

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16503

研究課題名(和文) 麻酔薬の作用機序におけるGABA受容体とERK経路の役割に関する研究

研究課題名(英文) Extracellular signal regulated kinase has important roles in the regulating GABA A receptor activity

研究代表者

荒木 義之 (ARAKI, YOSHIYUKI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学・助教)

研究者番号：30757894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では全身麻酔における細胞外シグナル調節キナーゼ(extracellular signal regulated kinase: ERK)の役割を明らかにするために、ERKと アミノ酪酸(aminobutyric acid: GABA)A受容体活性の関係について解析した。中枢神経特異的にERK2を標的遺伝子欠損したマウスでは、海馬におけるGABA受容体サブユニットの発現と活性に異常が生じ、また静脈麻酔薬プロポフォールによる麻酔作用が減少することから、ERKがGABA(A)受容体の活性制御を通して麻酔作用に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

静脈麻酔薬プロポフォールは アミノ酪酸(aminobutyric acid: GABA)A受容体サブユニットに結合すると考えられているが、GABA(A)受容体の発現がどのような分子メカニズムで調節され、さらにどのようにしてプロポフォールによる麻酔作用とどのように関わっているかについては未だに不明な点が多かった。本研究の結果はERKが全身麻酔の作用機序において重要な役割を果たしていることを示唆しており、今後の全身麻酔薬開発などに資する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Intravenous anesthetics are widely used for surgery, but molecular mechanisms of anesthesia remain unidentified. Extracellular signal regulated kinases (ERKs) has important roles for cell signaling. In neurons, ERKs regulate several neuronal activities and here we investigated the roles of ERKs in the molecular mechanisms of action of intravenous anesthetics. We generated mice with Cre-loxP-mediated deletion of Erk2 in the central nervous systems and found that GABA (A) receptor activity is impaired in these mice. Accumulated evidence has indicated that the molecular target of intravenous anesthetics in the central nervous system is the GABA (A) receptor, the major mediator of inhibitory synaptic transmission. This result indicated that extracellular signal regulated kinase has important roles in the regulating GABA (A) receptor activity.

研究分野：麻酔学

キーワード：麻酔 ERK GABA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 全身麻酔は意識・記憶・痛覚を抑制するがその構造薬理作用ともに多種多様である。全身麻酔薬の多くは興奮性受容体である N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartic acid : NMDA) 受容体に対する拮抗作用、または抑制性受容体である  $\gamma$ -アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid : GABA) A 受容体に対する機能亢進作用が主な作用機序とされている。しかしながら麻酔薬の結合した受容体がさらにどのようなメカニズムで細胞応答をもたらすのかについては未解明な点が多い。

(2) 現在臨床的に広く用いられている全身麻酔薬は静脈麻酔薬と吸入麻酔薬に分類される。静脈麻酔薬プロポフォールは GABA (A) 受容体に結合すると考えられているが、GABA (A) 受容体の発現がどのような分子メカニズムで調節され、さらにどのようにしてプロポフォールによる麻酔作用と関わっているかについて不明な点が多い。

(3) 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen-activated Protein Kinase : MAPK) ファミリーに属する細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal regulated kinase: ERK) は記憶・学習をはじめとする神経細胞における様々な機能調節に関連しているが、GABA (A) 受容体の活性調節における役割についてはよく解っていない。

(4) これまでの ERK 経路に関する研究では主に MEK 阻害薬を用いた方法が用いられていたが、MEK 阻害薬は ERK のアイソフォームである ERK1 と ERK2 の両方の活性化を阻害するため、各々の役割については評価できなかった。本研究では ERK2 を標的遺伝子欠損したマウス (ノックアウトマウス) を用いることにより、ERK2 アイソフォーム特異的な機能について解析した。

### 2. 研究の目的

静脈麻酔薬プロポフォールの作用機序において、ERK2 が GABA (A) 受容体の活性制御に関与しているかについて明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では中枢神経特異的に ERK2 を標的遺伝子欠損したマウスを用い、GABA (A) 受容体サブユニットに関する野生型マウスとの違いを解析した。中枢神経特異的 ERK2 を標的遺伝子欠損したマウスは、防衛医科大学校生化学講座の佐藤泰司と東京都健康長寿医療センターの遠藤昌吾が共同で作出した ERK2<sup>flox</sup> マウスと Nestin-cre マウスとの掛け合わせにより作出した。

(2) プロポフォールによる鎮静作用は、薬剤腹腔内投与後の正向反射消失 (Loss Of Righting Reflex: LORR) 持続時間 (Duration of LORR) を指標として解析した。正向反射は頭部を重力の方向に対して正常の位置に回復するようにする反射運動であり、背臥位にしたマウスが 10 秒以内に腹臥位に回復することを反射陽性とした。

(3) 中枢神経特異的 ERK2 標的遺伝子欠損マウス及び野生型マウスの海馬を採取し、各々由来の初代培養神経細胞を得た後、培養 15 日目に細胞を回収した。これらのサンプルに対し、様々な GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットに対する抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

(4) (3) と同じく中枢神経特異的 ERK2 標的遺伝子欠損マウス由来及び野生型マウス由来初代培養神経細胞において、GABA (A) 受容体サブユニットの局在について免疫染色法を用いて解析した。

### 4. 研究成果

(1) プロポフォール腹腔内投与後の LORR 持続時間は野生型マウスと比較して中枢神経特異的 ERK2 標的遺伝子欠損マウスでは有意に減少していた (図 1)。このことから、ERK2 はプロポフォールによる鎮静効果の発現において重要な役割を果たしていることが示唆された。

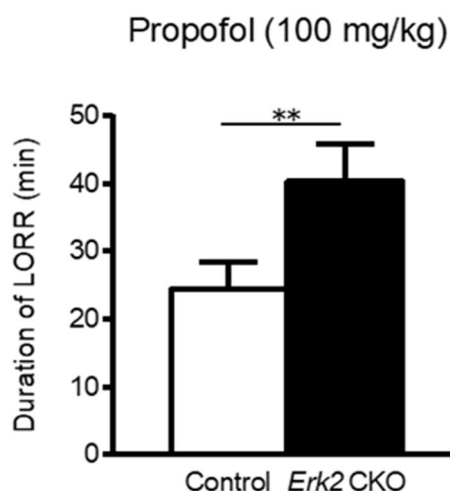


図1 野生型マウス及び中枢神経特異的 ERK2 標的遺伝子欠損マウスにプロポフォルを投与し、LORR 到達時間(Latency to LORR)と持続時間(Duration of LORR)を計測した。Student's t-test を用いて検定し、平均値 ± 標準誤差で表した。

(2) ERK2 遺伝子の欠損により、いくつかの GABA (A) 受容体サブユニットの発現が野生型マウスと比較して減少していることがウェスタンブロット法により確認した。

(3) 初代培養神経細胞において、各種 GABA (A) 受容体サブユニットの発現を共焦点レーザー顕微鏡で可視化した結果、中枢神経特異的に ERK2 を標的遺伝子欠損したマウスでは、GABA (A) 受容体の細胞膜の発現に異常がみられた。つまり、野生型と比較して、ERK2 標的遺伝子欠損マウスでは、シナプシンと共在している GABA (A) 受容体サブユニットの割合が少なくなっていた(図2)。

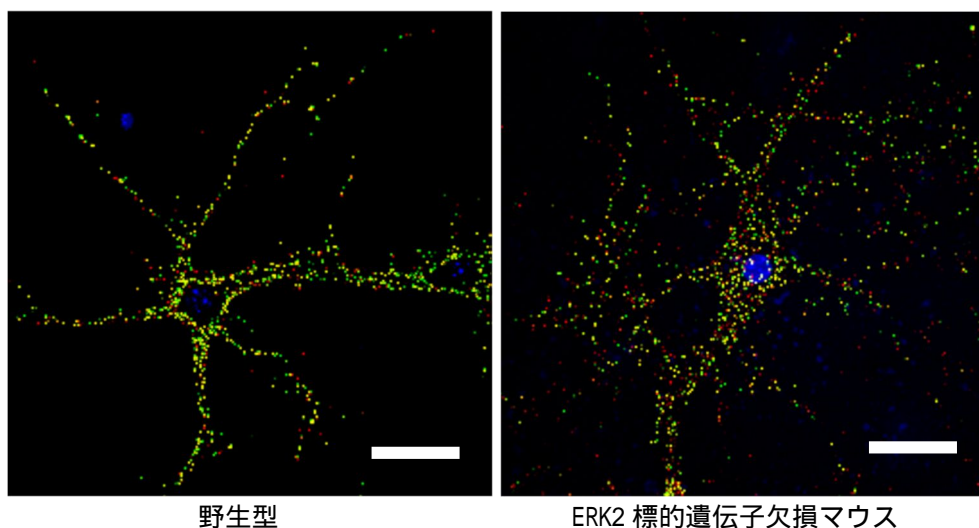


図2 野生型マウス及び中枢神経特異的 ERK2 標的遺伝子欠損マウス由来海馬初代神経培養細胞における DAPI(青)、プレシナプスマーカーのシナプシン(緑)及び GABA (A) 受容体サブユニット(赤)の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。緑と赤が共在すると黄色になるように画像処理している。スケールバーは 50  $\mu$ m。

以上の結果は ERK がプロポフォルによる全身麻酔の作用機序において重要な役割を果たしていることを示唆しており、今後の全身麻酔薬開発などに資する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Y., Araki Y., Kashitani M., Nishii K., Kobayashi Y., Fujita M., Suzuki S., Morimoto Y., Tokuno S., Tsumatori G., Yamamoto T., Saitoh D., Ishizuka T.:	4. 巻 77
2. 論文標題 Molecular Hydrogen Prevents Social Deficits and Depression-Like Behaviors Induced by Low-Intensity Blast in Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	6. 最初と最後の頁 827-836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jnen/nly060.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------