

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15575

研究課題名(和文) 恐怖記憶形成における麻酔薬作用の分子科学的機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of the anesthetic action regarding fear memory constitution

研究代表者

木下 浩之 (Kinoshita, Hiroyuki)

愛知医科大学・公立大学の部局等・客員研究員

研究者番号：70291490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：思春期に相当する生後4週の雄マウスで驚愕反応試験直後に揮発性麻酔薬セボフルラン2.5%を3時間吸入させ、その吸入が24時間後の記憶(長期記憶)に及ぼす作用を検討した。セボフルラン吸入は恐怖記憶を増強し、海馬でのF-アクチン構成およびrac-1タンパク発現を増大させた。以上より、セボフルラン吸入は思春期個体で恐怖記憶の定着を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The current study was designed to evaluate whether the inhalation of volatile anesthetic sevoflurane (2.5% for 3 hours) enhances the long-term fear memory learning ability in combination with the F-actin constitution as well as rac-1 protein expression in the hippocampus in four-weeks-old young adult mice. Sevoflurane exposure to young adult mice accelerated the long-term fear memory with the increased F-actin constitution and rac-1 protein expression in the hippocampus. These results indicate that sevoflurane may enhance fear memory consolidation in young adults of humans.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 記憶 思春期 脳

1. 研究開始当初の背景

麻酔薬は発達途上の幼弱脳で神経変性を引き起こして長期記憶を障害するとされる。一方、発達が終了した若い脳に及ぼす麻酔薬作用は検討されていなかった。申請者らは、海馬が完成したばかりの Young Adult と定義される生後 4 週のマウスにセボフルラン (2.5%, 3 時間) を吸入させ、生後 8 週で恐怖記憶を評価した。その結果、セボフルラン吸入個体は、生後 8 週で暴露された恐怖を有意に記憶するようになり、その海馬で記憶形成を示唆する F-アクチン構成が増大していることを、偶然発見した。恐怖記憶評価実験は、外傷性ストレス傷害 (PTSD) のモデルとされている。したがって、申請者らの研究結果は、Young Adult 個体でのセボフルラン吸入の既往が、麻酔後の PTSD 発症頻度を高める可能性を示唆する。しかし、これに関する臨床的、基礎的知見は、極めて乏しかった。

近年、向不安系統マウスの遺伝子解析から、脳内の Glyoxalase 1 (Glo 1) 活性が、不安形成に役割を果たす可能性が示唆されている。成体では、Glo 1 は、GABA_A 受容体の競合的部分活性物質 Methylglyoxal (MG) を代謝することで恐怖記憶の構築を促進するとされる。しかし、Young Adult 個体で Glo 1 活性や MG が恐怖記憶形成に果たす役割は未知であり、麻酔薬がどのような機序でこれらに関わるかについても知見はなかった。一方、癌患者の脳で Glo 1 活性が高い。このことは、癌患者での不安や恐怖の構築に及ぼす Glo 1 酵素活性の関与を示唆するが、これに対する麻酔薬の影響は不明であった。

2. 研究の目的

以上の学術的背景をふまえ、本研究は、1) 生後 4 週の Young Adult マウスへの麻酔薬投与が、その 24 時間後の恐怖記憶 (PTSD) を増長させるか、2) 恐怖記憶増強個体の海馬で、Glo 1 活性が増大すると共に MG 活性が低下するか、3) Glo 1 阻害薬全身投与で麻酔薬による恐怖記憶定着増強作用は阻止できるかについて検討し、恐怖記憶 (PTSD) 形成における麻酔薬作用とその分子科学的機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

セボフルラン 2.5% あるいは空気を吸入させ、生後 4 週の雄 C57BL6 マウスを自発呼吸下で 3 時間鎮静あるいは静置する。この際、動物用保育器内で十分な加湿のもと 37 °C で行った。今までの申請者らの実験結果から、本法を用いればほぼ個体死を防げることが明らかになっている。

行動薬理実験に際しては、実験開始 1 時間前にマウスを室温 24 °C に保った実験室へ移し環境に慣れさせた。生理的条件を一定にするため、9-12 時の固定した 3 時間以内ですべての個体についての実験を終了した。測定には、現有の SMART ビデオ行動解析システム、パッシブアボイダンスケージを用いた。各個体の行動を現有のデジタルビデオカメラで記録してパーソナルコンピュータにビデオファイルとして取り込み、行動解析システム付属のソフトウェアで各パラメータを算出した。本試験は、動物が一度経験した電気刺激 (恐怖刺激として利用) に対する回避行動を 24 時間の長期記憶の指標とするもので、すでにその有用性は示されている。明室と暗室が扉でつながったパッシブアボイダンスケージ

を用いて、連続した3日間をセットとして検討を行った。初日、各マウスを明室に入れ、暗室にも自由に入れるようにして5分間順化させる。2日目、初日の過程に加え、暗室に入った時に7秒間の電気ショック(0.6mA)を加える。暗室に入る潜時を獲得時間として計測する。この後、セボフルラン吸入群とコントロール群に群わけした。3日目、マウスを明室に入れ、暗室に入る潜時を保続時間として計測した。

各行動薬理実験終了後に各マウスを頸損で安楽死させ、断頭後に海馬を摘出し-80℃で凍結保存してウェスタンブロッティングに用いた。一方、免疫組織学的検討には、行動薬理実験終了後のマウスにペントバルビタール50 mg/kgを腹腔内投与して開胸し、左心室から大動脈弓へカニューレーションして4%パラホルムアルデヒドで灌流固定ののち-80℃で凍結保存した脳を使用した。

しかし、研究を開始したところで、Glo 1 阻害薬 (BrBzGCp2) の水溶性が乏しいことが明らかとなり、DMSOを溶媒として用いて調整したが、個体によっては相当希釈の本溶媒でも死亡することが判明した。そのため、当初予定していたGlo 1に関する研究は施行できていない。

4. 研究成果

驚愕反応試験直後にセボフルラン2.5%を3時間吸入させ、その吸入が24時間後の記憶(長期記憶)に及ぼす作用と各個体から摘出した脳で海馬でのF-アクチン構成、F-アクチン構成に関与するrac-1タンパク発現、および活性酸素産生の変化について比較検討した。その結果、セボフルラン吸入は恐怖記憶を増強し、海馬でのF-アクチンの構成およびrac-1タンパク

の発現を増大させた。しかし、海馬での活性酸素レベルには、セボフルラン吸入群と対照群で差はなかった(PLoS ONE 2016; 11: e0163151 参照)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

1. Nakamura E, Kinoshita H, Feng G-G, Hayashi H, Satomoto M, Sato M, Fujiwara Y. Sevoflurane Inhalation accelerates the long-term memory consolidation via small GTPase overexpression in the hippocampus of mice in adolescence. PLoS ONE 2016; 11: e0163151 (doi:10.1371/journal.pone.0163151)

2. Kinoshita H: Does memory consolidation by anesthetics relate to a time window of age? Anesth Analg 2017; 125: 357 (doi: 10.1213/ANE.0000000000002163)

[学会発表](計 1件)

1. 中村絵美、安田吉孝、宮本泰周、藤原祥裕、木下浩之: 若年成体マウスへのセボフルラン曝露は恐怖記憶定着を促進する。日本麻酔科学会第63回学術集会、福岡県福岡市、2016.5.26-28

[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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：特になし

6．研究組織

(1)研究代表者

木下 浩之 (Kinoshita
Hiroyuki)

愛知医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70291490