

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20025

研究課題名(和文) α 7アセチルコリン受容体が筋弛緩抵抗性に与える影響とその改善研究課題名(英文) The impact of upregulated nicotinic α 7 acetylcholine receptors on the resistance of neuromuscular blocking agents

研究代表者

岩崎 肇 (Hajime, Iwasaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00599368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要(和文)：非脱分極性筋弛緩薬に抵抗性を有する廃用性筋萎縮モデルに α 7アセチルコリン受容体(AChRs)特異的阻害薬であるArIBを先行投与することにより、その抵抗性を軽減する結果が得られた。本研究において、廃用性筋萎縮による筋弛緩抵抗性は増加した α 7AChRsが一因であることが証明された。しかし、ArIB単独では完全にその抵抗性を改善することができなかったため、増加した胎児型AChRsの影響も筋弛緩抵抗性に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our study demonstrated that ArIB reduced the resistance of neuromuscular blocking agent caused by disuse atrophy. We concluded that increased α 7 acetylcholine receptors are one of the causes of this resistance. However, because ArIB could not completely eliminate the resistance, we speculate that immature acetylcholine receptors also relate to the resistance of neuromuscular blocking agent caused by disuse atrophy.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード： α 7アセチルコリン受容体 廃用性筋萎縮 筋弛緩抵抗性

1. 研究開始当初の背景

(1) ①廃用性筋萎縮を有する患者に非脱分極性筋弛緩薬を用いる場合、効果発現に抵抗性を示すことが知られている。

②胎児型アセチルコリン受容体 (AChRs), もしくは中枢型 AChRs である $\alpha 7$ AChRs の増加が原因ではないかとされているが、どちらが神経伝達に影響を与えているかは未だ明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

廃用性筋萎縮マウスに $\alpha 7$ AChRs の特異的阻害薬である ArIB を先行投与し、その後の成熟型 AChRs に特異的に結合する waglerin-1 投与によるギプス固定側と健常側の下肢の筋収縮反応を解析することにより、 $\alpha 7$ AChRs の筋弛緩薬抵抗性への関与を検証した。

3. 研究の方法

(1) 廃用性筋萎縮モデルの作成

C57Bl/6 マウス及び、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ノックアウトマウスを用い、ポリエチレン製のスポイトとスポンジによって作成したギプスをマウスの左下肢に3週間装着し左下肢を不動化することにより作成した。



(2) 神経刺激による誘発筋収縮反応の測定

①手術

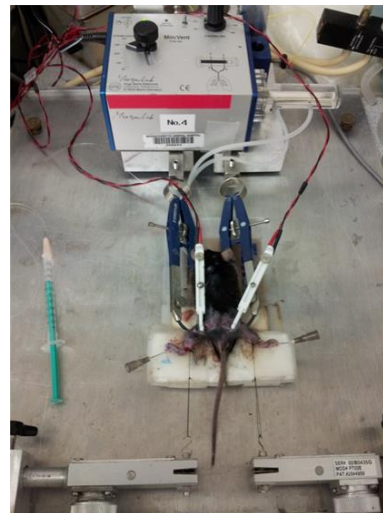
3 週間の下肢のギプス固定の後、ペントバルビタールをマウスに腹腔内投与し麻酔を導入した。気管切開を施行し、マウス用気管切開チューブを 3-0 絹糸にて固定した。顕微鏡下に、内頸静脈に投薬用カニューレを挿入し、4-0 絹糸で固定し、薬剤投薬経路とした。その後、坐骨神経を臀下部で丁寧に剥離、露出した。腓腹筋の収縮反応測定のためにアキレス腱を露出し、ループを作った 3-0 絹糸をアキレス腱の末梢側に繋いだ。これらの操作終了後、マウスを腹臥位にし、気管切開チューブを人工呼吸器 (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Germany) に接続し人工呼吸を開始した (一回換気量 10ml/kg, 呼吸回数 110 回/分)。坐骨神経に刺激電極、アキレス腱に張力トランスデューサー (Grass Instruments, Quincy, USA) を装着し、膝を

コンパスで固定した。なお、腓腹筋への前負荷として 5g の張力を負荷した。

② 坐骨神経刺激による腓腹筋収縮反応の記録

坐骨神経刺激には末梢神経刺激装置 (Fisher & Paykel Health Care, Irvine, USA) を用い、坐骨神経に Train-of-four 刺激 (2Hz, 4 回刺激) を与えた。最大上刺激電流を決定後、50Hz $\times$ 3 秒のテタヌス刺激を施行し、その後 15 分間腓腹筋の収縮反応を安定化するので確認した。

特異的成熟型 AChRs 阻害薬である waglerin-1 と特異的 $\alpha 7$ AChRs 阻害薬である ArIB は Massachusetts General Hospital の Peptide Core Facility で生成されたものを用いた。収縮反応の安定化を確認後、まず、ArIB を 10ug 投薬用カニューレから静脈内投与した。ArIB 投与 10 分後に waglerin-1 を 4ug 投与し、腓腹筋の収縮反応を専用ソフトウェアである PolyVIEW[®]16 (Glass Instruments, Quincy, USA) を用いて経時的に記録した。腓腹筋収縮反応の記録終了後速やかに左右の腓腹筋を採取し、液体窒素で急速冷凍、保存した。



(3) Real-time PCR

筋収縮反応観察後に採取した腓腹筋を RNeasy Plus Universal Mini Kit (QIAGEN, Valencia, USA) と BeadBeater (Biospec, Bartlesville, USA) を用いて RNA を抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (life technologies, Carlsbad, USA) を用いて cDNA を作成した。各アセチルコリン受容体の発現については、 $\alpha 7$ (TaqMan[®] Gene Expression Assays, life technologies, Mm01312230_m1), γ (TaqMan[®] Gene Expression Assays, life technologies, Mm00437419_m1), $\alpha 1$ (TaqMan[®] Gene Expression Assays, life technologies, Mm00431627_m1) の特異的プライマーを用いて real-time PCR にて検出した。なお、GAPDH (TaqMan[®] Gene Expression Assays, life technologies, Mm99999915_g1) の発現

量を内部コントロールとして標準化した。

4. 研究成果

(1) 野生型での筋萎縮側と健常側の比較

ArIB 先行投与後の waglerin-1 投与により、筋萎縮側の単収縮高は $26.5 \pm 14.3(\%)$ 、健常側の単収縮高は $46.1 \pm 15.7(\%)$ 減少した。統計学的有意差は認めなかった ($p=0.0625$)。 (図 1)

(2) $\alpha 7$ ノックアウトマウスでの筋萎縮側と健常側の比較

ArIB 先行投与後の waglerin-1 投与により、筋萎縮側の単収縮高は $2.14 \pm 0.79(\%)$ 、健常側の単収縮高は $7.4 \pm 2.1(\%)$ 減少した。統計学的有意差は認めなかった ($p=0.125$)。 (図 2)

図 1

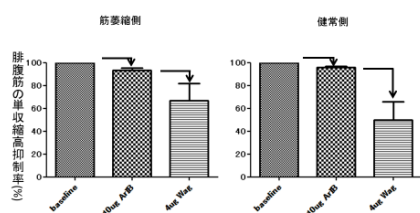


図 2

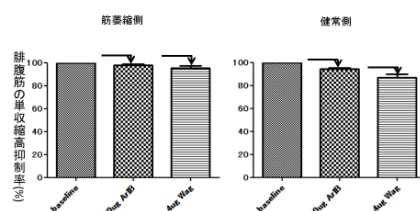
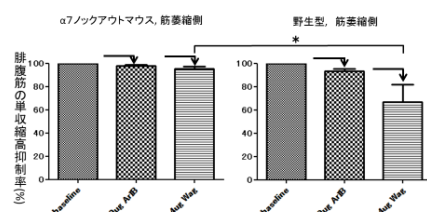


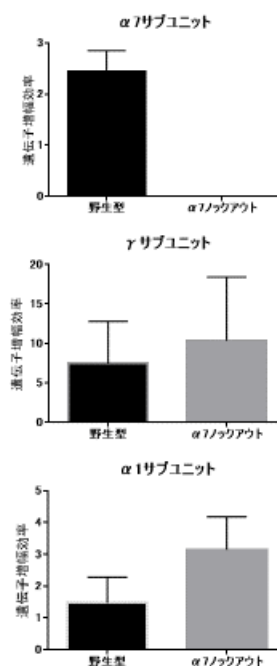
図 3



(3) 野生型, $\alpha 7$ ノックアウトマウスそれぞれの筋萎縮側の比較

上記に示した野生型, $\alpha 7$ ノックアウトマウスそれぞれの筋萎縮側を比較した場合, ArIB 先行投与後の waglerin-1 投与により野生型で有意に単収縮高が減少した ($p < 0.05$)。

(4) Real-time PCR の結果では、有意差はないものの野生型に比べ $\alpha 7$ ノックアウトマウスで僅かに γ サブユニットの発現が多い傾向にあることが示された。このことは、萎縮筋において $\alpha 7$ AChRs に代わって胎児型 AChRs が増加したために $\alpha 7$ AChRs が存在しない $\alpha 7$ ノックアウトマウスにおいても筋弛緩薬抵抗性を生じた可能性が示唆される。胎児型 AChRs の筋弛緩薬抵抗性への関与の可能性を今後検討する必要があることが示唆された。



以上より、廃用性筋萎縮によって増加した $\alpha 7$ AChRs を特異的に阻害する ArIB を先行投与することにより、続く成熟型 AChRs 特異的阻害薬である waglerin-1 投与による筋弛緩効果を増強することができた。しかし、胎児型 AChRs も $\alpha 7$ AChRs と同様に筋弛緩抵抗性に寄与している可能性があり、今後その両受容体を阻害することにより完全に筋弛緩薬抵抗性を改善できるかを検討する必要がある。また、長期集中治療後の患者や脊髄損傷患者などの廃用性筋萎縮を伴う病態において神経筋接合部における神経伝達の変化の機序をさらに解明することにより、筋弛緩薬、特に脱分極性筋弛緩薬使用の安全性の確保や非脱分極性筋弛緩薬の適切な使用量の決定など、臨床応用への可能性が期待される。

<引用文献>

- ① Fischer U, Reinhardt S, Albuquerque EX, Maelicke A. Expression of functional alpha7 nicotinic acetylcholine receptor during mammalian muscle development and denervation. Eur J Neurosci 1999; **11**: 2856-2864.
- ② Tsuneki H, Salas R, Dani JA. Mouse muscle denervation increases expression of an alpha7 nicotinic receptor with unusual pharmacology. J Physiol 2003; **547**: 169-179.
- ③ Whiteaker P, Marks MJ, Christensen S, Dowell C, Collins AC, McIntosh JM. Synthesis and characterization of 125I-alpha-conotoxin ArIB[V11L;V16A], a selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. J Pharmacol Exp Ther 2008; **325**: 910-919.
- ④ Khan MA, Sahani N, Neville KA, Nagashima M, Lee S, Sasakawa T, Kaneki M, Martyn JA. Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors. Can J Physiol Pharmacol 2014; **92**: 1-8.
- ⑤ Lee S, Yang HS, Sasakawa T, Khan MA, Khatri A, Kaneki M, Martyn JA. Immobilization with atrophy induces de novo expression of neuronal nicotinic alpha7 acetylcholine receptors in muscle contributing to neurotransmission. Anesthesiology 2014; **120**: 76-85.

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)

- ① 岩崎 肇、岩崎 寛、
北海道医学雑誌、査読有、90 巻、2015、59-63

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 肇 (IWASAKI, Hajime)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00599368