

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20031

研究課題名(和文)小胞体化学シャペロンによる吸入麻酔薬の神経毒性の制御

研究課題名(英文)Control of neurotoxicity of inhaled anesthetics by endoplasmic reticulum chemical chaperone

研究代表者

小見田 真理 (KOMITA, Mari)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90589194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：・目的：近年、麻酔薬による神経毒性が指摘されている。我々は小胞体機能が障害された遺伝子変異マウスを用いて、吸入麻酔薬による神経毒性の分子機序を検討した。  
・成果：変異BiP(小胞体シャペロン分子)ノックインマウスと野生型マウスを胎生期に吸入麻酔薬セボフルランに曝露すると、短期的には変異BiPノックインマウスにおいて、神経細胞死が多く誘導される傾向がみられた。長期的には加齢による認知機能低下が早まる可能性が示唆された。  
・考察：吸入麻酔薬は小胞体機能を阻害することが示唆され、短期的にも長期的にも神経障害につながる可能性がある。神経毒性に感受性の高い個体において、麻酔薬の使用量を考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：&middledot; Purpose: In recent years, neurotoxicity due to anesthetic has been pointed out. We investigated the molecular mechanism of neurotoxicity by inhalation anesthetics using gene mutant mice with impaired endoplasmic reticulum function.  
&middledot; Results: Exposure of mutant BiP (endoplasmic reticulum chaperone molecule) knock-in mice and wild type mice to the inhalation anesthetic sevoflurane during embryonic development tends to induce more neuronal cell death in mutant BiP knockin mice in the short term It was done. Suggesting the possibility that cognitive decline due to aging may be accelerated in the long term.  
&middledot; Discussion: It is suggested that inhalation anesthetics inhibit endoplasmic reticulum function, which may lead to neurological disorders both short-term and long-term. In individuals sensitive to neurotoxicity, it is necessary to consider the amount of anesthetic to be used.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔薬 神経細胞死 ストレス

1. 研究開始当初の背景

生後7日目のラットに、イソフルラン、ミダゾラム、笑気で麻酔を行うと、神経細胞にアポトーシスが生じ、成長後に学習・記憶障害が残る、という2003年のJevtovicらの報告以来、麻酔薬による神経障害についての研究が多く進められているが、これらの分子機序は十分には明らかとなっていない。

この分子機序の一説に、細胞質カルシウム変化によるものがある。吸入麻酔薬に曝露されると、小胞体や細胞外からカルシウムが細胞質に流入し、その結果、細胞質カルシウムが上昇して、さらにミトコンドリアからのチトクロームの放出、カスパーゼの活性化を介して細胞死を誘導する、というものである。

Bipなどの小胞体分子シャペロンは、カルシウム結合タンパク質であり、カルシウム濃度の変化によって小胞体での蛋白合成が阻害され、小胞体ストレスにつながると考えられる。

小胞体ストレスは、様々な侵襲により、小胞体でのタンパク成熟が阻害され、異常蛋白が集積し、小胞体での処理能力を上回る状態となることである。

すると、小胞体ストレス反応(UPR)が起こり、分子シャペロンの産生増加、それ以外のタンパクの産生抑制、異常タンパクの分解が亢進する。こうして小胞体ストレスが軽減されるが、侵襲が大きいと、代償できず、細胞死が誘導される。

Bipは、タンパク質の構造形成を促進する、小胞体分子シャペロンであり、小胞体ストレス反応のセンサーの役割も果たしている。

私たちは、BiPの、カルボキシ末端にあるKDEL配列を、HAタグに置換した、変異BiPノックインマウスを作成した。

小胞体分子シャペロンBiPは小胞体から分泌されると、ゴルジ体でKDEL受容体に認識され、小胞体に輸送され回収されるが、変異BiPは回収されない。そのため、細胞はBiPの産生を亢進して補うため、細胞は小胞体ストレスに対して感受性が高くなる。

2. 研究の目的

吸入麻酔薬により神経障害や認知機能障害が助長される可能性が指摘されているが、その機序は明らかではない。吸入麻酔薬は細胞膜を透過し、細胞内小器官にも作用すると考えられる。

近年小胞体機能の障害により神経変性疾患などの様々な疾患が誘発されることが明らかになっている。我々は小胞体機能が障害された遺伝子変異マウスを用いて、吸入麻酔薬の神経毒性の分子機序に小胞体機能が関与しているのかどうかを検討した。

3. 研究の方法

・細胞での実験

小胞体機能を担う代表的な分子シャペロンBiPの変異体を発現する変異Bipノックインマウス由来の線維芽細胞(B/B MEFs)、野

生型マウス由来の線維芽細胞(+/+ MEFs)、マウス神経芽腫細胞(Neuro2a cells)をそれぞれ麻酔群は3%セボフルラン、対照群は酸素に2.5~7.5時間曝露後、24時間培養し、細胞を回収した。小胞体ストレスやその結果生じる細胞死に關与するBiPやCHOPの発現を検出し、対照群と比較した。

・マウスでの実験

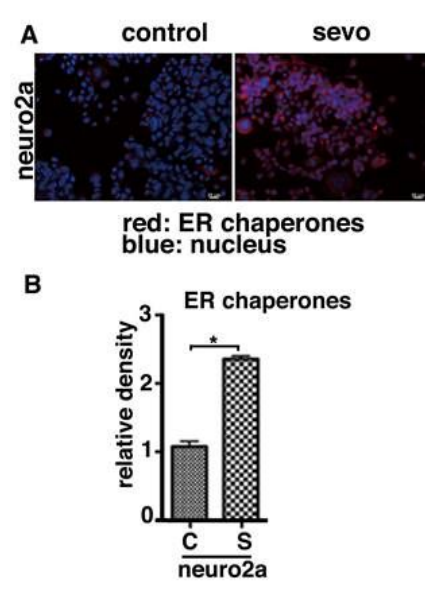
ヘテロ変異Bipノックインマウス同士を交配し、出産前日(妊娠17.5日目)に母マウスを麻酔群は3%のセボフルラン、対照群は40%酸素に3時間曝露し、24時間後に帝王切開を行い新生児マウスの遺伝子型を調べ、脳組織を取り出し細胞死を解析し、対照群と比較した。また、麻酔群のマウスにおいては、麻酔中の血圧・脈拍・尾の血流量・呼吸数・酸素飽和度をモニターし、大きなバイタルの変動がみられないか確認した。

また、長期的な実験として、野生型マウスとヘテロ変異Bipノックインマウスを交配し、出産前日(妊娠17.5日目)に母マウスを麻酔群は3%のセボフルラン、対照群は40%酸素に3時間曝露した。麻酔後、今度は妊娠を継続し、出産させ、生後10週、半年、一年後に仔マウスに8方向迷路実験を行い、空間認知学習機能を評価した。マウスに事前にトレーニングを行い、迷路に置いた8個のエサを食べ終えた時間を計測し、探索時間・正答率などを比較検討した。

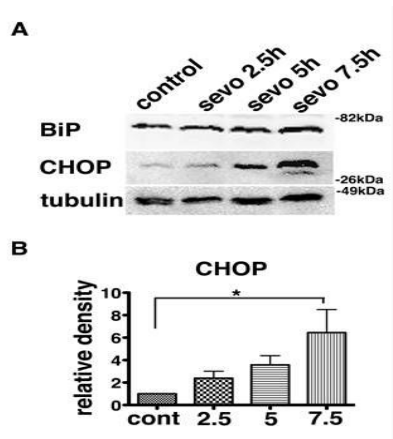
4. 研究成果

まず最初に、吸入麻酔薬が小胞体機能にどのような影響を及ぼすかを調べるため、私たちは神経芽腫細胞neuro2aにセボフルランを曝露する実験を行った。

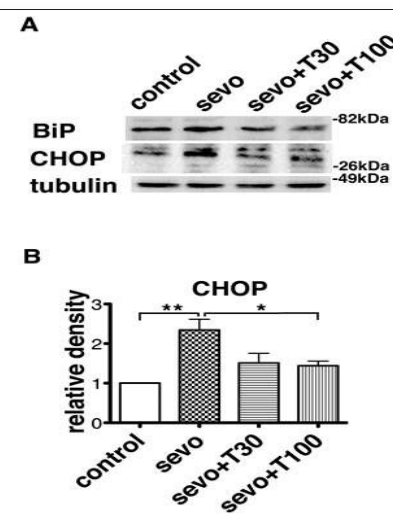
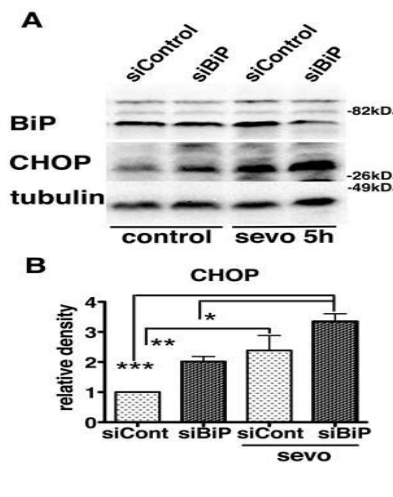
neuro2aにセボフルラン3%を3時間曝露したところ、小胞体シャペロン(Bipを含む)の発現が有意に増加した。つまり、セボフルランの曝露によって、小胞体ストレスが生じたと考えられた。(Fig. 1)



次に、曝露時間を変えて neuro2a にセボフルラン 3% を曝露したところ、小胞体ストレスによる細胞死を誘導する転写因子である CHOP の発現量が時間依存的に増加した。つまり、セボフルランの曝露で、小胞体ストレスによる細胞死が誘導される傾向があると考えられた。(Fig. 2)

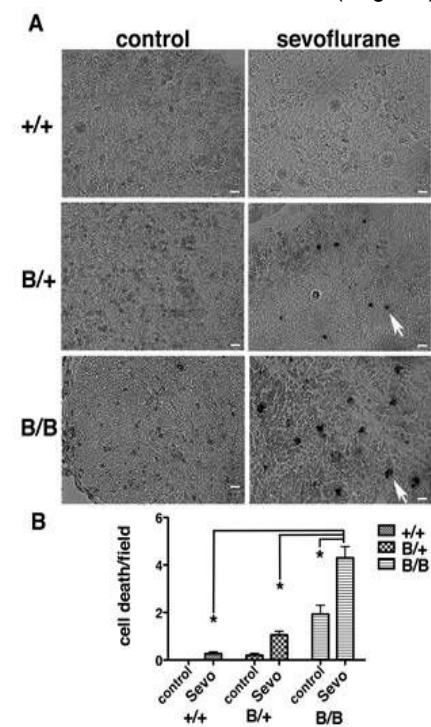


また、BiP の発現量を減らす si BiP やケミカルシャペロン TUDCA を用いた実験により、小胞体分子シャペロン BiP やケミカルシャペロン TUDCA は、小胞体ストレスによる細胞死から、細胞を保護する役割があると考えられた。小胞体機能向上によって、神経毒性抑制につながる可能性が示された。(Fig. 3・4)

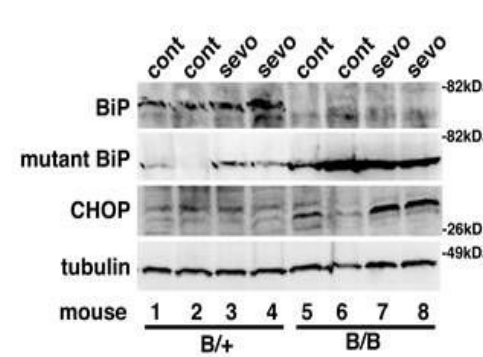


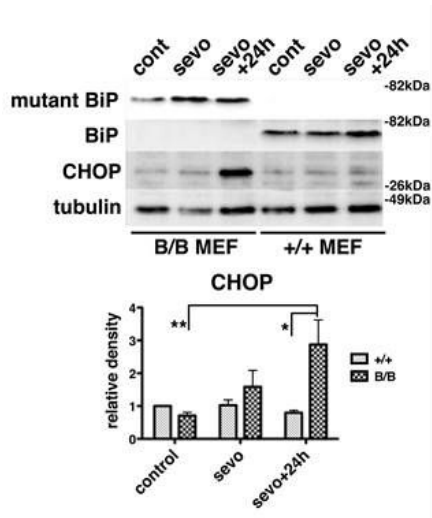
続いて in vivo での実験を行った。ヘテロ変異 BiP ノックインマウス同士を交配し妊娠させ、妊娠後期の 17.5 日目に、母親に麻酔を行った。酸素 40% 下に麻酔群には、セボフルラン 3% を 3 時間曝露した。麻酔終了後 24 時間後に帝王切開し、胎児の脳を回収して、遺伝子型を解析し、神経アポトーシスを検出し、対照群と比較を行った。

すると、胎児マウス脳の組織像では変異 BiP マウス、特にホモ変異マウスにおいて、セボフルラン曝露によって細胞死が多く誘導される傾向を認めた。(Fig. 5)



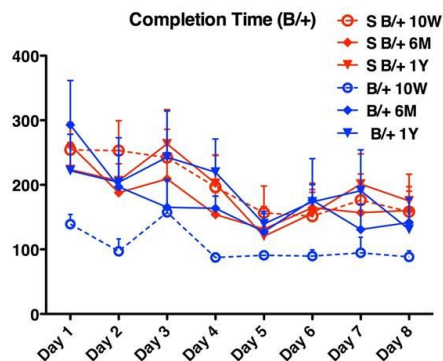
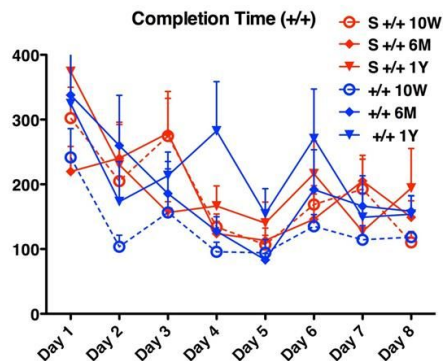
また、ウエスタンブロット解析においても、セボフルラン曝露によって、ホモ変異マウスやマウス由来の繊維芽細胞では変異 BiP や CHOP の発現が増加しており、小胞体ストレス反応による代償ができず、細胞死が誘導されたと考えられた。つまり、吸入麻酔薬の曝露で小胞体ストレスが生じたが、野生型のマウスでは小胞体ストレス反応による代償により生き延びるが、ホモ変異 BiP マウスでは小胞体ストレスによる代償ができず細胞死が誘導されたと考えられた。(Fig. 6) (Fig. 7)





長期的実験の結果は以下のとおりである。野生型・ヘテロ変異マウス共に、若いマウスほど素早い。変異マウスの方がより若年で探索時間が長くなる傾向がみられた。経験上、ヘテロ変異マウスは、老化が早いことが知られている。ところが、セボフルラン曝露を行うと、この、探索時間の年齢差がなくなった。セボフルラン曝露で老化が促進された可能性が否定できない結果となった。(Fig. 8)

また、正答率においても、若いマウスほど正答率が高かったが、セボフルラン曝露によって、野生型・変異マウスの両方において、同様にこの年齢差がなくなった。



今回の研究の考察は以下のとおりである。吸入麻酔薬セボフルランの曝露によって BiP の発現誘導がみられることより、吸入麻酔薬は小胞体機能を阻害し、小胞体ストレス反応を誘導することが示唆された。

野生型細胞では、BiP など小胞体分子シャ

ペロンの産生増加により細胞障害が代償されるが、変異細胞では代償されず、神経細胞死が誘導されることが示唆された。また、その神経毒性は麻酔薬を用いた時間や量に依存して高まると考えられた。

長期的影響として、胎生期のセボフルランの曝露は、若年マウスの認知機能を低下させ、老化を促進する可能性があることも示唆された。

今回の研究の limitation は以下の通りである。

まずは、吸入麻酔薬の曝露時間が、invitro と invivo で異なるという点があげられる。細胞は 5 時間、7.5 時間という長時間の麻酔に耐えられたが、マウスは 3 時間以上の麻酔に耐えられなかったためである。長時間の麻酔では、低血圧、低酸素血症、低血糖などの麻酔薬以外の影響を除外できなくなってしまう。

次に、invitro の実験で用いた神経芽腫細胞や線維芽細胞は、通常の神経細胞とは異なるという点もあげられる。

Invivo の実験においては、今回の実験ではセボフルラン曝露時期を妊娠後期に設定したが、この時期は、マウスの神経アポトーシスに対する感受性が高い時期とは異なるという点があげられる。

事実、新生児マウスに麻酔を行うと、野生型マウスに神経細胞死が生じたという研究報告が多数みられる。私たちは、異なる遺伝子型のマウスに同条件で麻酔を行うために麻酔時期を胎児期に設定した。

その結果、今回の研究では、変異型マウスには神経細胞死が生じたが、野生型マウスには生じなかった。つまり、変異型マウスは野生型マウスより神経細胞死に対する感受性が高いと考えられた。

同様に、神経変性疾患や躁うつ病患者など、小胞体機能障害により誘発される疾患患者においても、麻酔薬による神経細胞死が生じやすい可能性が考えられる。

今回の研究で用いたセボフルランは吸入麻酔薬の一つであり、気道刺激性が少ない、心筋抑制は比較的少ないなどの特徴があるため、小児麻酔領域で最も頻繁に用いられる麻酔薬である。他の吸入麻酔薬との神経毒性の違いについては、様々な研究報告が認められるが、明確にはされていない。

この研究の結論は以下のとおりである。

吸入麻酔薬の曝露によって BiP や CHOP の発現誘導がみられることから、吸入麻酔薬は小胞体機能を阻害する事が示唆された。また、胎生期の吸入麻酔薬の曝露によって、認知機能低下や、老化の促進など長期的な影響が残る可能性も示唆された。

変異 BiP マウスと同様、小胞体機能の障害により誘発される疾患の患者、また神経発達中の若年個体においては、吸入麻酔薬による神経障害がより出現しやすい可能性が否定できない。そのため、実際の臨床において麻

酔薬濃度や曝露時間を軽減するなどの配慮が求められる可能性がある。

研究者番号：

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

青江知彦、小見田真理

小胞体機能障害マウスモデルでの胎生期の吸入麻醉薬暴露による神経障害と長期予後の検討

日本麻醉科学会 第64回学術集会

平成29年6月8日

神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

〔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

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小見田 真理 (KOMITA, Mari)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90589194

##### (2)研究分担者

該当なし

##### (3)連携研究者

なし( )