

機関番号：32645

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591817

研究課題名 (和文) 吸入麻酔ターゲット因子の新規定量解析による麻酔作用機序の考究

研究課題名 (英文)

The study of a new target for the effects of volatile anesthetics by immunoblotting.

研究代表者

関根 秀介 (SEKINE SYUSUKE)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：10384976

研究成果の概要 (和文)：

目的：麻酔薬による脳内 PKC- γ に対する作用を検証した。方法：吸入麻酔薬、静脈麻酔薬での麻酔導入時間を比較した。マウスの脳内 PKC- γ およびリン酸化 PKC- γ (pPKC- γ) の分布を免疫ブロット法にて比較した。結果：吸入麻酔薬ではノックアウトマウスにて導入時間が延長し、ワイルドマウスにおける PKC γ 及び pPKC γ 分布を変化を認めた。静脈麻酔薬では変化を認めなかった。結語：PKC γ は吸入麻酔薬の作用発現に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Aims: We examined the effects of different types of anesthetics on PKC- γ knockout mice. And we investigated the dynamics of the kinase in brain cells obtained from mice anesthetized with volatile and i.v anesthetics.**Method and Results:** We measured the required times for loss of righting reflex (rtfLORR) after administration of isoflurane, sevoflurane, or propofol on PKC- γ knockout mice and compared the times with those of wild-type mice. Volatile anesthetics (isoflurane and sevoflurane) significantly prolonged the rtfLORRs in PKC- γ knockout mice compared to those in wild-type mice. On the other hand, no significant difference was observed between knockout and wild-type mice treated with propofol. We also used immunoblotting to investigate the intracellular distribution of PKC- γ and phosphorylated PKC- γ (p-PKC- γ) in brain cell fractions obtained from wild-type mice during the LORR induced by these anesthetics. PKC- γ was significantly decreased in the synaptic membrane fraction (P2), whereas p-PKC- γ was significantly increased in P2. There was no significant change in the supernatant fraction (S).In propofol-treated mice, PKC- γ and p-PKC- γ showed no significant changes in P2 or S.**Conclusion:** Our results provide new evidence to support the possibility of the involvement of PKC- γ in the actions of volatile anesthetics.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

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：

イソフルラン、セボフルラン、プロポフォール、PKC- γ 、リン酸化 PKC- γ

1. 研究開始当初の背景

(1)プロテインキナーゼ C(PKC)は、哺乳類の脳をはじめ全身の臓器に存在するカルシウムとリン脂質依存性のセリン・スレオニンプロテインキナーゼで、神経興奮性、神経伝達物質の放出、シナプス形成、遺伝子発現、細胞分化、アポトーシスなど細胞内情報伝達に重要な役割を持つことが知られている。また、多くの報告により、PKCは吸入麻酔薬の作用発現をもたらすターゲットプロテインであることが示唆されている。本研究は、分子生物学的手法を用い、吸入麻酔薬によってPKCの脳細胞内分布が変化することを明らかにし、さらにその活性化を測定することにより、PKCと麻酔作用の関係を考究することを目的とする。

(2)吸入麻酔薬は全身麻酔の主役として広く使用されているが、その作用機序は未だ明らかではない。Hemmingsらは、吸入麻酔薬の麻酔作用のターゲットはPKCであると考え、ハロタンがPKCの活性を増加させることを報告した。一方Slaterらは、麻酔作用のターゲットを同じくPKCであると考え、ハロタンがPKC活性を抑制することを報告した。麻酔によってPKC活性が増加するか、抑制されるかは、未だに一定の見解は得られていない。その原因は、HemmingsやSlaterらの研究がin vitroのものであり、試薬や実験条件がPKCの活性に影響したものと考えられる。

(3)一般的に、虚血侵襲などでPKCは細胞質から細胞膜へトランスロケーションする。またその場合にPKCは活性化しているものとされる。しかし、Cardellらがin vivoで行っ

た報告によれば、前脳虚血時に細胞膜にトランスロケーションしたPKCは活性が抑制されたとしている。吸入麻酔薬だけでなく、脳虚血においても、PKC活性の測定では相反する結果の報告があり、一定の見解は得られていない。

(4)我々は、ラット、マウスを用いた局所脳虚血モデルを作成し、これまで一貫してin vivoでのPKCの変動を研究してきた。脳虚血により、PKCは神経細胞の細胞質からシナプス部位を含む細胞膜へトランスロケーションし、その程度は脳虚血の侵襲度とパラレルであることを報告している。また、吸入麻酔薬のイソフルレンが脳虚血時のPKCのトランスロケーションを抑制することを報告している。

2. 研究の目的

吸入麻酔薬とPKC活性の関係を以下の点から考察すること。

(1)吸入麻酔により、神経細胞のPKCが細胞質から細胞膜へトランスロケーションするか

(2)リン酸化PKCは、吸入麻酔薬によってどのような変化をするか

3. 研究の方法

(1)正向反射消失までの時間(rtflORR)をPKC- γ ノックアウトマウスとwild-typeのマウスにおいて、イソフルラン、セボフルラン、プロポフォールを投与し、測定した。

(2)ウェスタンブロット法を用いて吸入麻酔薬および静脈麻酔薬を投与され正向反射が消失したwild-typeのマウスの脳細胞内の

PKC- γ およびリン酸化 PKC- γ (p-PKC- γ) の細胞内の分布を調べた。

4. 研究成果

(1) 吸入麻酔薬群ではノックアウトマウスにおいて **rtfLORR** が **wild-type** に比べて約 2 倍に延長した。プロポフォール投与群ではノックアウトマウス、**wild-type** 間で明らかな差は認めなかった。

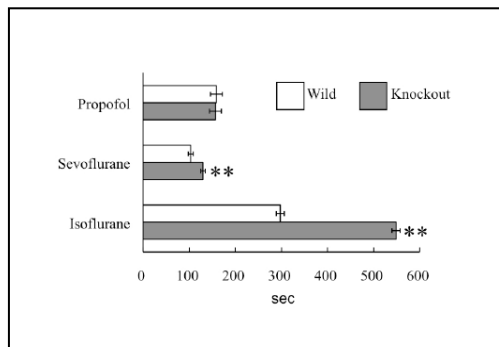


図 1 各種麻酔薬と正向反射消失時間の関係

(2) 吸入麻酔薬を投与されたマウスの脳細胞内の膜分画(P2)において PKC- γ は減少し p-PKC- γ は増加を認めた。細胞質分画(S)では有意な変化を認めなかった。一方、プロポフォールを投与されたマウスでは P2、S 分画ともに有意な変化は認められなかった。

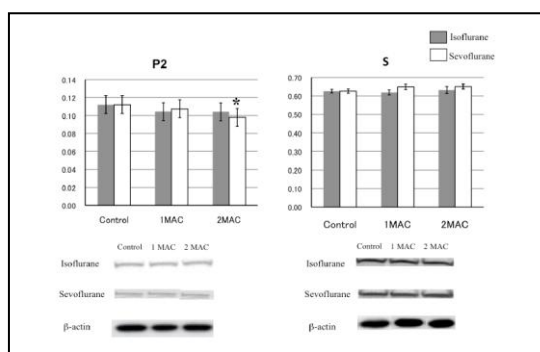


図 2 吸入麻酔薬と PKC- γ の関係

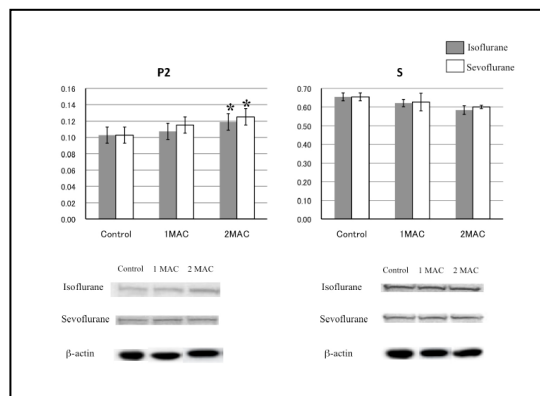


図 3 吸入麻酔薬と p-PKC- γ の関係

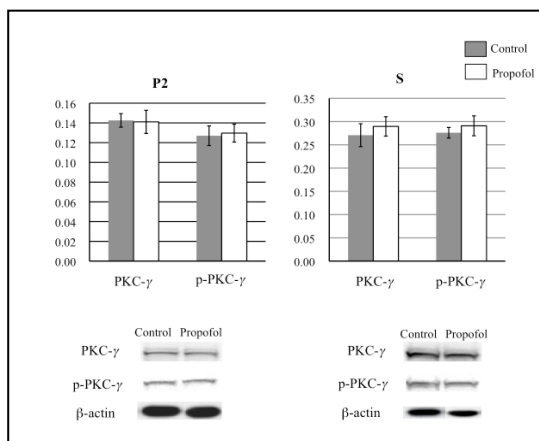


図 4 プロポフォールと PKC- γ 、p-PKC- γ の関係

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 2 件)

(1) Akiko Takeda, Ryoichi Miyashita, Takeo Nagura, Shusuke Sekine, Michihiro Murozono, Shohei Matsumoto, Hiroyuki Uchino.

Effects of different types of anesthetic agents on cellular PKC γ dynamics in mouse brain

Pharmacology、査読あり、87 巻、2011 年、P180-186

(2) Shohei Matsumoto, Michihiro Murozono, Daisuke Nagaoka, Shuhei Matsuoka, Akiko Takeda, Hideyuki Narita, Seigo Watanabe, Atsushi Isshiki, Yasuo Watanabe

Isoflurane inhibits protein kinase C gamma and calcium/calmodulin dependent protein kinase II- α translocation to synaptic membrane in ischemic mice brains.

Neurochemical Res, 査読あり、33 卷、
2008 年、P2302-9

〔学会発表〕（計 2 件）

(1) 宮下亮一 プロテインキナーゼ C γ ノックアウトマウスを用いた吸入麻酔薬作用機序の検討

日本麻酔科学会 第56回学術集会 2009. 08.
16、神戸

(2) 武田明子 吸入麻酔薬によるプロテインキナーゼ C γ の脳細胞内再分布

日本麻酔科学会 第55回学術集会2008. 06.
14、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 秀介 (SEKINE SYUSUKE)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：10384976

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

室園美智博 (MUROZONO MITIHIRO)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：70276947