

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791576

研究課題名(和文) 心筋IKsチャンネルに対する吸入麻酔薬と交感神経刺激の相互作用

研究課題名(英文) Mutual effects between volatile anesthetics and sympathetic stimulation on cardiac IKs channels

研究代表者

三國 生臣(MIKUNI, Ikuomi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10623895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はこれまでパッチクランプ法を行っていなかった新しい実験室にて進めていたためデータ記録が困難であった。各種実験装置の場所移動やアース付電源タップの使用などによりデータへのノイズ混入は大幅に改善され、良好なパッチクランプデータ記録環境を確立することが出来た。また、実験備品メーカーとの話し合いによりcDNAを受託増幅してくれることとなり、現在cDNAの納入を待っている状況である。

研究成果の概要(英文)：We tried to start patch clamping in a new laboratory where no one did patch clamping, therefore, it was difficult to record IKs channel activity precisely due to electric noises. However, we established a good recording condition with replacement of experiment devices and appropriate selection of supply cables. Additionally, we ordered cDNAs for expression of IKs channel on culture cells.

研究分野：心筋IKsチャンネル(パッチクランプ法)

キーワード：実験記録環境の確立

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔用の吸入麻酔薬には催不整脈作用があり、その原因は心筋に存在するカリウムチャンネルの一種である IKs に対する抑制作用であると考えられている。一方、交感神経刺激は IKs を活性化することが知られており、手術による疼痛等で交感神経が刺激された場合には IKs も活性化すると考えられる。しかし吸入麻酔薬の IKs 抑制作用と交感神経刺激による IKs 活性化作用の相互作用に関しては不明な点が多く、これまでの報告も限られている。

2. 研究の目的

近年、社会の高齢化に伴い手術件数が増加しているが、周術期には不整脈等の有害事象がしばしば発生し心室細動などの不整脈は時に致死的である。今回の研究ではパッチクランプ法を用い IKs に対する吸入麻酔薬と交感神経刺激の相互作用について検討する予定である。

3. 研究の方法

培養細胞である HEK-293 cell に Wild-type IKs 又は A341V-type IKs の DNA を導入し正常型 IKs、変異型 IKs を発現させる。チャンネル発現後、細胞をトリプシン処理で剥離・分散し、パッチクランプ法 Whole-cell mode で IKs 電流を記録する。その後、記録チャンパー内の標準細胞外溶液をセボフルランを含む細胞外溶液に置き換え、IKs に対する吸入麻酔薬の抑制作用を確認する。さらに記録チャンパー内をセボフルランとイソプロテレノールの両方を含む細胞外溶液に置き換え、IKs 電流の変化を記録する。この実験は吸入麻酔薬による全身麻酔中に交感神経刺激が加わった際の状況に相当する。また、交感神経が活性化した状態の患者に吸入麻酔薬を使用した状況を再現するため、前述の手順とは逆に最初にイソプロテレノールによる IKs 電流の増幅を確認した後で、セボフルランの IKs 抑制作用を検証するというプロトコールも用いる。

(1) HEK-293 cell の培養

細胞培養用フラスコを用い、抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン)とウシ胎児血清を含む DMEM 液中で

HEK-293 cell を培養する。継代作業(新しいフラスコへ細胞を移植する作業)はトリプシンを用いて1週間に2度の頻度で行う。継代作業数が増え過ぎることによる細胞性質の変化を防ぐため、100回の継代作業数を目安として新たな HEK-293 cell に交換し、常に安定した記録環境を維持する。

(2) HEK-293 cell への DNA 導入

培養細胞への核酸導入剤であるリポフェクトアミンを用いて HEK-293 cell に IKs の DNA を導入する。DNA 導入時には IKs をコードする KCNQ1 と KCNE1 の DNA に加え、核酸導入された細胞を判別するための緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescent Protein; GFP) の DNA も同時に導入する。KCNQ1 に関しては正常型 KCNQ1 (Wild-type KCNQ1)、または先天性 QT 延長症候群の中でも重篤な臨床症状を引き起こすことで知られる変異型 KCNQ1 ; A341V-type KCNQ1 (Brink PA et al. *Circulation* 2005;112:2602-10.) を用いる。A341V-type KCNQ1 の DNA は現有の Wild-type KCNQ1 から Site-directed Mutagenesis 法を用いて作製する。

3) パッチクランプ法

ガラス電極の作製

パッチクランプ用ガラス電極作製には現有の水平牽引型電極作製器 (P-97; Sutter 社製) を用いる。ガラス電極先端にはヒートポリッシュを施し、細胞外溶液中でのガラス電極抵抗が 4~5M となるよう調整する。

IKs 電流測定

IKs 電流測定はパッチクランプ用増幅器 (Axopatch 200B; Axon Instruments 社製) アナログ-デジタルコンバーター (Digidata 1321A; Axon Instruments 社製) 電流観察・記録ソフトウェア (pClamp10; Molecular Devices 社製) を用い Whole-cell mode

で行う。記録チャンパー内は交感神経刺激による IKs 活性化作用を引き出すため 37 に維持する。膜電位プロトコルに関しては保持電位を -50mV とし、-60mV から +60mV まで 20mV 刻みで 4 秒間の膜電位変化を与える (Figure 1. 挿入図参照)。記録した IKs 電流の解析には pClamp10 及び Origin7 (OriginLab 社製) を用いる。具体的手順は以下の通り。

倒立顕微鏡 (Eclipse TE2000-U; Nikon 社製) の記録チャンパーに剥離・分散された核酸導入後の HEK-293 cell を含む溶液を入れ、GFP により緑色に標識された細胞にガラス電極を接触させる。ギガオームシールを形成した後、ガラス電極を介して細胞膜に陰圧をかけ細胞膜に孔をあけ IKs 電流の記録を開始する。

プロトコル : 標準細胞外溶液中で IKs 電流を記録した後 (コントロール電流)、記録チャンパー内を 1.0 MAC に相当するセボフルラン (0.54 mM) を含む細胞外溶液に置き換え IKs 電流を記録する (Figure 1. 参照)。その後記録チャンパー内をセボフルランとイソプロテレノール (10 μ M) の両方を含む細胞外溶液に置き換え IKs 電流を記録する。セボフルランによって抑制された IKs 電流はイソプロテレノールによって増幅するのか、増幅するのであればコントロール電流の大きさと比較してどの程度の大きさの電流となるのかを検討する。

プロトコル : 標準細胞外溶液中で IKs 電流を記録した後 (コントロール電流)、記録チャンパー内を 10 μ M のイソプロテレノールを含む細胞外溶液で置き換え IKs 電流を記録する (Figure 2. 参照)。その後記録チャンパー内をセボフルラン (0.54 mM) とイソプロテレノールの両方を含む細胞外溶液に置き換え IKs 電流を記録する。イソプロテレノールによって増幅した IKs 電流がセボフルランによって抑制されるのか、抑制されるのであればコントロール電流の大きさと比較してどの程度の大きさの電流となるのかを検討する。

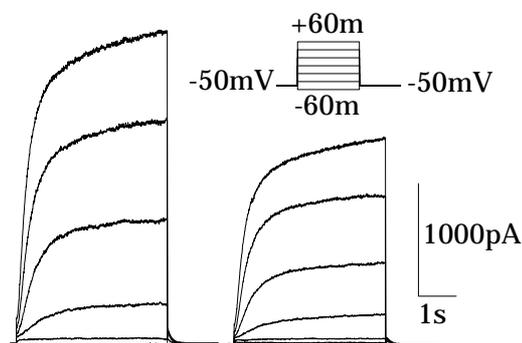


Figure 1. 吸入麻酔薬による IKs 電流の抑制

左パネルのコントロール電流と比較し、セボフルラン投与後の IKs 電流は抑制されている (右パネル)。挿入図は 4 秒間の膜電位変化プロトコルを示す。

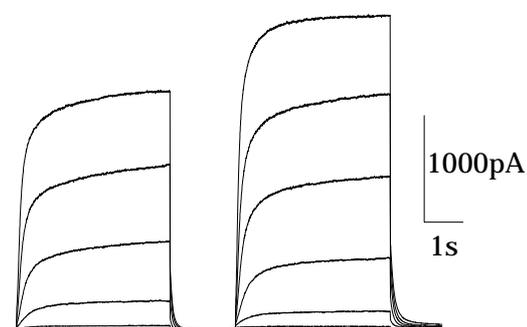


Figure 2. 交感神経刺激による IKs 電流の活性化

左パネルのコントロール電流と比較し、イソプロテレノール投与後の IKs 電流は増幅している (右パネル)。

4. 研究成果

本研究はこれまでパッチクランプ法を行っていなかった新しい実験室で進めていたためデータ記録が困難であった。各種実験装置の場所移動やアース付電源タップの使用などによりデータへのノイズ混入は大幅に改善され、良好なパッチクランプデータ記録環境を確立することが出来た。また、実験備品メーカーとの話し合いにより cDNA を受託増幅してくれることとなり、現在 cDNA の納入を待っている状況である。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三國 生臣 (MIKUNI, Ikuomi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10623895