

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2009

課題番号：20689036

研究課題名（和文）GABA(A)受容体を介した気管支痙攣抑制機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation for the GABA(A) receptor-mediated inhibitory effect on bronchospasm

研究代表者

水田 健太郎（MIZUTA KENTARO）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40455796

研究成果の概要（和文）：

気管平滑筋収縮時の平滑筋細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度（[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>）の初期上昇反応は、GABA<sub>A</sub>受容体作動薬により抑制された。この抑制反応は（1）細胞外Ca<sup>2+</sup>の除去、（2）電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルの遮断で生じなくなるのに対し、（3）筋小胞体のCa<sup>2+</sup>を枯渇させた場合は、影響を受けずに存続した。またGABAの投与は気管平滑筋細胞膜を過分極させた。

以上より、気管平滑筋上のGABA<sub>A</sub>受容体は、細胞膜を過分極させ電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルの開放を抑制する結果、細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入を抑制し気管平滑筋収縮を抑制させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The transient intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) increase in the human airway smooth muscle cells (HASM) during the contraction of the airway smooth muscle was attenuated by GABA<sub>A</sub> receptor agonist. Following (1) withdrawal of extracellular Ca<sup>2+</sup>, or (2) blockade the voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel blocker, GABA<sub>A</sub> receptor agonist did not attenuate the transient [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases in HASM. In contrast, (3) following depletion of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum, GABA<sub>A</sub> receptor agonist retained its ability to attenuate the transient [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase. GABA also induced the membrane hyperpolarization on HASM.

These results suggest that the activation of the GABA<sub>A</sub> receptors on airway smooth muscle cells attenuated extracellular Ca<sup>2+</sup> influx through the membrane hyperpolarization and facilitates airway smooth muscle relaxation.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 9,100,000  | 2,730,000 | 11,830,000 |
| 2009年度 | 2,000,000  | 600,000   | 2,600,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 11,100,000 | 3,330,000 | 14,430,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：気管支痙攣、GABA(A)受容体、全身麻酔薬、カルシウムイオン

## 1. 研究開始当初の背景

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は代表的な抑制性神経伝達物質である。GABA受容体にはイオンチャンネル型受容体 (GABA<sub>A</sub>及びGABA<sub>C</sub>受容体) 及びG蛋白共役型受容体 (GABA<sub>B</sub>受容体) があり、このうち前者はリガンドゲート型チャンネルとして細胞内へのCl<sup>-</sup>流入により細胞膜の過分極をもたらす。これまでに、GABA<sub>A</sub>受容体が気管平滑筋上に存在すること、またGABA<sub>A</sub>受容体作動薬投与により、気管収縮物質 (bradykinin, histamine, substance P等) が誘発する気管平滑筋収縮が抑制されることが明らかにされているが、その細胞内シグナリング機構は明らかになっていない。気管収縮物質の投与による気管平滑筋収縮は、気管平滑筋細胞 (HASM) の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の上昇により生じるが、その機序は (1) Ca<sup>2+</sup>チャンネルからの細胞外Ca<sup>2+</sup>の流入 (電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストア作動性Ca<sup>2+</sup>チャンネル、非特異的イオンチャンネルを介して)、(2) 細胞内Ca<sup>2+</sup>ストア (筋小胞体) からのCa<sup>2+</sup>放出、の2つの経路からなる。本研究では、GABA<sub>A</sub>受容体がHASMの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇機構のいずれかのプロセスを抑制することで気管平滑筋収縮を抑制すると仮定し、その機序解明を行った。

また、全身麻酔時の気管支痙攣発作は重篤な致死合併症の一つであり、気管挿管などの気道の機械的刺激などにより反射性に生じる。気管支痙攣の一因である気管支収縮反射は、気管受容体-求心性迷走神経-延髄弧束核-疑核-遠心性迷走神経を介して気管平滑筋を収縮させる。このうち弧束核、疑核におけるGABA<sub>A</sub>受容体の存在が報告されている。本研究では、各種全身麻酔薬 (吸入麻酔薬、プロポフォールなど) が反射中枢 (弧束核・疑核) に存在するGABA<sub>A</sub>受容体の刺激を介して気管支平滑筋収縮反射を抑制すると仮定し、研究を行った。

## 2. 研究の目的

### (1) 気管平滑筋細胞におけるCa<sup>2+</sup>シグナリング機構に関する研究

HASM上のGABA<sub>A</sub>受容体を介した気管平滑筋収縮抑制機構における細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナリング機構の解明。

### (2) 気管支収縮反射中枢に関する研究

延髄反射中枢 (弧束核・疑核) におけるGABA<sub>A</sub>受容体を介した気管支収縮反射抑制機構の解明。

## 3. 研究の方法

### (1) 気管平滑筋細胞におけるCa<sup>2+</sup>シグナリング機構に関する研究

#### ① GABA<sub>A</sub>受容体作動薬がHASMの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇作用に与える作用の検討

BradykininによるHASMの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇がGABA<sub>A</sub>受容体作動薬 (GABA, muscimol, THIP) により抑制を受けるか、またその抑制作用がGABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬 (bicuculline) により解除されるかを検討した。

#### ② muscimolによるHASMの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇抑制機構における細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度による影響の検討

細胞外Ca<sup>2+</sup>を0にした後にmuscimolを投与し、bradykininがもたらす気管平滑筋細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇反応に対するmuscimolによる抑制作用が、細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度の影響を受けるかを検討した。

#### ③ muscimolによるHASMの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇抑制機構における電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルの関与の検討

電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネル遮断薬 (verapamil) を前投与した後にmuscimolを投与し、bradykininがもたらす気管平滑筋細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇反応に対するmuscimolによる抑制作用が、verapamilにより影響を受けるかを検討した。

#### ④ muscimolによるHASMの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇抑制機構における筋小胞体の関与の検討

細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアである筋小胞体のCa<sup>2+</sup>をCPAにより枯渇させた場合に、muscimolによるtransient phase抑制反応が筋小胞体のCa<sup>2+</sup>枯渇の影響を受けるかを検討した。

#### ⑤ muscimolによるHASMの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇抑制機構におけるイノシトール3リン酸 (IP<sub>3</sub>) の関与の検討

IP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアである筋小胞体上のIP<sub>3</sub>受容体に作用してCa<sup>2+</sup>を細胞内に放出させる。GABA<sub>A</sub>受容体作動薬投与がIP<sub>3</sub>を生させるかについて、<sup>3</sup>H-myoinositolを用いてカラムクロマトグラフィーで測定した。

⑥ muscimol投与時のHASMの細胞膜電位の測定  
パッチクランプ法により、GABAを投与時の膜電位の変化を測定した。また膜電位感受性色素 (DiBAC<sub>4(3)</sub>) をHASMにLoadingし、GABAを投与時の膜電位の変化を蛍光プレートリ

ーダーで測定した。

#### (2) 気管支収縮反射中枢に関する研究

気管支収縮反射誘発下に GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬、拮抗薬を延髄弧束核・疑核に微量注入し、気管支収縮反射が GABA<sub>A</sub> 受容体による制御を受けるかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 気管平滑筋細胞における Ca<sup>2+</sup>シグナリング機構に関する研究

bradykinin がもたらす気管平滑筋の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は初期上昇期 (transient phase)、持続上昇期 (sustained phase) の 2 相性の反応を示すが、このうち①transient phase における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬 (GABA, muscimol hydrobromide, THIP) により用量依存性に抑制された。またこの抑制は GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬 (Bicuculline methiodide) により解除された。一方、sustained phase は GABA 及び GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬により抑制されなかった。

この GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬による transient phase の抑制反応は、②細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度を 0 にした場合、③電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネル遮断薬 (verapamil) で前処置を行った場合には見られなくなった。これに対し④筋小胞体の Ca<sup>2+</sup>を枯渇させた場合には、GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬による transient phase 抑制反応はその影響を受けずに存続した。

すなわち GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬による transient phase 抑制反応は細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアには作用を与えずに、細胞外 Ca<sup>2+</sup>の流入機構のみを抑制する結果生じるものであることが示唆された。

また⑤IP<sub>3</sub> 生合成量は GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬投与の影響を受けなかった。すなわち [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇に対する GABA<sub>A</sub> 受容体を介した抑制は、IP<sub>3</sub> 生合成の低下によって生じるものではないことが示唆された。

⑥パッチクランプ法及び膜電位感受性色素 (DiBAC<sub>4(3)}</sub>) を用いた研究により、GABA の投与は気管平滑筋細胞膜の過分極をもたらすことが明らかとなった。

以上より、気管平滑筋上の GABA<sub>A</sub> 受容体は、細胞膜を過分極させることで、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの開放を抑制する結果、細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入を抑制させ気管平滑筋収縮を抑制させることが示唆された。本研究成果は気管平滑筋収縮に対する新たなアプローチを提示するものである。

##### (2) 気管支収縮反射中枢に関する研究

延髄反射中枢 (弧束核・疑核) における GABA<sub>A</sub> 受容体を介した気管支収縮反射抑制機構の解明は、動物実験モデル (モルモット) の構築の段階で難渋しており、その機序解明には

未だ至っていない。

#### 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 3 件) (全て査読有り)

① Mizuta K, Xu D, Pan Y, Comas G, Sontt JR, Zhang Y, Panettieri RA Jr, Yang J, Emala CW Sr. GABA<sub>A</sub> receptors are expressed and facilitate relaxation in airway smooth muscle *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 294, L1206-1216, 2008.

② Mizuta K, Osawa Y, Mizuta F, Xu D, Emala CW. Functional expression of GABA<sub>B</sub> receptors in airway epithelium *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 296-304, 2008.

③ Gallos G, Gleason NR, Virag L, Zhang Y, Mizuta K, Wittington RA, Emala CW. Endogenous gamma-aminobutyric acid modulates tonic guinea pig airway tone and propofol-induced airway smooth muscle relaxation. *Anesthesiology*, 110(4), 748-758, 2009.

[学会発表] (計 17 件)

① 水田 健太郎, 高橋 雅彦, Dingbang Xu, Yi Zhang, Charles W Emala  
気管平滑筋における GABA<sub>A</sub> 受容体の存在とその機能的役割  
日本麻酔科学会第 55 回学術集会  
2008 年 6 月 12 日 横浜市

② 水田 健太郎, 青井 あつ子, 栗原 淳, 猪狩 俊郎  
プロポフォールにより誘発された神経調節性失神の 1 例  
第 23 回日本歯科麻酔学会東北地方会  
2008 年 6 月 28 日 仙台市

③ 水田 健太郎  
気管平滑筋における GABA(A) 受容体の発現とその気管収縮抑制作用  
第 50 回歯科基礎医学会学術大会  
平成 20 年 9 月 23 日 東京都

④ 水田 健太郎  
気管平滑筋における GABA<sub>A</sub> 受容体の存在と機能的役割  
第 36 回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成 20 年 10 月 9 日 大阪市

⑤ 水田 健太郎, 水田 文子  
気管平滑筋における neurokinin 受容体の発現とその細胞内シグナリング機構  
第 36 回日本歯科麻酔学会学術集会

平成20年10月9日 大阪市

⑥ 城戸 幹太, 青井 あつ子, 安田 真, 水田 健太郎, 猪狩俊郎  
プロポフォールによる横紋筋融解症が疑われた Down 症候群患者の一例  
第36回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成20年10月10日 大阪市

⑦ 栗原 淳, 水田 健太郎, 立花 陽子, 猪狩俊郎, 川上 壮, 青井 あつ子, 城戸 幹太, 正木 英二  
重度肝機能障害を伴った患者に対して行った静脈内鎮静法  
第24回日本歯科麻酔学会東北地方会  
平成21年8月1日 郡山市

⑧ 水田 健太郎, 猪狩 俊郎, 正木 英二  
全身麻酔管理後に代理ミュンヒハウゼン症候群が疑われた一例  
第24回日本歯科麻酔学会東北地方会  
平成21年8月1日 郡山市

⑨ 川上 壮, 正木 英二, 立花 陽子, 栗原 淳, 青井 あつ子, 安田 真, 水田 健太郎, 城戸 幹太, 猪狩 俊郎  
術中換気不全に陥った無気肺の一症例  
第24回日本歯科麻酔学会東北地方会  
平成21年8月1日 郡山市

⑩ 水田 健太郎, 水田 文子, 杉山 陽子, Charles W. Emala  
気管平滑筋の GABA(B) 受容体は IP3 合成を促進する (優秀演題)  
第56回日本麻酔科学会  
平成21年8月16日 神戸市

⑪ 川上 壮, 和泉 博之, 水田 健太郎  
口腔領域における体性-副交感神経反射性血管拡張反応の反射中枢における GABA(A) 受容体の役割  
第51回歯科基礎医学会  
平成21年9月10日 新潟市

⑫ 水田 健太郎  
気管平滑筋における Dopamine D2 受容体の発現と気管収縮抑制機構  
第51回歯科基礎医学会  
平成21年9月10日 新潟市

⑬ 水田 健太郎, Charles W. Emala, 正木 英二  
GABA(A) 受容体を介した気管平滑筋収縮抑制機構における細胞内 Ca シグナリング  
日本麻酔科学会東北地方会  
平成21年9月12日 福島市

⑭ 水田 健太郎, 水田 文子, 正木 英二  
気管上皮における GABA<sub>B</sub> 受容体の発現とその機能的役割  
第37回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成21年10月10日 名古屋市

⑮ 水田 健太郎, 水田 文子, 正木 英二  
気管平滑筋の GABA<sub>B</sub> 受容体は IP3 合成を促進する  
第37回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成21年10月10日 名古屋市

⑯ Kentaro Mizuta, Dingbang Xu, Yi Zhang, Charles W. Emala  
Dopamine D<sub>2</sub> receptor is expressed and sensitizes adenylyl cyclase activity in airway smooth muscle  
American Society of Anesthesiologists 2009 Annual meeting  
平成21年10月17日 ニューオリンズ市

⑰ 高橋 温, 後藤 申江, 安藤 瞳, 伊藤 あゆみ, 水田 健太郎, 城戸 幹太, 猪狩 俊郎, 正木 英二, 猪狩 和子, 佐々木 啓一  
当治療部における全身麻酔下歯科治療状況の推移  
第26回日本障害者歯科学会学術大会  
平成21年11月1日 名古屋市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水田 健太郎 (MIZUTA KENTARO)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 40455796