

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20993

研究課題名（和文）プロポフォール・ケタミンが駆動する情報伝達系とセロトニントランスポーター制御機構

研究課題名（英文）Propofol/ketamine-driven signal transduction system and serotonin transporter regulatory mechanisms

研究代表者

今村 芹佳（本池芹佳）（Imamura, Serika）

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：40964630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：プロポフォールおよびケタミンを処理した細胞をリン酸化プロテオミクスに供し、プロポフォールが誘導するリン酸化タンパク質を網羅的に検索した。それらのタンパク質として血管痛の原因候補としてNO合成酵素、TRPチャンネル、麻酔薬効果発揮の候補としてTREK-1などのイオンチャンネル、また抗うつ薬発揮作用に関して、SERTなどを想定していたが、想定していた結果には至らなかった。一方、PKC-GFPをHeLa細胞で発現させ、共焦点レーザー走査顕微鏡にてプロポフォール誘発性動態を観察した結果、プロポフォールによりPKC転座が誘発され、PKCが活性化されることおよびそのメカニズムは明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロポフォールは、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方策は未だなく、その開発は臨床に急務となっていた。そのため、本研究においてプロポフォールの副作用の機序を解明することは、今後臨床において患者に薬剤を使用するうえで安全性を高めることができ、社会的意義があると考えられる。また、ケタミンは最近、即効性を示す抗うつ薬としての臨床使用が認められたが、その作用機序は明らかでない。そのため、プロポフォール同様、作用機序を明らかにすることは社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cells treated with propofol and ketamine were subjected to phosphoproteomics for a comprehensive search for propofol-induced phosphoproteins.

Propofol-induced phosphoproteins, i.e., NO synthase and TRP channels as candidates for causing vascular pain, and ion channels such as TREK-1 as candidates for exerting anesthetic effects, were assumed. We also assumed that SERT and other ion channels were candidates for antidepressant effects. However, the expected results were not achieved.

On the other hand, PKC-GFP was expressed in HeLa cells and its propofol-induced kinetics was observed by confocal laser scanning microscopy. The results showed that propofol induced PKC translocation and PKC activation and the mechanism of PKC activation.

研究分野：歯科麻酔

キーワード：セロトニントランスポーター PKC 静脈麻酔薬

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロポフォールは、歯科麻酔においても頻用される静脈麻酔薬である。プロポフォールの麻酔作用の発揮には GABA_A 受容体の関与が、従来指摘されている。しかし、副作用として高頻度で血管痛を発生する。また、長期過剰投与により、致死性の高いプロポフォール注入症候群 (PRIS) も知られる。PRIS の発症機序は詳細には不明であり、根本的治療方策はない。したがって、これら副作用の発症機序に根差した治療方策の開発が、临床上急務とされている。

また、静脈麻酔薬であるケタミンは、最近、即効性を示す抗うつ薬としての臨床使用が米国で認められたが、その作用機序は明らかでない。この抗うつ作用の発揮には、NMDA 受容体は関与せず、従来の抗うつ薬の標的として知られているセロトニントランスポーター (SERT) を含むセロトニン神経系の関与が指摘されている。

麻酔薬の効力と脂質への溶解性には正の相関性があるという「膜脂質説」は、20 世紀初頭より提唱されてきたが、その実態は明らかでなかった。最近、麻酔薬は、細胞膜脂質に浸透し、特にラフトなどの膜構造を変化させることを契機に、様々な膜タンパク質に作用することが明らかとなり、全身麻酔薬の共通の作用機序として「膜脂質説」が再注目されている。

これまでに申請者らは、膜脂質の成分および、細胞膜に浸透したプロポフォールにより活性化される PKC に注目して研究を行ってきた。プロポフォールが細胞膜、ゴルジ体にて直接 PKC に作用して PKC を活性化させることや、プロポフォールが小胞体、ミトコンドリアの構造変化を起こし、それらから Ca²⁺ を漏出させるといったことを明らかにしている。

これらのことをふまえ、静脈麻酔薬プロポフォールおよびケタミンが駆動する情報伝達系を明らかにし、これら麻酔薬の副作用の軽減や抗うつ作用の理解に繋げることを目的として研究する必要があった。

2. 研究の目的

(1) プロポフォールおよびケタミンが惹起するシグナル伝達機構の網羅的解析

全身麻酔薬の共通の作用機序として「膜脂質説」が最近再注目されている。最近、細胞膜に浸透した麻酔薬は脂質ラフトを破壊し、TREK-1 チャネルからカリウムの漏出が促され、興奮が抑制されることが解明された。

PKC は様々な脂質によって活性化されるリン酸化酵素である。脂質性に富むプロポフォールおよびケタミンは、細胞膜、細胞内小器官の膜に容易に浸透する。我々は以前に、プロポフォールは小胞体・ミトコンドリアの構造を破壊することを確かめている。そして、それらの部位で新生された脂質やプロポフォール自身が PKC 活性化やカルシウム上昇を介して、様々なシグナル伝達系を駆動させる。

したがって、プロポフォールやケタミンといった静脈麻酔薬の作用機序についてさらに解明するために、シグナル伝達機構について網羅的に解析を行う。

(2) プロポフォールの作用機序の解明

プロポフォールは麻酔作用の他に、血管痛や低血圧などの副作用を引き起こす可能性がある。また、高用量のプロポフォールを長時間使用すると、プロポフォール注入症候群 (PRIS) と呼ばれる、致命的となる可能性のある症候群を引き起こす。これらの副作用の根底にあるメカニズムはまだ解明されていないが、PKC がこれらのプロポフォールによる副作用に関与している可能性がある。

プロポフォールは、小胞体、ミトコンドリアの構造変化を起こし、そこから Ca²⁺ を漏出させる。これらの所見は、膜脂質説に基づくプロポフォールの細胞膜への浸透が契機に起こると考えられる。したがって、副作用の発症機序の解明にもつなげるため、プロポフォールの作用機序を解明する。

(3) プロポフォールおよびケタミンによるセロトニントランスポーター (SERT) の機能調節機構の解析

抗うつ薬の標的である膜タンパク質 SERT は、小胞体から形質膜まで細胞膜に組み入れられて輸送され (SERT 膜輸送) 形質膜でセロトニン取り込みを發揮する。

新たな抗うつ薬として期待される静脈麻酔薬ケタミンは、従来知られてきた NMDA 受容体拮抗作用を介さず抗うつ作用をもたらす。また、SERT ノックアウトマウスではケタミンの抗うつ作用は見られないことから、SERT の関与が指摘される。我々は以前に、小胞体で SERT が細胞膜に組み入れられてから形質膜に発現するまでの、SERT 膜輸送の過程で様々な機能調節を受けることを見出してきた。そのため、典型的な膜タンパク質である SERT は、膜に浸透した麻酔薬により何らかの制御を受ける可能性が高いと考えた。

したがって、細胞膜に容易に浸透するプロポフォールおよびケタミンによる SERT の機能調節機構の解析を行う。

3. 研究の方法

(1) プロポフォールおよびケタミンが惹起するシグナル伝達機構の網羅的解析

プロポフォールの血管痛を想定して、プロポフォールには血管内皮細胞 HUVEC を、ケタミンにはセロトニン神経細胞株 RN46A を用いる。

プロポフォールおよびケタミン処置した細胞をリン酸化プロテオミクスに供し、プロポフォールが誘導するリン酸化タンパク質を網羅的に検索する。血管痛の原因候補として NO 合成酵素、TRP チャネル、麻酔薬効果発揮の候補として TREK-1 などのイオンチャネル、また、抗うつ薬発揮作用に関して SERT などを想定した。

同様に処置細胞を RNA-sequence に供し、発現が変動する遺伝子を網羅的に解析する。

以上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し (パスウェイ解析)、駆動するシグナル伝達経路を同定する。

(2) プロポフォールの作用機序の解明

我々は以前に、SH-SY5Y 細胞を用いてプロポフォールが様々な PKC のサブタイプ特異的な転座を誘導することを見出した。今回は、プロポフォール誘導性転座の詳細な特性とメカニズムを調べるために、PKC 転座と細胞内活性化に関する知見が増えている HeLa 細胞を使用する。

緑色蛍光タンパク質である PKC-GFP (KC⁻-GFP、PKC^Δ-GFP、PKC^Δ-GFP、および PKC^Δ-GFP) の発現プラスミドを構築する。GFP 融合タンパク質と融合したさまざまな PKC を HeLa 細胞で発現させる。

共焦点レーザー走査顕微鏡を使用してそれらのプロポフォール誘発性動態を観察する。細胞内のプロポフォール誘発性 PKC 活性化は、細胞内 PKC 活性化の指標である C キナーゼ活性化受容体 (CKAR) を使用して推定する。また、プロポフォールの異性体と誘導体を使用して PKC 転座を調べ、このプロセスに關与する重要な構造モチーフを同定する。

(3) プロポフォールおよびケタミンによるセロトニントランスポーター (SERT) の機能調節機構の解析

SERT 発現細胞を用いた検討

遺伝子導入により SERT を一過性・安定発現させた COS-7 細胞・HEK293 細胞を使用する。

セロトニン取り込み活性に対する、プロポフォールおよびケタミンの影響を検討する。単位タンパク質量あたりのトリチウム・セロトニンの取り込みを測定し、セロトニン取り込み活性とする。

SERT は、小胞体に存在する不完全糖鎖修飾体と形質膜に存在する完全糖鎖修飾体があり、immunoblotting 解析で分子量の差から両者が区別可能であり、両者の発現量を比較することにより、SERT 膜輸送が評価できるため、SERT 膜輸送に対するプロポフォールおよびケタミンの影響を検討する。

プロポフォールおよびケタミンにより様々なリン酸化シグナルが駆動する可能性がある。SERT のリン酸化に対する両麻酔薬の影響を検討する。P32 ラベル無機リンを取り込ませた SERT 発現細胞に両麻酔薬を処置し、免疫沈降させた SERT のリン酸化状況をオートラジオグラフィで観察する。

(1) の網羅的解析で得られたで得られたシグナル伝達系の阻害薬、関連分子の siRNA を用いて、麻酔薬による SERT 機能調節のメカニズムをさらに検討し、網羅的解析の正当性を確認する。

in vivo での検討

プロポフォールおよびケタミンを処置したマウス・ラットの脳を用いて検討する。

処置動物からシナプトソームを抽出し、トリチウム・セロトニンを用いて SERT 取り込み活性を測定する。

SERT タンパク質の発現状況を immunoblotting 解析や免疫組織化学染色で検討する。

(1) の網羅的解析で得られたシグナル伝達系に關わるノックアウトマウスで同様の検討を行う。

4. 研究成果

(1) プロポフォールおよびケタミンが惹起するシグナル伝達機構の網羅的解析

プロポフォールおよびケタミンを処理した細胞をリン酸化プロテオミクスに供し、プロポフォールが誘導するリン酸化タンパク質を網羅的に検索した。それらのタンパク質として血管痛の原因候補として NO 合成酵素、TRP チャネル、麻酔薬効果発揮の候補として TREK-1 などのイオンチャネル、また抗うつ薬発揮作用に関して、SERT などを想定していたが、想定していた結果には至らなかった。

(2) プロポフォールの作用機序の解明

HeLa 細胞に様々な PKC-GFP cDNA を導入し、2 日後に蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡を用いてプロポフォール誘導性 PKC 転座を観察した。

プロポフォールは、PKC α 、従来の PKC、および PKC δ を新規 PKC (nPKC) から細胞膜 (PM) に持続的に転座させた。プロポフォールは、nPKC の PKC δ と PKC η をそれぞれゴルジ

体と小胞体に転座させた。プロポフォルはまた、非定型 PKC または PKC 以外のタンパク質の PKC ζ の核転座を誘導し、核の内外のタンパク質濃度が均一になった。CKAR 解析により、プロポフォルは PM とゴルジ体で PKC を活性化することが明らかになった。さらに、プロポフォルの異性体と誘導体を用いた試験では、PKC と核転座の誘導に重要な構造モチーフが異なることが予測された。

(3) プロポフォルおよびケタミンによるセロトニントランスポーター (SERT) の機能調節機構の解析

実験の進行が遅れたため、結果を出すに至らなかった。

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 1件）

1. 著者名 Noguchi Soma, Kajimoto Taketoshi, Kumamoto Takuya, Shingai Masashi, Narasaki Soshi, Urabe Tomoaki, Imamura Serika, Harada Kana, Hide Izumi, Tanaka Sigeru, Yanase Yuhki, Nakamura Shun-ichi, Tsutsumi Yasuo M., Sakai Norio	4. 巻 14
2. 論文標題 Features and mechanisms of propofol-induced protein kinase C (PKC) translocation and activation in living cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2023.1284586	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
---------	---------