

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19209050

研究課題名 (和文) 麻酔薬シグナル伝達機構におけるナトリウムカリウムポンプの役割とその構造変化の解析

研究課題名 (英文) A role of Na⁺-K⁺ATPase (Na⁺pump) on signaling proteins of action anesthetic and its structural change

研究代表者

土肥 修司 (DOHI SHUJI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80136952

研究成果の概要 (和文)：

Na⁺-K⁺ATPase は細胞内外の Na⁺ と K⁺ の濃度を調節・制御しており、麻酔薬によるシグナル伝達機構にどう影響するかを、麻酔作用の重要なターゲットである脊髄後根神経節ニューロン (感覚ニューロン) および脊髄後角ニューロンにおいて検討した。Na⁺-K⁺ATPase もイオントランスポーターである Cation-Chloride Cotransporters (CCC) も、エンドセリンも麻酔薬の脊髄の疼痛シグナル制御機構にさまざまな影響を与え、正常と損傷を受けた動物とによって異なること、グリア細胞もその作用の一端を担っていることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要 (英文)：

To examine whether anesthetic agents as well as drugs used during anesthesia could affect spinal signaling molecules we have done several studies in both intact animals or those with incision pain. In addition to Na⁺-K⁺ATPase and local anesthetics and Na⁺ channel blockers, intrathecal administration of Cation-Chloride Cotransporters and endothelium could affect spinal pain signaling molecules such as ERKs in both intact and injured animals. Na⁺-K⁺ATPase inhibitor had antinociceptive synergistic interaction with clonidine, alpha2-adrenoceptor agonist, on tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons. An ultra-short-acting beta1-blockers differently inhibit the activity of voltage-gated tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in rat sensory neurons.

Also with using PC cells and glioma cells, we found that Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium channel opener, inhibits muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) and alpha2 adrenoreceptor agonist regulates protein kinase C-induced heat shock protein 27 phosphorylation in C6 glioma. We also examined to elucidate some of mechanisms of interleukin-1beta-induced GDNF release and involvement of Rho-kinase in tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 release from glioma cells.

In addition to neuronal effects, the results studied have suggested that Na⁺-K⁺ATPase and ion transporter affect spinal pain transmission via activation of intracellular signaling molecules of glial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
総計	20,100,000	6,030,000	26,130,000

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： $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 局所麻酔 脊髄疼痛受容体機構 ERK イオントランスポーター グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

生体における $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{pump}$) の役割の重要性は、Skou JCが1997年その発見でノーベル化学賞を得て以来、さまざまな面から研究がされている。しかし、生命機能の中樞を担う $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{pump}$) が、麻酔薬の作用を受けた生体ではどのような影響を受けているかは明らかではない。

神経系の機能は、脳・脊髄のニューロンやシナプスのイオンチャネルや受容体の活性による神経伝達物質の遊離を介するシグナル伝達分子のリン酸化によって維持される。麻酔薬の作用は、疼痛制御機構の重要なターゲットである脊髄後角ニューロンと脊髄後根神経節ニューロン、更には中枢神経系のグリア細胞への作用をも巻き込んだイオンチャネルへはもとより、シグナル伝達分子のリン酸化にも影響することが明らかになってきた。

2. 研究の目的

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{pump}$) は、細胞内外の Na^+ と K^+ の濃度を調節・制御している細胞膜にある重要な膜たんぱくである。研究代表者らは、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の抑止薬であるウアバイン (Ouabain) の脊髄くも膜下腔への投与は、モルヒネと比較して著明な疼痛受容抑制作用のある (Zeng W, Dohi S, et al: Anesthesiology 1999) ことを見出しているため、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ とともに他のイオントランスポーターが、麻酔薬やその関連薬によってどう影響するかを検討し、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の疼痛制御機構における役割の一端を明らかにすることにある。

更に、NMR と SuperBrightX 線による解析のための準備のため、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の recombinant を作成し、NMR と SuperBrightX 線回析装置の解析に耐える標的蛋白の精製を行い、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ 作用時の構造変化の解析への糸口を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脊髄鎮痛機構における $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の役割を *in vivo* の動物実験で脊髄および脊髄後根神経節レベルで検討する。

脊髄くも膜下腔内にカテーテルを挿入したラットの *in vivo* 系を用いて、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ のブロッカーである ouabain の

効果を対照群と下肢に損傷を作成した群とで比較検討した。更に、脊髄スライス標本を使用して、脊髄後角ニューロンのMAPキナーゼの活性を検討した。

Cation-Chloride Cotransporters (CCC) の役割をその Inhibitor である furosemide 100ug/20ul、あるいは溶液 20ul をラット脊髄くも膜下腔に投与し、行動変化を観察した。またその Inhibitor である furosemide のラット脊髄くも膜下腔に投与し、行 6 時間にわたって疼痛刺激に対する反応を観察した。

更に、脊髄後根神経節細胞レベルその作用を脊髄運動ニューロンと DRG ニューロンの初代培養細胞を用いて、Western blot 法で細胞内シグナル伝達蛋白分子機構から明らかにするため、脊髄後根神経細胞並びに脊髄スライスを用いて細胞内シグナル伝達分子 (ERK 活性) の変化を観察した。

(2) ストレス蛋白質 (HSP) は中枢神経系において麻酔・手術状態では重要な役割を担う蛋白と推測しており、その役割は知られていない。ストレス蛋白質 (HSP) は中枢神経系において細胞保護作用を持つとも推測されているので、手始めにわれわれは、ラットグリア細胞株 C6 細胞において、 α_2 受容体のアゴニストである dexmedetomidine が低分子量 HSP の一つである HSP27 におよぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) *in vivo* 研究の成果

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の *in vivo* における脊髄鎮痛機構における役割に続いて、CCC の inhibitor、furosemide はラットの疼痛刺激に対する閾値を低下させたが、切開手術モデルの痛みは抑制したことを見出した。

脊髄疼痛制御機構におけるイオントランスポーターの役割に関する研究は、世界的にも始まったばかりであり、Cation-Chloride Cotransporters (CCC) は、手術切開モデルでは切開部周辺の痛覚過敏に関与していることが推測され、これはインパクトの与える研究成果であると考えている。

更に、わが国で発見されたエンドセリン ET-1 を切開モデルラットの脊髄クモ膜下腔

に投与すると、鎮痛効果を示し、その作用は、ETA および ETB 受容体を介している と推察された。DRG ニューロンと、脊髄後角マイクログリアの結果は共に、脊髄クモ膜下腔に投与した ET1 は、切開による活性を抑制し、アンタゴニスト A, B は共に、その ET1 の作用を抑制し、これは疼痛閾値の結果と一致した。この作用がマイクログリアの作用を介していることを示唆する結果を得た。

これらの結果は、イオントランスポーターは、脊髄鎮痛制御機構にさまざまな影響を与えており、その役割は、正常の場合と損傷を受けた動物とによって異なることを示唆するものである。Cation-Chloride Cotransporters の脊髄疼痛制御機構における役割は、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{pump}$) の役割や、麻酔薬の Na^+ チャネルに対する作用ほど著明でない と推測された。

DRG ニューロンと、脊髄後角マイクログリアの結果は共に、脊髄クモ膜下腔に投与した ET1 は、切開による活性を抑制し、アンタゴニスト A, B は共に、その ET1 の作用を抑制し、これは疼痛閾値の結果に合致する。

脊髄後角の酵素染色では、差がみられなかったが、染色自体による問題か、あるいは切開後 30 分では、有意な差が現れなかった可能性がある。脊髄クモ膜下腔に投与した ET-1 は鎮痛作用を有し、その作用は ETA、ETB 受容体を介する。またその一部はマイクログリア細胞を介すると推察される。

(2) in vitro 研究の成果

グリア細胞 (アストロサイト) は成長因子を遊離することによってニューロン活動を賦活する。さらに、グリア細胞由来の神経成長因子 (GDNF) はニューロンや損傷を受けた組織のアストロサイトに発現する。この機序を明らかにする検討を行った。

グリオーマ細胞を用いて検討した結果、IL-1 β はグリア細胞由来の神経成長因子 (GDNF) の遊離を刺激すること見出し、この結果は IrB-nuclear factor kappaB、p38MAPkinase, p44/ p 42kinase, そして JAK-STAT3 の経路を介すること、しかし SAPK/JNK の経路ではないことを明らかにした。

また、PC12 細胞を用いた研究で母、ATPK⁺channel はムスカリン受容体を介した ERK の活性化を抑制するという結果が得られ、

これの脊髄鎮痛機構のシグナル伝達機構に影響することが示唆された。

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 8 件)

1. Tanahashi S, Iida H, Dohi S, Oda A, Osawa Y, Yamaguchi S: Comparative effects of ultra-short-acting β 1-blockers on voltage-gated tetrodotoxin-resistant Na^+ channels in rat sensory neurons. Eur J Anaesth 2009; 26: 196-200. 査読有
2. Tanabe K, Nishimura K, Dohi S, Kozawa O: Mechanisms of interleukin-1 β -induced GDNF release from rat glioma cells. Brain Reserch 2009; 1274: 11-20. 査読有
3. Yamaguchi S, Tanabe K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Iida H, Kozawa O, Dohi S: Involvement of Rho-kinase in tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 release from C6 glioma cells. Neurochemistry International 2009; 55: 438-445. 査読有
4. Tanabe K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Dohi S, Kozawa O: α_2 adrenoreceptor agonist regulates protein kinase C-induced heat shock protein 27 phosphorylation in C6 glioma cells. J Neurochem 2008; 106: 519-528. 査読有
5. Niinomi K, Banno Y, Iida H, Dohi S: Nicorandil, an ATPSensitive Potassium Channel Opener, Inhibits Muscarinic Acetylcholine Receptor-Mediated Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases in PC12 Cell. Anesth Analg 2008; 107: 1892-1898. 査読有
6. Zeng W, Chen X, Dohi S: Antinociceptive synergistic interaction between clonidine and ouabain on thermal nociceptive tests in the rat. J Pain 2007; 8: 983-988. 査読有
7. Oda A, Iida H, Tanahashi S, Osawa Y, Yamaguchi S, Dohi S: Effects of alpha2-adrenoceptor agonists on tetrodotoxin-resistant Na^+ channels in rat dorsal root ganglion neurons. Eur J Anaesthesiol 2007; 24: 934-941. 査読有
8. Tanahashi S, Iida H, Oda A, Osawa Y, Uchida M, Dohi S: Effects of ifenprodil on valtage-gated tetrodotoxin-resistant Na^+ Channels in rat sensory neurons. Eur J

Anaesth 2007; 24: 782-788. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 田辺久美子: Tumor necrosis factor- α によるグリア細胞からの Interleukin-6 の産生機序. 日本麻酔科学会 第 57 回学術集会、(麻酔 59, 104, 2010) 福岡、2010
2. Yanagidate F, He Y, Chen GH, Zhang L, Kawasaki Y, Dohi S: A role of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cation-chloride cotransporters on spinal pain transmission. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Paris, 2009 (Glia 2009;57. Supplement 13, P-141 2009年9月8~12日)
3. Tanabe K, Dohi S, Yanagidate F, Kozawa O: Mechanisms of interleukin- 1β -induced GDNF release from rat glioma cells. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Paris, 2009 (Glia 2009;57. Supplement 13, P-142, 2009年9月8~12日)
4. 陳桂花, 柳館富美, 張連喜, 土肥修司: エンドセリン (ET-1) の脊髄における鎮痛作用の検討. 日本麻酔科学会第 56 回学術集会、神戸 2009年5月22日
5. 田辺久美子: グリア細胞における protein kinase C における HSP27 リン酸化に対する dexmedetomidine の作用. 日本麻酔科学会 第 55 回学術集会、(J Anesthesia, 22, suppl, 142, 2008) 横浜、2008年6月12日
6. 張連喜, 柳館富美, 陳桂花, 土肥修司: 局所麻酔薬の脊髄後角細胞における作用機序、ERK 活性に及ぼす影響. 日本麻酔科学会第 56 回学術集会、神戸 2009年5月24日
7. 田辺久美子: Interleukin 1β によるグリア細胞からのグリア細胞由来神経成長因子 (GDNF) 遊離機序. 日本麻酔科学会 第 56 回学術集会、(麻酔 109, 2008) 神戸、2008年5月22日
8. Niinomi K, Banno Y, Iida H, Dohi S: Nicorandil, an ATP Sensitive Potassium Channel Opener, Inhibits Muscarinic Acetylcholine Receptor-Mediated Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases in PC12 Cell. IARS meeting at Orland, Florida 2008年3月23日

[図書] (計 2 件)

1. 土肥修司: 医歯薬出版、土肥編集別冊医学のあゆみ「麻酔科学の UPDATE」2009、麻酔中の覚醒と夢. 39-43.
2. Dohi S: Complications during Ptuitary Surgery. in Perioperative Complications in

Neurosurgical Anesthesia and Critical Care Medicine -Strategies for preventin, early detecton, and management. Edit by Ansgar Brambrink and Jeffrey R. Kirsch pp 2010

[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

土肥 修司 (DOHI SHUJI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80136952

(2) 研究分担者

田辺 久美子 (TANABE KUMIKO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 30402209

柳館 富美 (YANAGIDATE FUMI)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60313889

杉山 陽子 (SUGIYAMA YOUOKO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70444255

(3) 連携研究者