

論 文 内 容 要 旨

Propofol induces the elevation of intracellular calcium via morphological changes in intracellular organelles, including the endoplasmic reticulum and mitochondria (プロポフォールは小胞体やミトコンドリアを含む細胞内小器官の形態変化により細胞内カルシウムの上昇を生じる)

European Journal of Pharmacology, in press.

主指導教員：堤 保夫教授
(医系科学研究科 麻酔蘇生学)
副指導教員：酒井 規雄教授
(医系科学研究科 神経薬理学)
副指導教員：佐伯 昇准教授
(医系科学研究科 麻酔蘇生学)

卜部 智晶

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

プロポフォールは、 γ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体を介して麻酔作用を発揮するとされ、全身麻酔の導入や維持だけでなく、人工呼吸管理における鎮静にも頻用されている。一方で、プロポフォールには多くの合併症も伴い、最も一般的な合併症に血管痛がある。その他、致命的な合併症には、特に小児および重症患者への長期間投与により発症しやすいプロポフォール注入症候群 (PRIS) がある。しかし、これらの合併症の発生機序は未だ不明である。これまでの研究から、臨床用量より高濃度のプロポフォールは細胞内カルシウムを上昇させることが知られている。細胞内カルシウムの上昇は、様々な細胞内シグナル伝達を駆動させるので、この現象は、プロポフォールの様々な効果発揮を理解する鍵と考えられる。本研究では、プロポフォールによるカルシウム上昇のメカニズムを明らかにする目的で、①カルシウム上昇の起源、②Gタンパク質共役受容体 (GPCR)、イノシトール 1,4,5-トリホスファート (IP3) 受容体、リアノジン受容体 (RyR) の関与、③小胞体 (ER) やミトコンドリアなどの細胞内小器官の形態学的変化に着目して検討を行った。

【方法】

プロポフォールによる細胞内カルシウムの上昇と細胞内小器官の形態変化を、ライブイメージングにて観察した。実験には、Fluo-4 (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ER TrackerTM ResCMXRos (250 nM)、Mito TrackerTM RED (1 μM) などの蛍光色素をローディングした SHSY-5Y 細胞、COS-7 細胞、HEK293 細胞、HUVEC を用いた。蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-9000) または共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM510) により検出した。また、ER 構造の観察のために免疫組織化学的検討を加えた。統計分析には、one-way ANOVA followed by Dunnett's posttest、unpaired t-test を用いた。P 値が 0.05 未満 ($P < 0.05$) の場合を有意差ありとした。

【結果と考察】

SHSY-5Y 細胞、COS-7 細胞、HEK293 細胞、および HUVEC において、50 μM 以上のプロポフォールは、用量依存的に細胞内カルシウムの上昇を生じた。この現象は、細胞外カルシウムの除去による影響を受けなかった。また、細胞内または小胞体 (ER) のカルシウムを BAPTA-AM または thapsigargin (TG) によってそれぞれ枯渇させると、カルシウムの有意な上昇を認めなかったことから、カルシウムは、主に ER から動員されたことが示唆された。

U-73122 (PLC 阻害薬)、xestospingon C (IP3 受容体拮抗薬)、dantrolene (RyR 拮抗薬) などの様々な阻害剤を使用した検討により、プロポフォールによって誘発されるカルシウムの上昇は、GPCR、IP3 受容体、または RyR を介さないことが明らかとなった。さらに、ER TrackerTM ResCMXRos、Mito TrackerTM RED および CellLightTM Golgi-GFP BacMam 2.0 を使用して、プロポフォール刺激後の ER、ミトコンドリア、ゴルジ体のライブイメージングを撮影した。カルシウムの上昇に伴って、ER とミトコンドリアの構造は断片化されて凝集し、これらの変化は観察期間中不可逆的であった。プロポフォールによる ER の構造変化は、ER マーカーの SEC61 β 抗

体を用いた免疫組織染色でも確認できた。次に、ER の形態学的変化とプロポフォール誘発性カルシウム上昇との関係性を調べた。ER の形態学的変化とカルシウム上昇は、ほぼ同時に発生した。おもしろいことに、細胞内カルシウムの除去後に細胞内カルシウムの上昇を認めなかった場合でさえ、ER の形態学的変化が観察された。この結果から、脂溶性の高いプロポフォールは、細胞膜を通過し細胞内に浸透し、カルシウムを貯蔵する細胞内小器官に直接作用することにより形態学的変化を引き起こし、細胞質へのカルシウムの漏出をもたらすことが予想された。

本研究では、50 μ M 以上のプロポフォールは、細胞内カルシウムの上昇と ER の形態学的変化を用量依存的に起こすことを示した。これらの現象は使用したすべての細胞株で認めたため、プロポフォールの普遍的な効果であると考えられる。臨床的には、全身麻酔時のプロポフォールの血中濃度は約 30 μ M 以下であるため、この実験で使用されたプロポフォール濃度は臨床で使用される濃度よりも高かった。しかし、プロポフォールが注入される血管またはプロポフォールが高用量でまたは長期間使用される場合には、プロポフォールの血中濃度が 30 μ M を超える可能性が十二分にある。そのような状況下では、プロポフォールは、細胞内小器官からカルシウムを漏出させ、細胞内カルシウムの上昇を起こしうることを示唆している。これらの現象は、血管痛および PRIS を含む、さまざまなプロポフォール誘発性の合併症の発症に関与している可能性がある。

【結語】

SHSY-5Y 細胞、COS-7 細胞、HEK293 細胞および HUVEC において、プロポフォールは細胞内カルシウムの用量依存的上昇を引き起こした。カルシウムの上昇に伴い、ER とミトコンドリアの構造は断片化され凝集した。これは、血管痛などのプロポフォールのさまざまな副作用に関与している可能性がある。