

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	卜部 智晶
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授 吉栖 正生	印	
審査委員	教授 今泉 和則		
審査委員	講師 細川 康二		
<p>[論文審査の結果の要旨]</p> <p>プロポフォールは、<math>\gamma</math>-アミノ酪酸 (GABA) A 受容体を介して麻酔作用を発揮し、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、致命的な合併症として、小児および重症患者への長期間投与により発症する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。</p> <p>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-トリホスフェート (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。</p> <p>実験には、カルシウム蛍光指示薬 Fluo-4 (125 <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>)、生細胞の小胞体を標識する ER Tracker<sup>TM</sup> (250 nM)、ミトコンドリアを標識する Mito Tracker<sup>TM</sup> RED (1 <math>\mu\text{M}</math>) 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。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、蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-9000) または共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM510) を用いて、ライブイメージングにて観察した。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、unpaired t-test を用いた。P 値が 0.05 未満 (<math>P &lt; 0.05</math>) の場合を有意差ありとした。</p> <p>SHSY-5Y 細胞、COS-7 細胞、HEK293 細胞、および HUVEC において、50 <math>\mu\text{M}</math> 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。</p> <p>U-73122 (PLC 阻害薬)、xestospongine C (IP3 受容体拮抗薬)、dantrolene (RyR 拮抗薬) などの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 Tracker<sup>TM</sup>、Mito Tracker<sup>TM</sup> RED および CellLight<sup>TM</sup> 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観察を行った。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 のマーカータンパクとしてセロトニント</p>			

ランスポーターC 末端欠損変異体を発現させた COS-7 細胞の免疫組織染色を用いた検討でも確認できた。

次に、ER の形態学的変化とプロポフォル誘発性カルシウム上昇との時間的関係性を調べた。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。興味深いことに、細胞内カルシウムの除去により細胞内カルシウムの上昇が認められなくなった際も、ER の形態学的変化が観察された。これらの結果から、脂溶性の高いプロポフォルは、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。

プロポフォルによる細胞内カルシウムの上昇と ER の形態学的変化は使用したすべての細胞株で認めたため、プロポフォ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ルの血中濃度は約 30  $\mu\text{M}$  以下であるため、この実験で使用されたプロポフォル濃度は臨床で使用される濃度よりも高かった。しかし、プロポフォルが注入される血管またはプロポフォルが高用量でまたは長期間使用される場合では、プロポフォルの血中濃度が 30  $\mu\text{M}$  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ル誘発性の合併症の発症に関与している可能性がある。

以上の結果から、本論文は、プロポフォルによる細胞内カルシウム上昇の機序を明らかにした。この成果はプロポフォルが起こす様々な副作用の理解と改善に寄与するものである。

よって審査委員会委員全員は、本論文が 卜部智晶 に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。