

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09373

研究課題名(和文) 膜受容体の流動性とシグナル伝達の関係性から見た揮発性麻酔薬作用機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of action of volatile anesthetics based on the relationship between membrane receptor fluidity and signal transduction

研究代表者

小野 純一郎 (Ono, Junichiro)

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：90363217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：揮発性麻酔薬の作用メカニズムは未だ不明な点が多い。本課題は麻酔メカニズムの解明を目的としており、特徴として量子ドット1分子ライブイメージング法を用いて研究を行った。量子ドットを用いる利点は、シナプス間隙の受容体タンパク質を標識できることである。GABAA受容体を量子ドットで標識したラット脳細胞に揮発性麻酔薬イソフルランを作用させ、細胞膜上での受容体の動態を解析した。その結果、イソフルランを作用させるとGABAA受容体の拡散係数は増加し、その局在はシナプス内に移動して集積していた。また、興奮性シナプス伝達の中心的役割を持つAMPA受容体の動態も調べたが、GABAA受容体と同じ傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

揮発性麻酔薬の作用機序は不明な点が多い。これまでの知見によると、揮発性麻酔薬は生体機能を司るタンパク質に作用することは確実と言える。しかし、揮発性麻酔薬は生体内で同時に複数の系に影響を及ぼす「多部位作用性」という特徴を持つため、作用機序の全貌を掴むことは容易ではない。そこで本課題では、受容体タンパク質への直接作用を解析するというアプローチではなく、生体膜上における受容体の流動性が細胞内へのシグナル伝達に影響を及ぼすという仮説の基に研究を行った。このようなアプローチで麻酔作用機序の解明を進めている研究は他に類を見ない。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of action of volatile anesthetics are still unclear. This study aimed to elucidate the mechanism of anesthesia, using the live-cell single-quantum-dot imaging as a feature. An advantage of using quantum-dots is the ability to label receptor proteins in the synaptic cleft. The neuronal cells labeled with quantum-dot were treated with isoflurane, and the dynamics of the receptor on the cell membrane was analyzed. Our results suggest that isoflurane increased the diffusion coefficient of GABAA receptors, and their localization shifted and accumulated within synapses. We also examined the dynamics of AMPA receptors, which play a central role in excitatory synaptic transmission, and found that they showed the similar tendency as GABAA receptors.

研究分野：麻酔科学

キーワード：揮発性麻酔薬 作用機序 膜流動性 シグナル伝達 ライブセルイメージング

## 様式 C-19, F-19-1, Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身麻酔は意識消失、鎮痛、不動化および自律神経抑制など、様々な要素から成り立つ現象である。これらすべての作用を併せ持つ麻酔薬が揮発性麻酔薬である。分子量 200 程度の低分子薬物がこれほど多くの作用を作り出すが、その作用機序は不明な点が多い。多様な作用を持つことから、その作用機序は1つの作用部位、1つの作用様式で説明されるものではなく、複数の系が複合して麻酔状態を形成すると考えられている。1970年から1980年代に得られた知見によれば、麻酔作用は麻酔薬分子とタンパク質との特異的相互作用によるものと考えられる。つまり、麻酔薬分子が膜受容体タンパク質に結合し、タンパク質の構造変化を引き起こすことで神経シグナル伝達を修飾すると考えられている。したがって、現在の揮発性麻酔薬メカニズム研究は、GABA<sub>A</sub>, nACh, AMPA, NMDA といった個々の受容体タンパク質への作用について分子レベルで展開されている。しかし、揮発性麻酔薬は体内分布が非特異的であり、さらに多部位作用性であるため、個々の受容体研究が進んでも、これら複数の受容体同士の機能関連の知見が不足しているために作用機序の全貌を把握できないジレンマに陥っている。

### 2. 研究の目的

本研究は揮発性麻酔薬の作用機序を新たな切り口で解明することを目的としている。これまでにない新しいコンセプトに基づいた研究を展開することで、停滞に陥っている麻酔メカニズム研究をブレークスルーしていきたい。これまでは強制発現させた各種受容体タンパク質に麻酔薬を作用させ、受容体機能への影響を解析する研究が多く、たしかに有益な結果が多数報告されている。しかし、揮発性麻酔薬は「多部位作用性」という、薬剤としては稀有な性質を持つため、個々のタンパク機能に焦点を絞って研究を進めると、細部は突き詰められるが全体像が把握できなくなる可能性が高い。それを考慮すると、今後は個々の受容体タンパク質への作用解析と同時に、局所作用を内包してまとめる、よりユニバーサルな生体機能修飾機構(=未知のメカニズム)をあぶり出すような発想が必要だと考える。

以上を踏まえ、申請者は特定の系や特定の作用部位に捉われない作業仮説を立てた。すなわち、膜受容体の流動性とシグナル伝達の関係性から麻酔メカニズムを説明できないかという仮説である。この仮説の根拠は、日本から発信された3本の論文である(引用文献①②③)。これらの論文は、採用された実験材料や実験方法は異なるが、共通しているのは“膜受容体の流動性がシグナル伝達に影響を及ぼす”という主張である。平たく言えば、細胞膜上の受容体は、細胞内にシグナルを正しく伝達するためには、膜上に一定時間留まる必要があるというものである。麻酔状態とは神経系のシグナル伝達の変調であるため、そのシグナル伝達の変調の原因を“受容体タンパク質の流動性増加”に求めるという理屈である。この機序であれば、単一の麻酔薬分子が複数の系に影響を与えること、薬剤が持つ物理的特性のみに効果発現が依存するため人種による効果の違いや薬剤耐性が無い、といった現象を説明できる。

上記の着想を基に、申請者は2019年までに膜貫通受容体タンパク質であるトランスフェリン受容体を用いてイソフルラン作用下に拡散速度が増加する、すなわち流動性が増加する現象を確認した(引用文献④)。この結果を基に、本課題では麻酔薬作用下における麻酔関連受容体タンパク質の流動性を、量子ドットを用いた一分子ライブイメージングで解析を行った(実験(1),(2))。量子ドットは自然発現している受容体が標識可能で、且つ小サイズのためシナプス内の受容体でも標識可能というメリットがある。また、麻酔薬による受容体の流動性変化が、麻酔以外の病態に影響を与えるかを調べた。今回焦点を当てたのは脂肪細胞内への糖取込みの

抑制である。外科的糖尿病と言われるように、手術のような侵襲が生体へ加わると、防御反応の1つとして血糖値が増加することは昔からよく知られている。主には侵襲ホルモンである cortisol による血糖上昇作用であるが、そのメカニズムの1つに、揮発性麻酔薬による細胞内への糖取込み抑制効果があるのではないかと仮定して研究を行った（実験(3)）。

### 3. 研究の方法

実験(1) イソフルラン作用下の GABA<sub>A</sub> 受容体の拡散速度測定

量子ドットで標識した GABA<sub>A</sub> 受容体の膜上での拡散速度の変化を経時的に測定した。Wistar/ST ラットの海馬初代神経細胞 (> 14 DIV) を用いた。この培養細胞の GABA<sub>A</sub> 受容体を Q ドットでラベリングを行い (図 1), 1mM イソフルラン含有培地で 30 分間曝露処理を行いながら共焦点顕微鏡で 5, 10, 15, 20, 30 分の時点で Q ドット輝点の録画を行った。共焦点顕微鏡での観察時には GABA<sub>A</sub> 受容体は図 2 のように 1 つの輝点として見える。これらの輝点の運動速度解析は早稲田大学で独自開発した輝点追跡ソフトウェアを用いて行った。

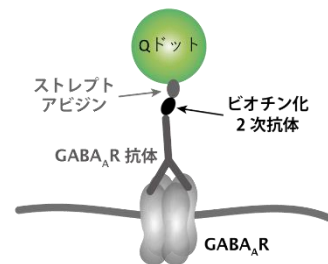


図1 Qドットによる受容体ラベリング

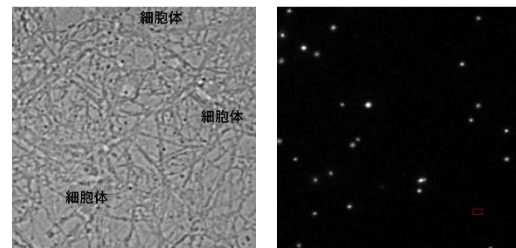


図2 Qドットで標識したラット海馬初代神経細胞 (28DIV) GABA<sub>A</sub>R

実験(2) イソフルラン投与 30 分後の GABA<sub>A</sub> 受容体の局在

拡散速度が増加した GABA<sub>A</sub> 受容体はどこに局在しているのかを捉えた。Wistar/ST ラットの海馬初代神経細胞 (> 14 DIV) を用いた。GABA<sub>A</sub> 受容体と抑制性シナプス前マーカー vGAT で標識し, 1mM イソフルラン投与 10 分後に免疫細胞染色を行った。得られた画像から, シナプス内とシナプス外に存在する GABA<sub>A</sub> 受容体をそれぞれカウントしてイソフルラン投与による GABA<sub>A</sub> 受容体の局在変化を捉えた。

実験(3) 脂肪細胞の糖取り込み抑制効果

3T3-L1 脂肪前駆細胞から分化誘導した脂肪細胞を実験に用いた。3T3-L1 脂肪細胞に対して 0mM、1mM イソフルラン含有培地で 30 分間曝露処理を行い。引き続き 20 nM インスリン刺激 3 分間処理の後に、2-Deoxyglucose 取り込みの定量と GLUT4 のタンパク発現量の比較を行なった。統計学的分析は Tukey による多重比較検定を用いて行い、有意水準は p<0.05 とした。

### 4. 研究成果

実験(1) 1 mM ISO 投与から

10 分間までは拡散係数が増大したのち 30 分後には低下した (図 3)。拡散係数は動いた輝点全ての拡散速度の平均値を意味するため、解釈としてはイソフルランによって GABA<sub>A</sub> 受容体の流動性が増加してどこかに移動し、そのまま留まることを示唆してはいるが、どこに局在しているかは不明である。

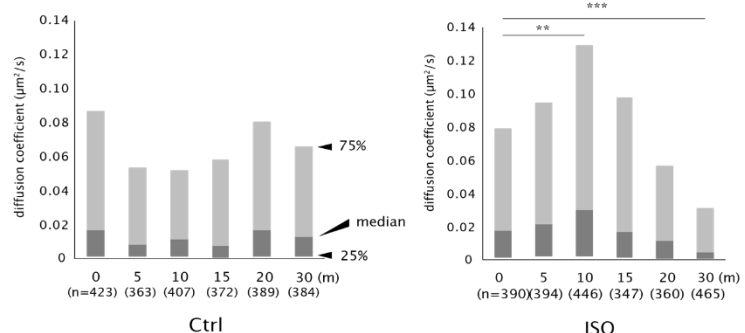


図3 イソフルラン投与後のGABA<sub>A</sub>受容体拡散係数

実験(2) GABA<sub>A</sub>受容体および小胞 GABA トランスポーター (vGAT) の細胞内局在を免疫細胞化学により調べたところ、ISO 投与 30 分後に GABA<sub>A</sub>受容体と vGAT が離散して局在することを示唆する結果を得た (図 4a)。

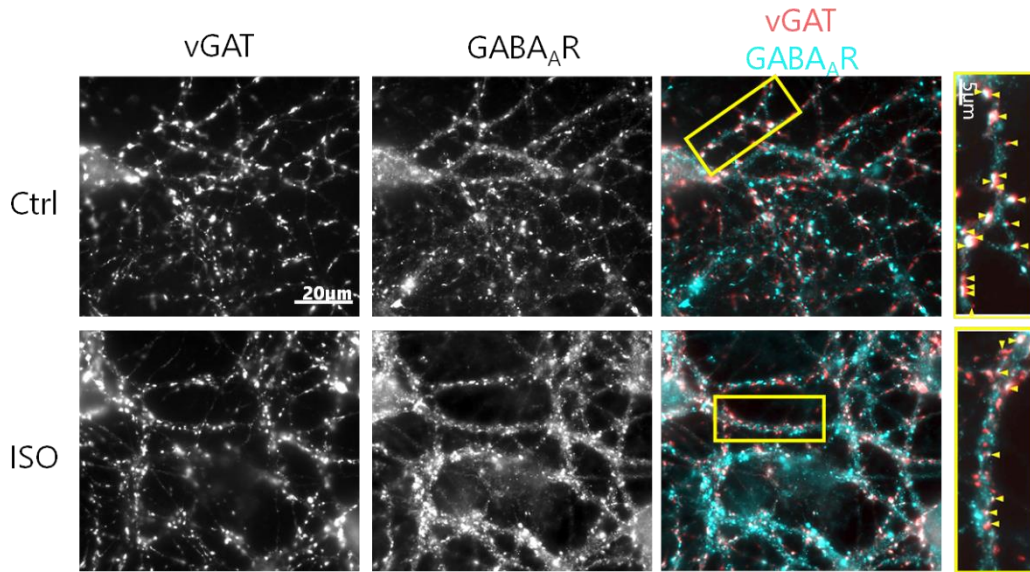


図 4 a イソフルラン投与後のGABA<sub>A</sub>受容体の局在 (免疫染色)

この免疫染色結果を用いて、シナプス内とシナプス外に局在する受容体の個数を計測してプロットした (図 4 b). シナプス外に存在する GABA<sub>A</sub> 受容体は vGAT と GABA<sub>A</sub> 受容体の局在に不一致が生じているものをカウントした. すると、イソフルラン投与 30 分後には GABA<sub>A</sub> 受容体はシナプス外に離散する傾向が示された. データ解釈としては、イソフルラン投与によってシナプス外に存在する GABA<sub>A</sub> 受容体が増えると tonic 電流が増加する. tonic 電流の増強により抑制性神経伝達が増強されている可能性が示唆された.

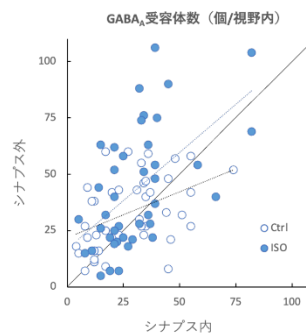


図 4 b イソフルラン投与後のGABA<sub>A</sub>受容体の局在 (局在傾向分析)

### 実験(3) 脂肪細胞の糖取り込み抑制効果

1mM イソフルランへの暴露によって、脂肪細胞への糖取り込みは有意に抑制された (Fig 5a). この時、糖取り込みに直接的影響を与える GLUT4 のタンパク発現量に有意な変化は見られなかった (Fig 5b). この結果から言えることは、イソフルランは細胞内への糖取り込みを阻害する. そのメカニズムは少なくとも GLUT4 発現量を抑制するものではないことが分かった. 糖取り込みを抑制するメカニズムとして考えられるのは、細胞質に存在する GLUT 4 の細胞膜への移送をイソフルランが抑制した、あるいは、細胞質から細胞膜上に移動した GLUT4 活性をイソフルランが抑制した、などが考えられるが、詳細は今後の研究で明らかにされると期待している.

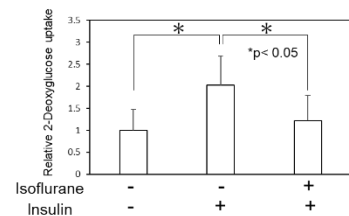


Fig. 5a 脂肪細胞への2デオキシグルコースの取り込み

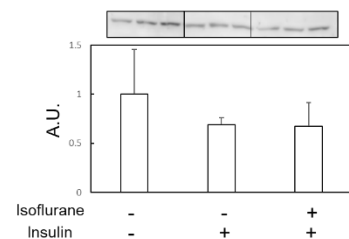


Fig. 5b 脂肪細胞における GLUT 4 発現量

<引用文献>

- ① Suzuki KG、他 5 名、GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G alpha for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1、J Cell Biol、177、2007、717-30
- ② Kabayama K、他 8 名、Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance、Proc Natl Acad Sci U S A、104(34)、2007、13678-83
- ③ Bannai H、他 7 名、Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics 、Neuron、62、2009、670-82
- ④ Ono J、他 6 名、Effect of the volatile anesthetic agent isoflurane on lateral diffusion of cell membrane proteins、FEBS Open bio、23;8(7)、2018、1127-1134

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 桜井繁雄、片桐太郎、小野純一郎、坂内博子
2. 発表標題 麻酔薬による GABAA受容体拡散運動への影響
3. 学会等名 日仏生物学会第194回例会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeo Sakuragi, Junichiro Ono, Hiroko Bannai
2. 発表標題 The diffusion dynamics and the distribution of GABAA receptor influenced by the isoflurane
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野純一郎、二瓶涉、石橋直子、樺山一哉、白神豪太郎
2. 発表標題 イソフルランはマウス脂肪細胞の糖取り込みを抑制する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	樺山 一哉  (KABAYAMA KAZUYA)  (00399974)	大阪大学・大学院理学研究科・准教授    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	坂内 博子  (BANNAI HIROKO)  (40332340)	早稲田大学・理工学術院・教授    (32689)	
研究分担者	鈴木 辰吾  (SUZUKI SHINGO)  (50451430)	香川大学・医学部・准教授    (16201)	

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