンが上記の目的で使用された際に過剰に作用した場合、その作用をリバーすするのは困難である。

アトロピンは前述したようにアセチルコリン受容体拮抗薬であり、アセチルコリンによる受容体刺激作用を競合的に妨げる作用メカニズムを有する。このような応答はヒトをはじめ、マウス、ラット、イヌなどの哺乳類全般で保存されている。一方げっ歯類のウサギにおいては、アトロピンによる薬理効果の認められないもしくは減弱している個体が多数存在することが、古くから知られており、ウサギの血清中には、アトロピンを薬理作用のないトロパン酸とトロピンに加水分解する酵素(atropine + H₂O ⇌ tropine + tropate)、すなわちアトロピンエステラーゼ(EC 3.1.1.10)が存在することが示唆されている。現在までにエステラーゼ遺伝子座は、ウサギでは複数知られており、その中でも Est-2F の遺伝子座がアトロピンエステラーゼをコードすると考えられている。しかしながら、その分子実態は明らかになっていない。

それゆえ、ヒトには存在しないアトロピンエステラーゼの分子実態を明らかにし、その分子を用いた酵素補充療法によりアトロピンの過剰作用をリバーすすることは、救急医療の分野では非常に重要となる。申請者らは、これまでに遺伝性洞性徐脈の責任遺伝子の同定・機能解析、および自律神経における生理学的研究を行ってきており、その過程で迷走神経を介した調節系の重要性を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

前記した背景および後述する申請者らのこれまでの研究成果をもとに、本研究ではウサギのアトロピンエステラーゼ遺伝子の分子実態を明らかにし、麻酔からの覚醒、頻脈の調節などの救急医療への応用の基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的なアプローチによる KACH チャネルのアトロピン感受性についての検討

アフリカツメガエルの未受精卵を調整し、電気生理学的な解析の材料とした。実際には、ヒトの Kir3.1(野生型および変異体)、Kir3.4 などから cRNA を合成し、アセチルコリン受容体(m2R)の cRNA とともに、受精卵に導入した。チャネル電流の測定は、二電極膜電位固定法によって行い、得られら電流値の解析は、Clampfit によって行った。アトロピン、アセチルコリン(ACh)および Ba²⁺は還流液に流す形で添加し、ACh はチャネルの活性化(total 電流の測定)および

Ba²⁺は、発現しているカリウム電流を完全に抑制するために使用した。

(2) ウサギ DNA サンプルを用いた多型性の検討

ウサギのゲノム配列を検索することに Est-2F/locu 周辺のアノニマス領域に primer を作製した。ウサギ個体の血液よりゲノミック DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。PCR 反応後、PCR 産物をさらに制限酵素処理することにより、この領域に多型性があるのかどうかを検討した。

(3) ウサギ血清を用いた活性画分の検討について

NW ウサギの血清中に硫酸アトロピンを混和し、37℃ で酵素反応を行った。続いて、溶液中で産生された副産物の色素の吸収波長を測定することにより、アトロピンエステラーゼ活性を測定した。続いて、この活性を指標に血清中の抽出タンパク質を HPLC により分離・精製した後、10%SDS、200V、40 min で電気泳動を行い、ゲルを直接 CBB (クーマシーブリリアントブルー) 染色することにより、タンパクを可視化した。

4. 研究成果

(1) アトロピン感受性電流成分の検出

これまでに家族性洞性徐脈家系からポジショナルクローニング法により、責任遺伝子 KCNJ3 (Kir3.1) に変異を同定し、病態と遺伝子変異の因果関係を明らかにすることができた。このチャンネルをさらに解析するために、野生型、変異型それぞれをアフリカツメガエルの未受精卵に発現させ、電流を測定した。まず、basal の状態では、野生型の電流値は低く抑えられているのに対して、すでにチャンネルが開口し、大きい電流が流れていた。続いて、アセチルコリンを注入することによりチャンネルを活性化すると、野生型ではチャンネルが活性化するのに対して、変異型では、電流の増加は、2 倍程度であった。そして、アセチルコリンの反応を拮抗させるためにアトロピンを作用させたが、野生型では、basal の状態に近い電流値を示した。ところが、変異型では、アセチルコリンにより誘導された電流以上の電流下降が観察されるけっかとなった (図 1)。この現象を定量化するために、n=12 の電流値を測定し plot すると、グラフで示されるように、再現性よく変異型では、アトロピンを作用させたことによる電流値の減少、すなわちアトロピン感受性成分の存在が予想された (図 2)。

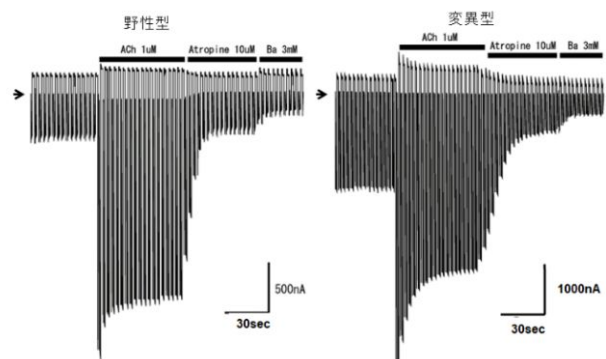


図1. Kir3.1チャンネルをアフリカツメガエルに発現・提示させた状態におけるアトロピン感受性の検討(典型的な電流値のトレース)

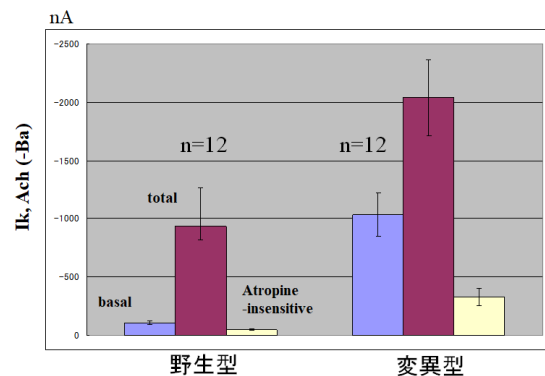


図2. Kir3.1チャンネルをアフリカツメガエルに発現・提示させた状態におけるアトロピン感受性の検討(定量データの解析)

(2) Est-2F の遺伝子座周辺のマーカーの予備的検討

Est-2F の遺伝子座の連鎖解析を行う目的で、これまでの知見から予想される遺伝子座周辺に primer を作製し、多型性の検出を試みた。その結果図に示すように、多型性を示すマーカーであった(図3)。現時点では、ウサギの個体数確保がうまくいかなかったので、組換えポイントの検出は今後の課題であるが、予備的には検討できたといえる。

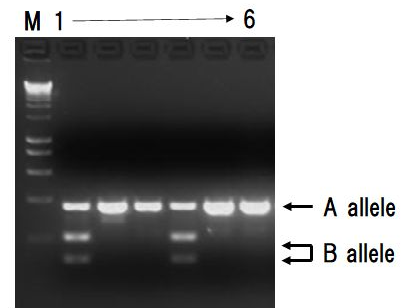


図3. ウサギDNAを用いたマーカーの多型性の確認

(3) ウサギ血清分画からの初期的な検討

最初の段階では、ウサギの血清からアトロピンエステラーゼの活性を検出した後に、どのように精製していけるかも予想がつかなかったので、ウサギの血清から活性が検出される分画を HPLC でゲルろ過、疎水カラムなどを通して、分画を試みた(図4)。その結果、flow throw には不純物のタンパクがかなり出現し、多少 wash 分画にも溶出されてきたが、elution には、活性がまだ残存するタンパク分画は存在した。

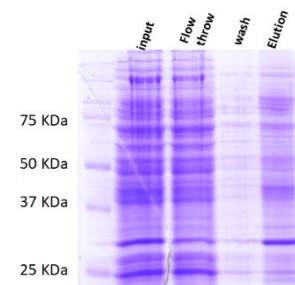


図4. ウサギ血清の活性陽性分画の電気泳動

ウサギよりアトロピンエステラーゼ遺伝子を単離するために、生化学、遺伝・ゲノム科学などの様々な知識が必要とされる。遺伝・ゲノム解析をする上でもっとも問題になりそうなのはウサギのようなゲノムデータベースが充実していない生物で変異を探索する点にあり、この点については、NW ウサギなどのホールゲノムの解析も今後必要になってくるかもしれない。また、アトロピンエステラーゼの活性検出については、やはり今回入手が困難であった野生型(アトロピンエステラーゼの活性が弱いと予想される)の血清の入手も視野に入れること、何らかの形でタンパクをさらに分画したら、ショットガン MSなどで、とりあえず候補となる酵素タンパクのペプチド断片のアミノ酸配列を取得するなどのアプローチも有効であったかもしれないと、考える。

アトロピンエステラーゼの分子の単離そのものについては、今後の課題であるが、少なくとも、徐脈不整脈に関連するようなカリウムチャンネルにおいては、アトロピンにはアセチルコリンに対する拮抗作用以外の副次効果が存在し、過剰なアトロピンは生体内で予期せぬ副作用を引き起こす可能性が示唆された。それゆえ、ヒトの生体内においてアトロピンの効果を調節することは、救急医療においてやはり重要となるので、継続的な探索が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yashirogi Shohei, Nagao Takemasa, Nishida Yuya, Takahashi Yusuke, Qaqorh Tasneem, Yazawa Issei, Katayama Toru, Kioka Hidetaka, Matsui Tsubasa S, Saito Shigeyoshi, Masumura Yuki, Tsukamoto Osamu, Kato Hisakazu, Ueda Hiromichi, Yamaguchi Osamu, Yashiro Kenta, Yamazaki Satoru, Takashima Seiji, Shintani Yasunori	4. 巻 22
2. 論文標題 AMPK regulates cell shape of cardiomyocytes by modulating turnover of microtubules through CLIP170	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e50949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202050949	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 Min Kyung-Duk, Asakura Masanori, Shirai Manabu, Yamazaki Satoru, Ito Shin, Fu Hai Ying, Asanuma Hiroshi, Asano Yoshihiro, Minamino Tetsuo, Takashima Seiji, Kitakaze Masafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 ASB2 is a novel E3 ligase of SMAD9 required for cardiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02390-0	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 Inoue Hiroyuki, Nakamura Satoki, Higo Shuichiro, Shiba Mikio, Kohama Yasuaki, Kondo Takumi, Kameda Satoshi, Tabata Tomoka, Okuno Shota, Ikeda Yoshihiko, Li Junjun, Liu Li, Yamazaki Satoru, Takeda Maki, Ito Emiko, Takashima Seiji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki, Hikoso Shungo, Sakata Yasushi	4. 巻 17
2. 論文標題 Modeling reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPS cell-derived cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 337 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.12.016	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 Nagao Takemasa, Shintani Yasunori, Hayashi Takaharu, Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Nishida Yuya, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Yashirogi Shohei, Yazawa Issei, Asano Yoshihiro, Shinzawa Itoh Kyoko, Imamura Hiromi, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu, Goto Yu ichi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 Higd1a improves respiratory function in the models of mitochondrial disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1859 ~ 1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201800389R	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 Kioka Hidetaka, Kato Hisakazu, Fujita Takeshi, Asano Yoshihiro, Shintani Yasunori, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Imamura Hiromi, Kogo Mikihiro, Kitakaze Masafumi, Sakata Yasushi, Takashima Seiji	4. 巻 34
2. 論文標題 In vivo real time ATP imaging in zebrafish hearts reveals G0s2 induces ischemic tolerance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2041 ~ 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901686R	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 Shimizu Akio, Zankov Dimitar P., Sato Akira, Komeno Masahiro, Toyoda Futoshi, Yamazaki Satoru, Makita Toshinori, Noda Taichi, Ikawa Masahito, Asano Yoshihiro, Miyashita Yohei, Takashima Seiji, Morita Hiroshi, Ishikawa Taisuke, Makita Naomasa, Hitosugi Masahito, Matsuura Hiroshi, Ohno Seiko, Horie Minoru, Ogita Hisakazu	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of transmembrane protein 168 mutation in familial Brugada syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 6399 ~ 6417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201902991R	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 Okazaki Atsuko, Yamazaki Satoru, Inoue Ituro, Ott Jurg	4. 巻 140
2. 論文標題 Population genetics: past, present, and future	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 231 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02208-5	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 該当する

1. 著者名 Yashirogi Shohei, Nagao Takemasa, Nishida Yuya, Takahashi Yusuke, Qaqorh Tasneem, Yazawa Issei, Katayama Toru, Kioka Hidetaka, Matsui Tsubasa S, Saito Shigeyoshi, Masumura Yuki, Tsukamoto Osamu, Kato Hisakazu, Ueda Hiromichi, Yamaguchi Osamu, Yashiro Kenta, Yamazaki Satoru, Takashima Seiji, Shintani Yasunori	4. 巻 22
2. 論文標題 AMPK regulates cell shape of cardiomyocytes by modulating turnover of microtubules through CLIP 170	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e50949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202050949	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 Kamikubo Kenta, Kato Hisakazu, Kioka Hidetaka, Yamazaki Satoru, Tsukamoto Osamu, Nishida Yuya, Asano Yoshihiro, Imamura Hiromi, Kawahara Hiroyuki, Shintani Yasunori, Takashima Seiji	4. 巻 294
2. 論文標題 A molecular triage process mediated by RING finger protein 126 and BCL2-associated athanogene 6 regulates degradation of G0/G1 switch gene 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14562 ~ 14573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008544	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 Nakajima Yuri, Ito Shin, Asakura Masanori, Min Kyung-Duk, Fu Hai Ying, Imazu Miki, Hitsumoto Tatsuro, Takahama Hiroko, Shindo Kazuhiro, Fukuda Hiroki, Yamazaki Satoru, Asanuma Hiroshi, Kitakaze Masafumi	4. 巻 129
2. 論文標題 A dipeptidyl peptidase-IV inhibitor improves diastolic dysfunction in Dahl salt-sensitive rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 257 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2019.03.009	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 Hodatsu Akihiko, Fujino Noboru, Uyama Yuki, Tsukamoto Osamu, Imai Okazaki Atsuko, Yamazaki Satoru, Seguchi Osamu, Konno Tetsuo, Hayashi Kenshi, Kawashiri Masa aki, Asano Yoshihiro, Kitakaze Masafumi, Takashima Seiji, Yamagishi Masakazu	4. 巻 6
2. 論文標題 Impact of cardiac myosin light chain kinase gene mutation on development of dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 406 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.12410	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 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中村 聡希, 肥後 修一朗, 志波 幹夫, 小濱 康明, 近藤 匠巳, 亀田 聡士, 田端 智香, 井上 裕之, 山崎 悟, 武田 真季, 高島 成二, 宮川 繁, 澤 芳樹, 彦惣 俊吾, 坂田 泰史
2. 発表標題 不整脈源性右室心筋症 (ARVC) を迅速に再現するヒトモデル細胞の樹立
3. 学会等名 日本心筋症研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoru Yamazaki, Shuji Shimizu, Masafumi Kitakaze, Toshiaki Shishido, Masaru Sugimachi
2. 発表標題 Cardiac-specific MicroRNAs Increase after Myocardial Reperfusion in the Ischemic Region
3. 学会等名 国際心臓研究会 (ISHR) 日本部会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuro Hitsumoto, Satoru Yamazaki, Hiroki Fukuda, Ui Fu, Hiroshi Asanuma, Shin ito, Masafumi Kitakaze
2. 発表標題 Hypoxia Upregulates Cartilage Intermediate Layer Protein 1 (CILP-1) and Contributes to the Suppression of TGF- Signaling in Cardiac Fibroblasts
3. 学会等名 国際心臓研究会 (ISHR) 日本部会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Kadowaki, Satoru Yamazaki, Yasuhiro Kotani, Tatsunori Tsuji, Naoya Sakoda, Yasuyuki Kobayashi, Naohiro Horio, Takuya Goto, Genya Muraoka, Susumu Ozawa, Takanori Suezawa, Yosuke Kuroko, Atsushi Tateishi, Shuji Shimizu, Shingo Kasahara
2. 発表標題 The c-fos mRNA expression reveals persistent myocardial stretch in the right ventricle during asphyxiated cardiac arrest
3. 学会等名 ESC Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	北風 政史 (Masafumi Kitakaze) (20294069)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・客員研究員 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	塚本 蔵 (Tsukamoto Osamu) (80589151)	大阪大学・生命機能研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	中谷 明弘 (Nakaya Akihiro) (60301149)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任教授 (12601)	

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