

平成 30 年 9 月 25 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10528

研究課題名(和文) 麻酔薬の発達期脳神経回路形成に与える影響の検討

研究課題名(英文) The influence of anesthetic agent on the plasty of neuronal circuit in the developmental brain

研究代表者

児玉 光厳 (Kodama, Mitsuyoshi)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院 麻酔科・講師)

研究者番号：00597528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：発達期神経細胞へのプロポフォール暴露はRhoAカスケードを阻害し成長円錐の破壊を引き起こし、同時にBDNF、NGFの軸索輸送を阻害しシナプス結合の過疎せいを生み出すことを発見した。これらの現象は齧歯類や人における発達期のプロポフォール暴露が成長後に引き起こすとされる記憶力障害を代表とする様々な行動障害発現のメカニズムの一因となる可能性を示唆する結果であった。

研究成果の概要(英文)：Propofol increased RhoA activation, collapsed growth cones, and impaired retrograde axonal transport of quantum dot-labelled brain-derived neurotrophic factor, all of which were prevented with TAT-C3. Adult mice previously treated with propofol had decreased numbers of total hippocampal synapses and presynaptic vesicles, reduced hippocampal dendritic arborisation, and infrapyramidal mossy fibres. These mice also exhibited decreased hippocampal-dependent contextual fear memory recall. All anatomical and behavioural changes were prevented with TAT-C3 pretreatment.

研究分野：麻酔学

キーワード：麻酔薬 発達期脳神経 毒性

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日

機関番号：82406

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10528

研究課題名 (和文) 麻酔薬の発達期脳神経回路形成に与える影響の検討

研究課題名 (英文) The effect of anesthetic agent in the developing brain

研究代表者

児玉 光厳 (Kodama Mitsuyoshi)

防衛医科大学校・麻酔学講座・講師

研究者番号：00597528

交付決定額 (研究期間全体):(直接経費) 27,000,000 円

研究成果の概要 (和文)

神経細胞内の脳由来神経成長因子 BDNF および神経成長因子 NGF の管状輸送に対する麻酔薬の影響を調査していくために、可視化可能な量子ドットにより修飾した脳由来神経成長因子 BDNF および神経成長因子 NGF を作成した。AviTag と呼ばれる部位特異的にライシンを挿入した特殊な BDNF (BDNF<sub>Avi</sub>) 及び NGF (NGF<sub>Avi</sub>) と挿入されたライシンと Biotin を結合させる酵素である BirA のプラスミドを、E. coli 由来のコンピテントセルを用い複製し、QIAGEN 社製ミディプレップを使用し生成することに成功した。

研究成果の概要 (英文)

We generated QD NGF and QD BDNF for researching the tubular transport in the developing neuron. And we found propofol mediate axonal transport impairment and growth cone collapse in the developing neuron. We think these findings are the one of the causes in propofol-mediated neurotoxicity in the developing brain.

## 1. 研究開始当初の背景

近年まで麻酔薬による作用は可逆的であり遺伝子発現、蛋白発現には影響は及ぼさないと信じられてきた。しかし 2003 年に Jevtovic-Todorovic らはラットを用い、通常の臨床で新生児、幼児に使用されている麻酔薬の混合でアポトーシスが起き、成長後の記名力障害が起きることを発表した。

2007 年には Fredriksson らが N-methyl-D-aspartate(NMDA) レセプターアンタゴニストと  $\gamma$ -aminobutyric acid type A(GABA<sub>A</sub>) レセプターアゴニストの併用により新生児のアポトーシスを引き起こし、同様の記名力障害を起こすと報告した。また 2009 年に我々のグループは吸入麻酔薬であるセボフルラン暴露が生後 6 日目のマウスの脳にアポトーシスを惹起し、成長後の記名力障害のみならず社会行動の異常を起こすことを発表した。特にこの社会行動異常は自閉症に関わっている可能性を強く示唆するものであった。また 2009 年に Wilder らは人においても 4 歳に至るまでに複数回全身麻酔を行った者は成長後の学習障害を起こすことを報告している。

しかしながら現在解き明かされている本毒性のメカニズムはごく僅かに過ぎず、2009 年に Brian Head らが麻酔直後のアポトーシスは proBDNF の増加により p75 ニューロトロフィンレセプターを介し、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho ファミリーの一つである RhoA が活性化され、アクチン細胞骨格の脱重合が促されることにより引き起こされると *in vitro* の実験系を用いて報告したものがほぼすべてと言っても過言ではない。

今回我々は RhoA の下流のタンパクのリン酸化と、RhoA と拮抗する CDC42 および Rac1 の活性化をウエスタンブロット法により測定する。麻酔薬暴露による神経細胞成長円錐への影響を評価する。

## 2. 研究の目的

麻酔薬の新生児期の脳に対する影響は現在未知の部分が多い。最近幼若なマウスやラットを使用し、麻酔薬の脳に対する影響を調べた論文が散見され、麻酔薬暴露直後のアポトーシス及び成長後の脳機能の障害を報告するものが多く見られる。しかしながら現在のところメカニズムの多くは解明されていない。本毒性の根本的解決を目指すため培養細胞を用い、麻酔薬による神経細胞の成長円錐の退縮および成長因子とミトコンドリアの細胞内管状輸送の変化を評価していく。

## 3. 研究の方法

マイクロフルイディックチャンバー内で培養されたマウスの海馬初代培養細胞にプロポフォールを投与し、F アクチンを Falloidin にて染色し、成長円錐の形状、大きさの変化を検討する。また活性型 RhoA, ROCK 等のアクチン細胞骨格の脱重合に関わるとされているタンパクの免疫蛍光染色も同時に行い成長円錐内への発現パターンを検討する。

アポトーシス発生の具体的経路の確認を行う。通常の培養皿にて培養されたマウス海馬初代培養細胞を使用しプロポフォールを投与する。ウエスタンブロット法を用い RhoA の下流に存在することが知られるタンパクである LIMK、MLC、スリングショット、

cofilin のリン酸化と、Rho ファミリーに含まれ神経成長、シナプス形成の促進を司る CDC42 および Rac1 の活性化を評価する。これら二つの実験は培養日数 7 日目、14 日目、21 日目の海馬初代培養細胞にそれぞれ行い、神経細胞の成長成熟過程におけるプロポフォールの影響の変化も検討していく。マイクロフルイディックチャンバー内で培養されたマウスの海馬初代培養細胞の成長円錐側に、量子ドットで修飾した脳由来神経成長因子 (QD-BDNF) を投与し、脳由来神経成長因子 (BDNF) の神経細胞内への取り込み、輸送をライブイメージングにて観察する。プロポフォールを投与し、これらの取り込み、輸送への影響を検討する。マイクロフルイディックチャンバー内で培養されたマウスの海馬初代培養細胞に Mitotracker を投与し細胞内のミトコンドリアを可視化し、ミトコンドリアの神経細胞内管状輸送をライブイメージングにて観察する。プロポフォールやその他の麻酔薬を投与しこの輸送に対する影響を検討する。

#### 4 . 研究成果

神経細胞内の脳由来神経成長因子 BDNF および神経成長因子 NGF の管状輸送に対する麻酔薬の影響を調査していくために、可視化可能な量子ドットにより修飾した脳由来神経成長因子 BDNF および神経成長因子 NGF を作成した。AviTag と呼ばれる部位特異的にライシンを挿入した特殊な BDNF (BDNF<sub>Avi</sub>) 及び NGF (NGF<sub>Avi</sub>) と挿入されたライシンと Biotin を結合させる酵素である BirA のプラスミドを、E. coli 由来のコンピテントセルを用い複製し、QUIAGEN

社製ミディプレップを使用し生成することに成功した。

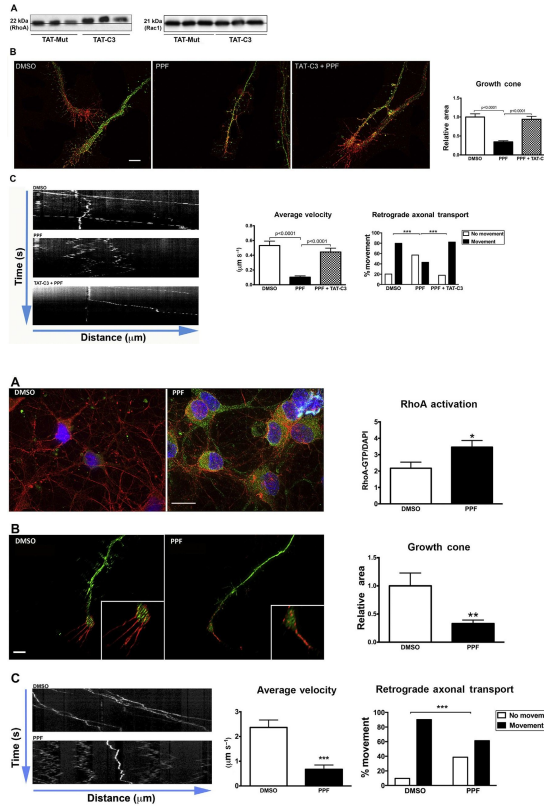
BDNF<sub>Avi</sub> と BirA もしくは NGF<sub>Avi</sub> と BirA の組み合わせを、HEK293 を培養したディッシュにドロップワイズ法を用いて投与し、Turbofect と Biotin を加え、72 時間インキュベーターにて保存することにより、BDNF および NGF に一か所だけ Biotin が結合されている mBtBDNF および mBtNGF が産生され、これらを含む培養液にニッケルアガロースを加え、沈降させ溶出バッファーをもちいて精製した。

このようにして作られた mBtBDNF および mBtNGF は、市販されているストレプトアビدينを表面に添加されている量子ドットと混和することにより QD-BDNF および QD-NGF となり、マイクロフルイディックチャンバー内で培養されたマウスの海馬神経初代培養の成長円錐側に投与することで、脳由来神経成長因子 BDNF および神経成長因子 NGF の神経細胞内への取り込み、輸送をライブイメージングにて観察することが可能になり、麻酔薬の脳由来神経成長因子 BDNF および神経成長因子 NGF の管状輸送に対する麻酔薬の影響を調査することが可能となった。

上記実験系を用い、プロポフォール投与により BDNF の軸索輸送の速度は低下し、また逆方向の輸送も増加することを確認した。

また我々は神経成長及びシナプス形成に大きな役割を果たすとされる神経細胞成長円錐への麻酔薬の影響を、海馬初代培養細胞を用い蛍光免疫染色により評価した。プロポフォールを投与されたニューロンにおいては、成長円錐の萎縮とフィロポデ

ィアの退縮を確認した。RhoAの拮抗薬であるC3の投与により、プロポフォル暴露での成長円錐の退縮作用を軽減も確認した。



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. L. Pearn, J. M. Schilling, M. Jian, J. Egawa, C. Wu, C. D. Mandyam, M. J. Fannon-Pavlich, U. Nguyen, J. Bertoglio, M. Kodama, S. K. Mahata, C. DerMardirossian, B. P. Lemkuil, R. Han, W. C. Mobley, H. H. Patel, P. M. Patel and B. P. Head

Inhibition of RhoA reduces propofol-mediated growth cone collapse, axonal transport impairment, loss of synaptic connectivity, and behavioural deficits

British Journal of Anaesthesia, 120 (4): 745-760 (2018)

doi: 10.1016/j.bja

〔学会発表〕(計 1 件)

M. L. Pearn, M. Kodama, P. Piyush, B. Head

ANESTHETIC TOXICITY IN RATS: RHOGTPASES, GROWTH CONE COLLAPSE, AND AXONAL TRANSPORT

IARS 2015 Annual Meeting, March 21-24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

児玉 光蔵 (KODAMA Mitsuyoshi)  
防衛医科大学 麻酔学講座 講師  
研究者番号: 00597528

#### (2) 研究分担者

佐藤 泰司 (SATO Yasushi)  
防衛医科大学 薬理学講座 准教授  
研究者番号: 10505267

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

#### (4) 研究協力者

( )

