

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791700

研究課題名(和文)人工呼吸管理中の肺保護におけるGABA受容体の役割

研究課題名(英文)Effects of GABA receptors on lung protection in patients with mechanical ventilation

研究代表者

杉山 陽子(SUGIYAMA, Yoko)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70444255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト気道上皮細胞株において、タバコ煙抽出液(CSE)曝露後に産生される気道ムチン(MUC5AC)は麻酔薬プロポフォルにより有意に増加した。プロポフォル刺激でp44/42MAPキナーゼのリン酸化がみられ、MEK抑制薬でプロポフォルの作用がブロックされたため、p44/42MAP活性化の関与が示唆された。これらの現象はGABA A抑制薬でブロックされず、GABA A受容体を介さない作用と考えられた。また、麻酔薬セボフルランによるMUC5AC産生量の変化はみられなかった。

人工呼吸中の麻酔薬・鎮静薬による気道粘液産生の修飾は喫煙や慢性呼吸器炎症を有する患者の予後に影響を与える可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Propofol but not sevoflurane enhanced cigarette smoke extract (CSE)-induced MUC5AC production in human airway epithelial cells. Propofol increased p44/42 MAP kinase phosphorylation and PD 98059 abolished the enhancement of MUC5AC production induced by propofol. GABA A antagonists failed to block the effect of propofol.

These results suggest that propofol enhanced MUC5AC production induced by CSE in p44/42 MAP kinase dependent and GABA A receptor independent manner. Propofol may have the potential to amplify overproduction of airway mucus in smokers. Some anesthetics may affect respiratory condition in smokers or patients with chronic pulmonary diseases during mechanical ventilation.

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：気道上皮 ムチン 麻酔薬 GABA受容体 喫煙 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質として知られる  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) に対する受容体は現在 GABAA, B, C 受容体の三種が同定されており、主に中枢神経系に存在しているが、神経系以外の末梢組織にも発現していることが注目されている。近年 GABAA 受容体が気道上皮に発現し、粘液の産生に関与すると報告された。それに対し、本研究者はヒトおよび guinea pig の気道上皮と気管平滑筋において GABAB 受容体が存在することを発見し、さらに、GABAB 受容体刺激によって細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) が活性化することや、GABAB 受容体を介した抑制性 G 蛋白の活性化により細胞内サイクリック AMP 産生抑制がおこることも報告した。これらの研究結果は呼吸器系の GABA 受容体がさまざまな細胞活動に関わっている可能性を示唆している。さらに本研究者は気道上皮細胞において麻酔薬 (プロポフォール) が GABAA 受容体を介して炎症性サイトカイン産生を修飾しているというデータを得、気道免疫機構に GABA 受容体があるのかの役割を果たしている可能性を示した (日本麻酔科学会第 57 回日本学術集会 2010 にて発表)。また肺水腫クリアランスに Cl チャネルの関与が知られており、Cl チャネル結合型の GABAA 受容体も何らかの作用をもつ可能性がある。しかし、気道上皮、肺胞上皮における GABA 受容体の生理学的、病理学的役割についていまだ十分解明されていない。

## 2. 研究の目的

気道上皮細胞はサイトカインを産生するとともに気道粘液産生により外部からの細菌、ウイルス、微小物質等の侵入を防ぐ重要な役割を果たすとされる。それに対して喘息や慢性閉塞性肺疾患患者の気道では気道粘液の過剰産生がおこり、正常なバリア機構が

妨げられ、末梢気道閉塞、低酸素症の原因となる。

本研究では培養気道上皮を用いて麻酔中、人工呼吸中の気道上皮機能における GABA 受容体の役割と GABA 受容体に作用するといわれている麻酔薬、鎮静薬の気道上皮機能への影響を明らかにすることを目的とする。また、喫煙による気道上皮の粘液産生過剰に麻酔薬や GABA 作動薬がどう影響するかを検討し、その細胞内メカニズムを探る。

## 3. 研究の方法

培養ヒト気道上皮細胞のモデルとして、ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株である、NCI-H292 細胞を継代培養して用いた。NCI-H292 細胞を 10% 仔牛血清および、抗生剤含有 RPMI-1640 液体培地で培養し、コンフルエント状態になった時点で血清を除いた培地で 24 時間インキュベーションした。その後、タバコ煙抽出液を加えて培養した。タバコ液刺激から 8 時間後に GABAA 受容体を介して作用するといわれている麻酔薬のプロポフォール、セボフルランを様々な濃度で培養液に加え、さらに 16 時間培養した後、抗 MUC5AC モノクローナル抗体を用いて培養液中に分泌されたムチン (MUC5AC) を、slot blot 法で測定した。Slot blot で得られたバンドの濃さをデンシトメトリーで数値化し、定量した。さらに、各薬剤の作用が GABA 受容体を介したものを検討するため、GABA 受容体拮抗薬を前処置して MUC5AC の産生量の変化を検討した。

次に、各薬剤の MUC5AC 産生に対する修飾作用の機序を解明するため、タバコ煙抽出液を加えて 8 時間後に麻酔薬で刺激し、1 - 60 分後の全細胞溶解液を用いて、その細胞内シグナル経路として代表的な p42/44 mitogen-activated protein kinase 活性化 (リン酸化) への影響を、ウェスタンブロット法を用いて測定した。

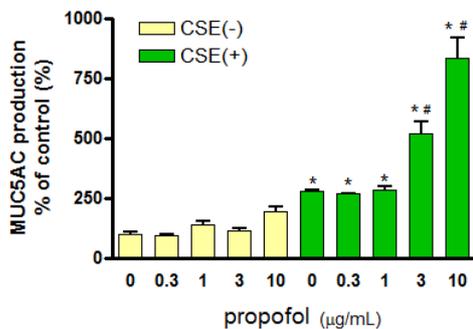
統計処理は分散分析 (with Bonferroni

test)をおこない、 $p < 0.05$ を有意とした。

各処置による細胞の生存率への影響を検討するため、トリパブルー染色法をおこない、200細胞中の死細胞を計測した。

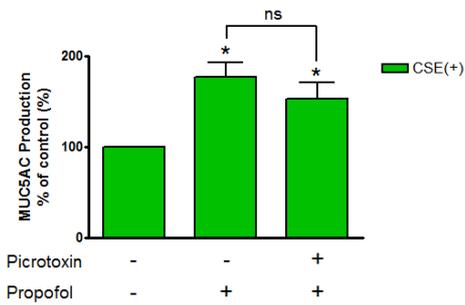
#### 4. 研究成果

煙草煙抽出液 (CSE) は濃度依存性に培養液中の MUC5AC を増加させた。高濃度の CSE 曝露では細胞生存率が低下したため 20% CSE 溶液をもちいることとした (タバコ (マルボロ®) 1 本分をおよそ 5 分で 30 mL の RPMI-1640 培養液にバブリングして得た溶液を 100% CSE とした)。CSE 曝露なしではプロポフォルは MUC5AC 産生に影響しなかったが、CSE 曝露下のプロポフォル刺激では、MUC5AC の産生は有意に増加 (3mcg/mL:  $5.2 \pm 0.5$  倍、10mcg/mL:  $8.4 \pm 0.8$  倍) した。



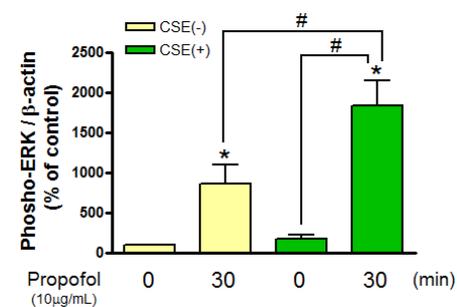
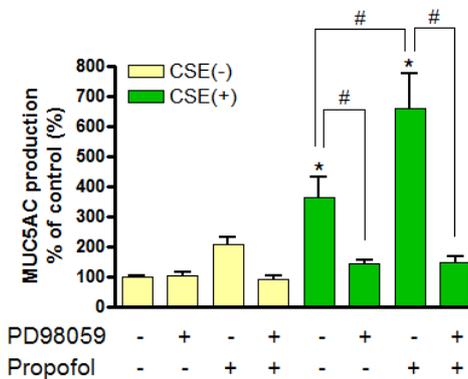
(\* $p < 0.05$  vs. control, # $p < 0.05$  vs. CSE(20%) alone,  $n = 8$  and each experiment was performed in duplicates.)

GABAA 受容体拮抗薬であるピクロトキシン (10mcM) やギャバジン (100mcM) の前処置はプロポフォル (10mcg/mL) の MUC5AC 産生増強作用に対して有意な抑制作用がみられなかったため、プロポフォルの作用は GABAA 受容体を介さないものと推察された。



(\* $p < 0.05$  vs. control)

次に細胞内シグナルについて検討した。CSE 曝露後のプロポフォル刺激により p44/42MAP キナーゼのリン酸化がみられた。また、p44/42MAP キナーゼの上流にあたる MEK 抑制薬 (PD98059: 50mcM) の前処置でプロポフォルの MUC5AC 産生増加作用がブロックされた。



(\* $p < 0.05$  vs. control, # $p < 0.05$ ,  $n = 4$ )

セボフルラン 1%、2%、3%を 1L/分の空気流量で 30 分間バブリングした培養液を用いて CSE 曝露時の MUC5AC 産生への影響も測定したが有意な変化は見られなかった。

喫煙の影響下においてプロポフォルは気道粘液の産生を増加させる可能性が示唆さ

れた。その作用機序としてp44/42MAPキナーゼの活性化が関与していると示唆された。

MUC5ACは外界刺激からのバリア機構として重要な役割を担っているものの、喘息・COPDなど慢性炎症下では産生過剰となり気道閉塞や低酸素症を引き起こすとされている。麻酔薬のMUC5AC産生に対する修飾作用の機序を解明することは、喘息やCOPDなど呼吸器疾患を有する患者や喫煙者の麻酔・人工呼吸管理において呼吸器合併症などの予後改善に寄与できる可能性がある。

#### 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 1 件)

Iwata K, Tanabe K, Sugiyama Y, Tanaka M, Takenaka M, Iida H  
Anesthetic management for a patient with very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency.  
J Anesth. 査読有. 26, 957-958, 2012

〔学会発表〕(計 1 件)

Yoko Sugiyama, Kumiko Tanabe, Hiroki Iida  
Propofol modulates mucin production in H292 airway epithelial cells after exposure to cigarette smoke extract.  
American Society of Anesthesiologists  
2013 Annual Meeting (San Francisco)  
October 12, 2013

〔図書〕(計 1 件)

杉山陽子、飯田宏樹、川真田樹人編  
脊髄くも膜下硬膜外併用麻酔と脊髄くも膜下鎮痛単独：麻酔科医のための周術期疼痛管理  
225-233, 中山書店(東京), 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 陽子 (SUGIYAMA, Yoko)  
岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70444255

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：