

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16560

研究課題名（和文）プロポフォールの多角的作用機序の解析ープロポフォール誘発副作用の解決に向けてー

研究課題名（英文）Multifaceted analysis of mechanisms underlying propofol actions to overcome the propofol-induced adverse effects

研究代表者

卜部 智晶（Urabe, Tomoaki）

広島大学・医系科学研究科（医）・専門研究員

研究者番号：70816347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：プロポフォール誘発性PKCトランスロケーションには、cPKCのC1およびC2ドメインが、nPKCのC1Bドメインが関与していることが明らかとなった。形質膜、ゴルジ体において臨床使用濃度のpropofolがPKCを活性化していることをPKC活性化インジケータのCKARにて明らかにした。プロポフォールはPKCに限らず様々なタンパク質の核内外の濃度を均一にさせる性質があることを明らかにした。高用量のレミマゾラムは、GPCR-IP3経路を介して用量依存的に細胞内カルシウム濃度を上昇させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロポフォールは、全身麻酔薬や鎮静薬としても頻用される静脈麻酔薬であるが、副作用として高頻度で血管痛を発生する。また、致死性の高いプロポフォール注入症候群も知られる。これら副作用の発症機序に根差した治療法策は未だなく、その開発は、本麻酔薬の安全使用のためには臨床上急務である。本研究成果により、これらの副作用の発症には、プロポフォールが細胞内各所にPKCを誘導すること、さらにその部位でPKCを活性化させることが関与している可能性が示された。また、レミマゾラムにおいても、細胞内カルシウム上昇がプロポフォールと同様の機序で、副作用の発現に関与する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The C1 and C2 domains of cPKC and the C1B domain of nPKC was involved in the Propofol-induced PKC translocation. Studies using CKAR, a PKC activation indicator revealed that propofol activates PKC in the plasma membrane and Golgi apparatus at clinically used concentration. Propofol has been shown to equalize the concentration of various proteins, not only PKC, in and out of the nucleus. Remimazolam at high doses dose-dependently increases intracellular calcium concentrations via the GPCR-IP3 pathway.

研究分野：麻酔科学

キーワード：静脈麻酔薬 タンパク質リン酸化 細胞内カルシウム上昇

## 1. 研究開始当初の背景

静脈麻酔薬プロポフォールは、GABAA 受容体を介して麻酔作用を発揮し、全身麻酔薬としても、鎮静薬としても汎用される。プロポフォールは、副作用として高頻度で血管痛を発生する。また、長期過剰投与で生じるプロポフォール注入症候群 (PRIS) は、頻度はまれであるが致死性の高い副作用である。これらの副作用の発症機序は未だ詳細には解明されておらず、その治療策も決定的なものはない。これら副作用発生機序の解明と治療法の開発は、プロポフォールの安全使用のためには臨床上急務である。

プロポフォールの副作用の作用機序として、我々は、過去の研究結果に基づき、細胞内カルシウム上昇とプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化に注目して以下のような知見を得た。

- 1) プロポフォールは、細胞内に浸透して細胞内小器官の形態変化を起こすことで、細胞内にカルシウムを動員する (Urabe et al, Eur. J. Pharmacol., 2020)
- 2) プロポフォールは、in vitro で様々な PKC 分子種を活性化し、細胞内の PKC の局在変化 (トランスロケーション) を引き起こす (Miyahara et al, J. Pharmacol. Sci., 2018)
- 3) プロポフォールは、臨床使用濃度において、細胞内 in vivo において、PKC を活性化するこれらの知見は、プロポフォールは、臨床使用濃度において、細胞内カルシウム上昇作用を併せ持つ PKC 活性化剤として作用することを示しており、この作用が、血管痛、PRIS の作用機序に関与している可能性を示している。

## 2. 研究の目的

このような学術劇背景のもと、以下の学術的問いを想定した。

- 1) プロポフォールによる細胞内カルシウムの上昇と PKC の活性化を鍵として、プロポフォールの作用機序を多角的・網羅的に解析し解明すること。
- 2) プロポフォールの作用機序を起点に、臨床上問題となる副作用の解決法の手がかりを得ること。

上記2点を通して、長年、不明であったプロポフォールの副作用発現機序の全容が明らかにし、治療方法の開発に大きく寄与することを目指して、以下を研究目的とした。

プロポフォールの PKC 活性化機構の解析

プロポフォールの細胞内カルシウム上昇機構の解析

プロポフォールにより惹起されるシグナル伝達機構の網羅的解析

研究成果からプロポフォール誘発副作用の解決への手がかりを得る

## 3. 研究の方法

プロポフォールの PKC 活性化機構の解析

- 1) プロポフォールの PKC への結合部位の同定

プロポフォールは試験管内で PKC リン酸化能力を促進することを既に見出している。プロポフォールは脂溶性薬物なので、PKC の脂質結合 C1A、C1B ドメインに結合することが予想されるが、詳細は不明である。以下を順に検討する。

C1 ドメインを中心として、PKC 各ドメインの欠損変異体と GFP の融合蛋白を HeLa 細胞に発現させる。

プロポフォールによる PKC の局在変化 (トランスロケーション) をタイムラプス観察する。

HeLa 細胞から免疫沈降で回収した PKC を酵素標品として PKC のリン酸化酵素活性を測定する。

の結果から、プロポフォールの PKC 活性化に重要な結合部位を同定する。この結果は、プロポフォールと PKC の結合を阻害し副作用の発生を抑制する薬物を検索するために重要な情報を与える。

- 2) プロポフォールの細胞内での PKC 活性化部位の同定

細胞内での PKC 活性化をリアルタイムで検出できる蛍光インジケータ CKAR を用いる。HeLa 細胞に CKAR を細胞膜、ゴルジ体に発現させて、プロポフォールを投与すると PKC が経時的に活性化することをすでに確認している。本検討では、血管痛の解明のために血管内皮細胞 (HUVEC) や血管平滑筋細胞を用いて検討する。また、細胞膜、ゴルジ体以外の細胞内局所にも CKAR を発現させて、PKC の活性化部位と活性化の程度を同定する。

プロポフォール誘発性 PKC トランスロケーションの性質とメカニズムの解析

- 1) プロポフォール誘発性 PKC トランスロケーションの観察と局在部位の同定

- 2) 核へのプロポフォール誘発性 PKC トランスロケーションの性質とメカニズムの解析

主に HeLa 細胞に各種 PKC-GFP を発現させ、プロポフォール投与時の PKC トランスロケーション現象を、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡にてタイムラプス観察する。トランスロケーション先の同定には、生細胞でオルガネラを標識可能な色素で染色する。

プロポフォールにより惹起されるシグナル伝達機構の網羅的解析

プロポフォールにより活性化した PKC は、様々なタンパク質をリン酸化させ、あるいは遺伝子発

現を誘導すると考えられる。血管痛や PRIS の原因となりうる分子がそれらに含まれる可能性が大きい。そこで、以下 3 点を検討する

- 1) プロポフォルを処置した HUVECs をリン酸化プロテオミクスに供し、プロポフォルが誘導するリン酸化タンパク質を網羅的に検索する。候補として NO 合成酵素 (NOS) などが想定される。
- 2) 同様にプロポフォル処置 HUVEC を RNA-sequence に供し、プロポフォルにより発現が変動する遺伝子を網羅的に解析する。シーケンサーは共同研究施設に現有。
- 3) 1), 2) から得られた分子群が、有意に多く含まれる生物学的過程・経路を統計学的に抽出する (パスウェイ解析)。プロポフォルにより駆動するシグナル伝達経路パスウェイを同定する。

#### 静脈麻酔薬レミゾラムによる細胞内カルシウム上昇の機序の解明

プロポフォルのみならず、静脈麻酔薬の作用機序を幅広く検討する目的で、日本で新規採用された、静脈麻酔薬レミゾラムの検討対象にした。すでに、高濃度のレミゾラムは、細胞内カルシウムを情報させることを明らかにしている。主に HeLa 細胞にカルシウム蛍光指示薬である Fluo-4 を取り込ませ、レミゾラム投与によるカルシウム上昇を蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス観察した。また、カルシウム上昇の機序を明らかにする目的で、細胞外カルシウム除去、PLC 阻害薬存在下、IP3 受容体拮抗薬存在下でのレミゾラムによる細胞内カルシウム上昇を観察した。

## 4. 研究成果

### プロポフォルによるプロテインキナーゼ C のトランスロケーションに関与するドメインの同定

プロポフォルは全身麻酔や鎮静のために広く使用されているが、その麻酔作用や副作用のメカニズムは十分に解明されていない。我々はこれまでに、プロポフォルがプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し、サブタイプ特異的にそのトランスロケーションを誘導することを明らかにしてきた。本研究の目的は、プロポフォルによる PKC のトランスロケーションに関与する PKC ドメインを同定することであった。

PKC の制御ドメインは C1 ドメインと C2 ドメインからなり、C1 ドメインは C1A と C1B サブドメインに細分化される。各ドメインを欠損させた変異型 PKC と PKC を緑色蛍光タンパク質 (GFP) と融合させ、HeLa 細胞で発現させた。プロポフォルによる PKC トランスロケーションを、蛍光顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングにより観察した。

その結果、PKC の C1 および C2 ドメインの両方を欠失させること、および PKC の C1B ドメインを欠失させることにより、プロポフォルによる PKC の持続的な細胞膜へのトランスロケーションが消失することが示された。したがって、プロポフォルによる PKC トランスロケーションは、PKC の C1 および C2 ドメインと PKC の C1B ドメインが関与していることが明らかとなった。また、PKC の C1 ドメイン阻害剤であるカルフォスチン C で処理すると、プロポフォルによる PKC のトランスロケーションが消失することを見出した。さらに、カルフォスチン C は、プロポフォルによる内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) のリン酸化を阻害した。

これらの結果は、プロポフォル誘導性 PKC トランスロケーションに関与する PKC ドメインを調節することにより、プロポフォル効果の発揮を調節できる可能性を示唆するものである。

### 新規静脈麻酔薬レミゾラムによる細胞内カルシウム動員の特性評価

レミゾラムは 2020 年 7 月に日本で初めて承認された静脈麻酔薬で、 $\gamma$ -アミノ酪酸 A (GABA<sub>A</sub>) 受容体を介して麻酔作用を発揮すると考えられているが、レミゾラムが細胞内カルシウム値を上昇させる正確なメカニズムは不明であった。

そこで、SHSY-5Y 神経芽腫細胞、COS-7 細胞、HEK293 細胞、HeLa 細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に蛍光色素を取り込ませ、ライブイメージングを行い、レミゾラムによる細胞内カルシウムの上昇を検討した。

試験したこれらの細胞において、高濃度 (300  $\mu$ M 以上) のレミゾラムが用量依存的に細胞内カルシウムを上昇させることを確認した。この現象は、細胞外カルシウムを除去しても影響を受けなかった。このカルシウム上昇は、細胞内または小胞体内カルシウムをそれぞれ BAPTA-AM またはタプシガルギンによって枯渇させると消失したことから、カルシウムは小胞体から動員されたものと考えられた。ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤である U-73122 やイノシトール 1, 4, 5-三リン酸受容体 (IP3R) 拮抗剤である xestospongine C などの GPCR (タンパク質結合受容体) シグナル阻害剤はレミゾラムによるカルシウム上昇を著しく抑制したが、リアノジン受容体拮抗剤のダントロレンがレミゾラムによるカルシウム上昇に影響しない。一方、ER-tracker を用いたレミゾラム刺激時の ER のライブイメージングでは、形態的な変化は見られなかった。

これらの結果から、高用量のレミゾラムは、試験した各細胞において用量依存的に細胞内カルシウム濃度を上昇させ、その原因は ER からのカルシウムの動員によるものと予測された。ま

た、様々な阻害剤を用いた検討により、このカルシウム上昇が GPCR-IP3 経路を介したものである可能性が明らかになった。しかし、どのタイプの GPCR が関与しているのかを特定するためには、さらなる研究が必要である。

#### プロポフォールによる PKC のトランスロケーションと活性化の詳細な特徴

propofol 誘発性 PKC (protein kinase C) のトランスロケーション現象に焦点を当てて、静脈麻酔薬プロポフォールの作用機序を明らかにすることを試みた。各種 GFP fused PKC を培養細胞に発現させ propofol 投与による PKC トランスロケーション動態を蛍光顕微鏡、もしくは共焦点レーザー顕微鏡で揭示観察した。細胞内 PKC 活性化のインジケータの CKAR (Ckinase activity receptor) を用いてプロポフォールによる PKC 活性化を測定した。プロポフォールによる核内外のタンパク質の移動のメカニズムを解析するため、核外、核内、核膜に蛍光タンパク質を発現させその動態を観察した。さらに、propofol の異性体や派生体による PKC translocation を検討することで、これらの現象に重要な structural motif の同定を試みた。

いずれの PKC に対しても propofol は形質膜へトランスロケーションさせた。nPKC の PKC と PKC に対しては、propofol は、ゴルジ体、小胞体にそれぞれトランスロケーションさせた。また、aPKC の PKC は核内にトランスロケーションさせた。これら PKC がトランスロケーション形質膜、ゴルジ体において臨床使用濃度の propofol が PKC を活性化していることを CKAR を用いた検討で明らかとなった。核への PKC トランスロケーションは、核内外のタンパク質濃度が均一になるように起こり、PKC 以外のタンパク質に対しても同じ現象が観察できた。また、propofol は核膜の皺を減少させた。propofol の異性体や派生体を用いた検討では、PKC translocation と核内外の translocation に重要な structural motif は異なることが予想された。

propofol は、各種 PKC に対して分子種特異的なトランスロケーションを誘導した。また、その際に PKC は細胞内で活性化されていることが明らかとなった。PKC 以外のタンパク質に関しても核内外のトランスロケーションを誘導した。propofol による PKC トランスロケーションと核内外のタンパク質移動は異なったメカニズムで生じていると考えられる。これらの propofol の性質は、propofol の有害効果を含む作用機序を理解するうえで重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Urabe, T., Miyoshi, H., Narasaki, S., Yanase, Y., Uchida, K., Noguchi, S., Hide, M, Tsutsumi, M. Y. and Sakai, N	4. 巻 17
2. 論文標題 Characterization of intracellular calcium mobilization induced by remimazolam, a newly approved intravenous anesthetic	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLos One	6. 最初と最後の頁 e0263395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0263395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Narasaki, S, Noguchi, S., Urabe, T., Harada, K., Hide, I., Tanaka, S., Yanase, Y., Kajimoto, T., Uchida, K., Tsutsumi, M., Y. and Sakai, N.	4. 巻 951
2. 論文標題 Identification of protein kinase C domains involved in its translocation induced by propofol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eur. J. Pharmacol	6. 最初と最後の頁 e175806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2023.175806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野口 颯真、梶本 武利、卜部 智晶、柳瀬 雄輝、榎崎 壮志、原田 佳奈、田中 茂、秀 和泉、酒井 規雄
2. 発表標題 静脈麻酔薬PropofolによるPKCトランスロケーションと細胞内局所におけるPKC活性化
3. 学会等名 第139回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾正和、池尻佑美、卜部智晶
2. 発表標題 TOFwatchと比べGE社NMTモジュールではTOF刺激での反応数が過大評価されている
3. 学会等名 第39回 日本麻酔・集中治療テクノロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎崎 壮志、野口 颯真、卜部 智晶、原田 佳奈、秀 和泉、田中 茂、柳瀬 雄輝、梶本 武利、酒井 規雄
2. 発表標題 プロポフォル誘発性PKCトランスロケーションの発生機構に関するPKC領域の同定
3. 学会等名 第140回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎崎 壮志、野口 颯真、卜部 智晶、原田 佳奈、秀 和泉、田中 茂、柳瀬 雄輝、梶本 武利、酒井 規雄
2. 発表標題 プロポフォル誘発性PKCトランスロケーションに関するPKCドメイン
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口 颯真、梶本 武利、卜部 智晶、柳瀬 雄輝、榎崎 壮志、原田 佳奈、田中 茂、秀 和泉、酒井 規雄
2. 発表標題 Propofol誘発性PKC Translocationの時空間的解析～細胞内局所におけるPKC活性化
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会 福岡
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口颯真、梶本武利、榎崎壮志、卜部智晶、石井友美、原田 佳奈、田中茂、秀和泉、酒井規雄
2. 発表標題 静脈麻酔薬 Propofol による核内外のタンパク質の局在の変化
3. 学会等名 第142回 薬理学会近畿部会 東大阪
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoaki Urabe, Hirotsugu Miyoshi, Soushi Narasaki, Yasuo M. Tsutsumi, Norio Sakai
2. 発表標題 Possible mechanisms of intracellular calcium elevation by propofol and remimazolam
3. 学会等名 ANZCA ASM 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 卜部智晶、三好寛二、檜崎壮志、堤保夫、酒井規雄
2. 発表標題 レミマゾラムとプロポフォルによる細胞内カルシウム上昇の機序の比較
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第69回学術集会 神戸
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------