

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15571

研究課題名(和文) Wnt/ カテニン経路に対する麻酔薬とオピオイドの作用に関する研究

研究課題名(英文) Effects of anesthetics and opioids on the Wnt/bsta catenin pathway

研究代表者

福田 和彦 (FUKUDA, Kazuhiko)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90199224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体前葉細胞における脱分極によるプロオピオメラノコルチン(POMC)産生に対する静脈麻酔薬の作用を解析した。静脈麻酔薬プロポフォル、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムは、L型Caチャネルを抑制してCa流入を低下させるとともに、Protein kinase AのサイクリックAMP感受性を低下させてPOMC産生を抑制することが示唆された。アストロサイトにおける低酸素によるエリスロポイエチン誘導に対するミダゾラムの作用について検討した。ミダゾラムが低酸素誘導因子(HIF)-1 α の核内移行を抑制することにより低酸素によるエリスロポイエチン発現誘導を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the effects of intravenous anesthetics on the depolarization-induced proopiomelanocortin expression, mediated by the activation of voltage-dependent Ca²⁺ channel and Ca²⁺ influx, in anterior pituitary cells. It was suggested that intravenous anesthetics, including propofol, thiopental, midazolam and diazepam, suppressed the depolarization-induced proopiomelanocortin expression, possibly by suppression of the voltage-dependent Ca²⁺ channel and by reduction of the affinity to cyclic AMP of protein kinase A. It is known that hypoxia-inducible factor (HIF) is involved in the hypoxia-induced erythropoietin expression in astrocytes. We analyzed the effect of midazolam on the hypoxia-induced erythropoietin expression in astrocytes. It was suggested that midazolam suppressed the hypoxia-induced erythropoietin expression in astrocytes by inhibition of translocation of HIF-1 α into the nucleus.

研究分野：麻酔科学

キーワード： 静脈麻酔薬 下垂体前葉 プロオピオメラノコルチン アストロサイト エリスロポイエチン 低酸素誘導因子 Wnt/ カテニン経路

1. 研究開始当初の背景

Wnt 蛋白は中枢神経系の発達における様々な段階で重要な役割を果たしている。Wnt 蛋白が活性化する情報伝達系には、Wnt/ カテニン経路と カテニン非依存性経路 (Wnt/Ca²⁺経路、平面細胞極性経路) があるが、Wnt/ カテニン経路の解明が最も進んでいる。これまでに Wnt/ カテニン経路は、細胞の遺伝子発現の調節、細胞増殖や分化に影響を及ぼし、神経系の発生および様々な中枢神経系の病態、すなわち脳虚血、精神疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかんなどに関与することが報告されている。

神経障害性疼痛の成立においてマイクログリアにおいて Wnt/ カテニン経路が活性化すること、Wnt/ カテニン経路の抑制によって神経障害性疼痛の成立が抑制されることが報告された (Zhang Y-K et al., J Clin Invest, 123, 2268-2286, 2014; Itokazu T et al., Neurosci Res, 79, 34-40, 2014)。しかし、神経障害性疼痛の治療に使用される薬物の Wnt/ カテニン経路に対する影響は不明である。一方、幼少期における全身麻酔薬投与の副作用として注目されている神経毒性には、神経発生過程に対する薬物の影響が関与する可能性があると考えられているが、詳細な機序は不明である。神経発生に重要な役割を果たす Wnt/ カテニン経路が全身麻酔薬の神経毒性および各種細胞に対する作用に関与する可能性については、ほとんど注目されていない。

2. 研究の目的

本研究は、麻酔薬およびオピオイド等の周術期使用薬物が Wnt/ カテニン経路の情報伝達機構に及ぼす影響を明らかにして、これ

らの薬物の作用における Wnt/ カテニン経路の役割を主に細胞レベルで明らかにすることを目標とした。

下垂体前葉細胞におけるプロオピオメラノコルチン産生に対する静脈麻酔薬の作用と Wnt/ カテニン経路の役割

まず、下垂体前葉細胞におけるプロオピオメラノコルチン産生に対する静脈麻酔薬の作用を明らかにすることを目的とする研究を行った。下垂体前葉細胞におけるプロオピオメラノコルチン産生は、コルチコトロピン放出因子 (CRF) による CRF 受容体活性化とサイクリック AMP 産生増加を介する機序と細胞膜脱分極による電位依存性 Ca²⁺チャネル活性化と Ca²⁺流入を介する機序に大別されるが、今回の研究では、後者の機序に対する静脈麻酔薬の作用を解明し、Wnt/ カテニン経路の関与について明らかにすることを主な目的とした。

中枢神経系における低酸素によるエリスロポイエチン発現誘導に対するミダゾラムの作用と Wnt/ カテニン経路の関与

エリスロポイエチンは低酸素に対して発現が誘導される成長因子であるが、その発現誘導に対して麻酔薬がどのような影響を及ぼすかは知られていない。申請者は、吸入麻酔薬イソフルランが濃度依存性にエリスロポイエチン発現誘導を抑制することを明らかにした。今回の研究では、静脈麻酔薬ミダゾラムの影響を検討し、エリスロポイエチン発現誘導における Wnt/ カテニン経路の関与について明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

下垂体前葉細胞におけるプロオピオメラ

ノルコチン産生に対する静脈麻酔薬の作用と Wnt/ カテニン経路の役割

下垂体前葉細胞 AtT-20 は、副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotropic hormone, ACTH)や エンドルフィンの前駆体蛋白プロオピオメラノコルチンを産生する。AtT-20 に POMC プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを導入した細胞 AtT-20PL では、ルシフェラーゼ活性を測定することにより POMC 産生を簡単に評価することが可能である。そこで、AtT-20PL 細胞を用いて、麻酔薬あるいはオピオイドが POMC 発現に及ぼす効果を検討した。

6 穴プラスチックプレートに AtT-20PL 細胞を植え付けて 10%ウシ胎児血清含有培地を用いて 37 °C、5%炭酸ガス存在下で培養し、培養面積の 70%程度まで増殖した時点で 1%ウシ胎児血清含有培地に交換して、さらに 3 日間培養して実験に用いた。培地に静脈麻酔薬(プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパム、ケタミン、デクスメトミジン) 各種阻害薬を添加した後、塩化カリウムを投与して細胞の脱分極を生じさせ、培養を続けた。一定時間培養後に細胞を回収して細胞抽出液を作成し、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を Promega 社製 Luciferase Assay System および Berthold 社製 Lumat LB9507 を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性は POMC 遺伝子プロモーター活性すなわち新規 POMC 産生量を反映している。また、培養上清を回収して、GE Healthcare Life Sciences 社製 cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay System を用いて、AtT-20 から培養上清中に放出されたサイクリック AMP 量を測定した。

中枢神経系における低酸素によるエリス

ロポイエチン発現誘導に対する麻酔薬の作用と Wnt/ カテニン経路の関与

幼弱マウス大脳皮質からアストロサイト初代培養を調製した。ミダゾラムあるいは各種阻害薬の存在下あるいは非存在下で、初代培養アストロサイトを低酸素(1%) 暴露後にアストロサイトを回収して RNA および細胞抽出液を調製し、RT-PCR とイムノブロット法により解析した。また、培養上清中のエリスロポイエチン濃度を ELISA により評価した。

4. 研究成果

下垂体前葉細胞におけるプロオピオメラノコルチン産生に対する静脈麻酔薬の作用と Wnt/ カテニン経路の役割

(1) 塩化カリウム投与によるプロオピオメラノコルチン産生の検討

AtT-20PL に対して塩化カリウム投与によるプロオピオメラノコルチン産生は塩化カリウムの濃度と刺激時間に依存することが明らかになった。以後の実験には、80mM 塩化カリウムで 5 時間刺激を行うことにした。

(2) 塩化カリウムによって誘導されるプロオピオメラノコルチン産生に対する静脈麻酔薬の濃度依存的な作用

各濃度の静脈麻酔薬(プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパム、ケタミン、デクスメトミジン) 存在下に塩化カリウムによって誘導されるプロオピオメラノコルチン産生を検討すると、プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムは 100 μ M で有意にプロオピオメラノコルチン産生を抑制するが、ケタミン、デクスメトミジンは有意な影響を示さなかった。

(3) GABA_A 受容体、ベンゾジアゼピン受容体の関与

プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムの麻酔作用あるいは鎮静作用には GABA_A 受容体、ベンゾジアゼピン受容体が主に関与すると考えられている。そこで、これらの薬物が塩化カリウムにより誘導されるプロオピオメラノコルチン産生を抑制する作用にこれらの受容体が関与する可能性について検討した。GABA_A 受容体拮抗薬ピククリン、中枢性ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬フルマゼニル、末梢性ベンゾジアゼピン拮抗薬 PK11195 のいずれも、プロオピオメラノコルチン産生に対するプロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムの抑制作用には影響を及ぼさず、これらの静脈麻酔薬の作用は GABA_A 受容体、ベンゾジアゼピン受容体を介さないことが示唆された。

(4) Ca²⁺の関与

脱分極によるプロオピオメラノコルチン産生には、脱分極 電位依存性 Ca²⁺チャネル活性化 Ca²⁺流入 calmodulin kinase II 活性化 Nur77 誘導 Nur77 燐酸化 のような経路が関与すると考えられている。そこで、まず静脈麻酔薬がこの経路に作用する可能性について検討した。

100 μM BAPTA-AM 存在下では 80mM 塩化カリウムによるプロオピオメラノコルチン産生は約 50%抑制される。つまり、脱分極によるプロオピオメラノコルチン産生の少なくとも 50%は細胞内 Ca²⁺増加に依存していると考えられる。100 μM BAPTA-AM 存在下 (細胞内 Ca²⁺が上昇しない条件) では プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムによるプロオピオメラノコルチン産生抑制が見られず、これらの静脈麻酔薬が細胞内 Ca²⁺濃度上昇を抑制していることが推定された。

通常の培地は 1.8mM Ca²⁺を含むが、18mM Ca²⁺

を含む高 Ca²⁺培地中で静脈麻酔薬の作用を検討した。高 Ca²⁺培地中では、プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムによるプロオピオメラノコルチン産生抑制は有意に減少し、これらの静脈麻酔薬の作用には Ca²⁺流入抑制が関与することが示唆された。

上述のように静脈麻酔薬が Ca²⁺流入抑制を起こすことが示唆されたが、この Ca²⁺流入が AtT20 細胞に存在する L 型 Ca²⁺チャネルを介する可能性を検討した。L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 10 μM ニフェジピンは 80mM 塩化カリウムによるプロオピオメラノコルチン産生を約 40%抑制し、脱分極によるプロオピオメラノコルチン産生の少なくとも 40%は L 型 Ca²⁺チャネルを介する細胞外 Ca²⁺流入によると考えられた。10 μM ニフェジピン存在下ではプロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムによるプロオピオメラノコルチン産生抑制が認められず、これらの静脈麻酔薬は L 型 Ca²⁺チャネルの活性を抑制することにより脱分極によるプロオピオメラノコルチン産生を抑制する可能性が示唆された。

(5) サイクリック AMP の関与

下垂体前葉細胞におけるプロオピオメラノコルチン産生は、細胞内サイクリック AMP 増加とサイクリック AMP 依存性タンパク燐酸化酵素 (Protein kinase A) により調節されることが知られている。そこで、脱分極によるプロオピオメラノコルチン産生とそれに対する静脈麻酔薬の作用にサイクリック AMP が関与する可能性について検討した。

Protein kinase A 阻害薬 H89 は 80mM 塩化カリウムによるプロオピオメラノコルチン産生を抑制した。また、H89 存在下ではプロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムは 80mM 塩化カリウムによるプロオ

ピオメラノコルチン産生を抑制しなかった。従って、これらの静脈麻酔薬はサイクリック AMP 経路を抑制することによって 80mM 塩化カリウムによるプロオピオメラノコルチン産生を抑制する可能性がある。一方、80mM 塩化カリウムによりサイクリック AMP 放出量はわずかに増加するが、プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムにより変化しなかった。以上の結果から、脱分極により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが活性化して流入した Ca^{2+} は Protein kinase A のサイクリック AMP 感受性を上昇させることによりプロオピオメラノコルチン産生を増加させるが、プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ジアゼパムは Protein kinase A のサイクリック AMP 感受性を低下させてプロオピオメラノコルチン産生を抑制する可能性が示唆された。

(6) Wnt/ カテニン経路の関与

脱分極あるいは CRF 刺激によるプロオピオメラノコルチン発現誘導への Wnt/ カテニン経路の関与について解析を行ったが、今のところ有意な結果は得られていない。今後さらに解析を進める予定である。

中枢神経系における低酸素によるエリスロポイエチン発現誘導に対するミダゾラムの作用と Wnt/ カテニン経路の関与

(1) エリスロポイエチン発現に対するミダゾラムの作用

初代培養アストロサイトを 1%酸素に 4 時間暴露すると、エリスロポイエチン mRNA 発現量は約 20 倍に増加した。ミダゾラム (30 μ M あるいは 150 μ M) が存在する場合には、エリスロポイエチン mRNA 発現は有意に抑制された。この抑制効果はベンゾジアゼピン受容体

拮抗薬であるフルマゼニルにより影響を受けず、ミダゾラムの鎮静作用の機序と考えられる $GABA_A$ 受容体活性化作用とは別の機序を介すると考えられた。また、初代培養アストロサイトを 1%酸素に 24 時間暴露すると、培養上清中のエリスロポイエチン濃度は約 30 倍に増加するが、ミダゾラムは濃度依存性にエリスロポイエチン濃度を低下させた。

(2) ミダゾラムの作用における低酸素誘導因子の関与

低酸素によるエリスロポイエチン誘導には低酸素誘導因子 (HIF) が関与することが知られている。そこで、ミダゾラムの作用と HIF の関連について検討した。低酸素に暴露したアストロサイトから調製した細胞抽出液を用いて、イムノブロット法により HIF 発現量を評価したところ、低酸素暴露により細胞抽出液中の HIF-1 α 発現量は有意に増加していた。ミダゾラムは細胞全体の HIF-1 α 発現量に有意な影響を及ぼさないが、核内発現量は有意に低下していた。この結果はミダゾラムが HIF-1 α の核内移行を抑制することにより低酸素によるエリスロポイエチン発現誘導を抑制することを示唆している。

(3) Wnt/ カテニン経路の関与

低酸素による HIF-1 α とエリスロポイエチンの発現誘導に対する Wnt/ カテニン経路の関与について解析を行ったが、今のところ有意な結果は得られていない。今後さらに解析を進める予定である。

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)

Matsuyama, T., Tanaka, T., Tatsumi, K.,
Daijo, H., Kai, S., Haada, H. and Fukuda,
K., 2015. Midazolam inhibits the
hypoxia-induced up-regulation of
erythropoietin in the central nervous
system. Eur. J. Pharmacol. 76, 189-198.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

福田 和彦 (FUKUDA, Kazuhiko)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90199224