

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591811

研究課題名（和文） 光によって覚醒する麻酔モデルの作成

研究課題名（英文） Anesthesia model provoking emergence by laser beam irradiation

研究代表者

溝部 俊樹 (MIZOBE TOSHIKI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50239266

研究成果の概要（和文）：

緑色蛍光蛋白(Green fluorescent protein:GFP)付加 α 2A アドレナリン受容体をノックイン発現した遺伝子改変マウスの機能解析を行い、これらのマウスにおいて GFP 付加 α 2A アドレナリン受容体が脳内、特に青斑核に発現し、その機能や分布は、野生型と同様であった。

研究成果の概要（英文）：

This project is to make transgenic mouse with alpha2A adrenergic receptor (alpha2A AR) fused with green fluorescent protein (GFP), derived from jellyfish, Aequorea Victoria. We are successfully able to make transgenic mouse with alpha2A AR fused with GFP. This fusion protein has the same function and expression as the wild type has. This transgenic mouse will be a great molecular tool to analyze the development, distribution, and function of alpha2A adrenoceptor subtype.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：外科

科研ひの分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：アドレナリン受容体、GFP、遺伝子改変マウス、デクスメドミジン、CALI

1. 研究開始当初の背景

(1) α 2 アドレナリン作動薬であるデクスメドミジンは ICU 領域における新しい鎮痛鎮静薬であり、現在本邦 ICU においても人工呼吸患者の鎮静などに広く使用されている。この薬剤は、Stanford 大学の Maze 教授（現 UCSF 大学）や Kobilka 教授らが開発臨

床応用を行った。Maze らは、特に青斑核の α 2 アドレナリン受容体が α 2 作動薬の鎮痛鎮静に関わっていること (Anesthesiology, 1996 Apr;84(4):873-81)、さらにデクスメドミジンが鎮静作用を発現するためには、青斑核において 77%以上の α 2 アドレナリン受容体が必要であること、また鎮痛作用発現のためには 44%以上の α 2 アドレナリン受容体

が必要であることを報告した (Anesthesiology 1995;82:954-62)。

(2) 申請者は、1994年から2年間 Stanford 大学に留学し、Maze 教授や Kobilka 教授の下でアドレナリン受容体の作用構造 相関などの研究に携わった。申請者はすでに ヒト $\alpha 2A$, $2B$, $2C$ アドレナリン受容体 cDNA を用いて GFP との fusion protein を作製し 培養細胞 (HEK293 cell) に transfection し、 デクスメトミジンによる desensitization を観察し (基盤研究 C:2001-2)、この系にお いて Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) の実験も行い、レー ザー光による GFP の不活化を in vitro で成 功している。さらに、科学研究費 (基盤研究 B 2003-2006 年) において、緑色蛍光蛋白 (Green fluorescent protein:GFP) 付加 $\alpha 2A$ アドレナ リン受容体をノックイン発現した遺伝子改 変マウスの作成を試みた。その結果、2007 年 によろやく homo 体を得ることができ、現在 遺伝子改変マウスの GFP 付加 $\alpha 2A$ アドレナ リン受容体の機能解析を残すのみとなっている。

(3) 一方、green fluorescent protein (GFP) をレーザー光で励起することで、その 癒合タンパクを特異的に阻害しタンパク機 能を不活性化する方法がある (chromophore - assisted laser inactivation : CALI)。 本学病理学グループが多光子レーザーを用 いて in vitro での GFP 癒合蛋白の不活性化 に成功した (Multiphoton excitation-evoked CALI using GRF. Nature Methods 2005;2:503-5)。申請者はこの研究グループ の1員を研究分担者として、レーザー光を用 いた受容体蛋白の不活性化を in vivo で行お うと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、緑色蛍光蛋白 (Green Fluorescent Protein :GFP) を癒合した $\alpha 2A$ アドレナリン受容体を発現した遺伝子改変 マウスに、 $\alpha 2$ agonist である静脈麻酔薬デ クスメトミジンによる麻酔をかけ、その作 用点である青斑核にレーザー照射すること で、GFP 及び GFP と癒合している $\alpha 2A$ アドレ ナリン受容体を不活性化し、光によって麻酔 作用を拮抗し麻酔から覚醒させるモデルの 作成を目的とする。

光によって麻酔作用を拮抗するという研 究は世界でも類を見ないほど独創的である。 この結果は麻酔分野だけでなく、光によって 薬剤の効果を switch on-off する新しい薬理 概念への一歩となる。レーザー光により麻酔 より覚醒するマウスの姿を映像にて一般の 人に公開することで麻酔の未来像を示し、麻 酔科への認識が新たになると考える。

3. 研究の方法

(1) 緑色蛍光蛋白 (Green fluorescent protein:GFP) 付加 $\alpha 2A$ アドレナリン受 容体をノックイン発現した遺伝子改変 マウスの機能解析

まず、免疫組織学的手法により、GFP) 付加 $\alpha 2A$ アドレナリン受容体の脳内、特に青斑核 での発現を蛍光顕微鏡にて視覚的に確認す る。

次いで、その受容体機能を、radio-labeled receptor binding assay にて確認する。す なわち遺伝子改変マウスの脳を取り出し、 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.4) に入れ、polytron にてホモゲナイズ し、10000 g にて遠心分離し、pellet を

Tris-HCl buffer (75 mM Tris HCl, 12.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.4) にて洗浄した後、再び 10000 g にて遠心分離し、その pellet を KAC binding buffer (50 mM potassium acetate, pH 7.4) にて保存する (Molecular Pharmacology 56:154-61, 1999)。蛋白定量は、BCA 法で行う。 α 2A アドレナリン受容体 saturation isotherm は、radio-ligand として、3H-RX81002 (0.5 - 40 nM) を、non-specific ligand としては、10 microM rauwolsine を用いる。Binding mixture は室温にて 90 分間、incubate し、cell harvester を使ってその反応を止め、scintillation counter により、radiation count を行う。Kd 及び Bmax 値は、Prism; GraphPAD を用いて curve fitting を行い、saturation curve から計算する。

(2) 青斑核へレーザー光を導くためのガイドカニューラの取り付け

青斑核は、Bregma より A = -5.34 mm, L = 0.75 mm, V = 2.2 mm である。

マウスをペントバルビタール麻酔下に、マウス用脳定位固定装置を用いて、頭部にガイドカニューラ (脳内埋め込み用カニューラ) を立てる。

カニューラ先端の位置確認は、カニューラから青斑核へ dexmedetomidine 0.04 microg/g 投与し、loss of righting reflex によって行う。また各実験グループ毎に 1 匹のマウスは、脳切片を作成し、組織化学的手法を用いて、カニューラ先端が青斑核にあることを視覚的にも確認する予定である。

(3) レーザー光を脳内植え込みガイドカニューラへ導くための工夫

すなわち、イオンレーザー (メレスグリオ社) 及び光ファイバー伝送システムにシングルモードファイバー入射システムを連結し、これに直接光ファイバー線維 (NA 0.37: ソーラボジャパン) を接続する。この先端を削ってシングルファイバーとしてマウス頭蓋のガイドカニューラに挿入するための工夫が必要と考えられる。

(4) レーザー光の照射条件の基礎的検討

遺伝子改変マウスの脳を摘出し、青斑核を含む組織切片を作り、これにレーザーを照射する。組織構築に傷害を与えることなく、GFP を退色させるアルゴンレーザー (488 nm) 照射の至適条件、すなわちレーザー強度と照射時間を求める。

研究分担者らは、Nature Methods 2005;2:503-5 において、HeLa 細胞に発現させた GFP 癒合ギャップ結合蛋白 (コネキシン 43) を 2 光子励起レーザーを用い、平均レーザー強度 7.5-15.7 mW、照射時間 380 ms という条件で特異的に不活性化させた。また、平均レーザー強度 6.1 mW 以下では不活性化できず、逆に照射時間を長くすると非特異的な細胞障害も認めている。これら in vitro のデータを基に至適条件を決定することになる。

(5) レーザー光の種類についての基礎的検討

1 光子励起と 2 光子励起によるレーザー照射による α 2A アドレナリン受容体サブタイプの不活性化の相違を観察する。2 光子励起の方が分解能に優れているが、本研究の場合、ある程度の大きさを持った青斑核或いは脳全体を焦点とするため 1 光子励起の方が

適している可能性もあり検討が必要である。そこで上記と同様に、青斑核を含む脳組織切片にレーザーを照射し GFP の退色を観察する。

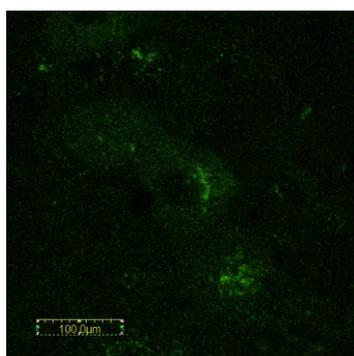
(5) レーザー光による麻酔からの覚醒

マウスにデクスメトミジン麻酔をかけ、アルゴンレーザーを青斑核に照射し、麻酔から覚醒するか否かを検討する。定量法として、righting reflex および tail flick test を用いる。レーザー照射後に脳スライスを作成し組織学的に GFP の退色や組織破壊についても検討する。レーザー照射後の覚醒状態のマウスの観察も行い、可逆性について組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 緑色蛍光蛋白 (Green fluorescent protein:GFP) 付加 α 2A アドレナリン受容体をノックイン発現した遺伝子改変マウスの機能解析

免疫組織学によって、GFP 付加 α 2A アドレナリン受容体が、青斑核に発現していることを認めた。



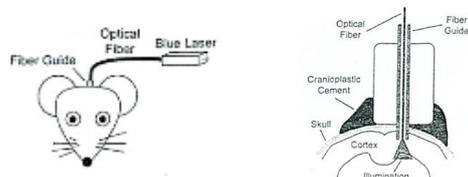
付加 α 2A アドレナリン受容体が、Wild type と同様に機能していることを認めた。

	Wild type	Transgenic
Kd	1.33	0.81
Bmax	509	417

Kd : nM, Bmax : fmol/mg protein

(2) 青斑核へレーザー光を導くためのガイドカニューラの取り付け

下記の通り、J Neural Eng 4:S143-56, 2007 の方法に従って、脳内埋め込みカニューラの取り付けを行い、dexmedetomidine 投与により、その先端が、青斑核にあることを確認した。



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)

[学会発表] (計 1 件)

Mizobe T, Hosokawa K, Shibasaki M, Ueno H, Nakajima Y: Making a transgenic mouse with α 2A adrenergic receptor fused with green fluorescent protein. The 13th Asia - Australasian Congress of Anesthesiologists. Fukuoka, June 4th, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝部 俊樹 (MIZOBE TOSHIKI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50239266

(2) 研究分担者

田中 秀央 (TANAKA HIDEO)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60236619