

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20045

研究課題名(和文) 麻酔薬による記憶障害のメカニズム解明とその治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of mechanism of anesthetic-induced amnesia and new therapy

研究代表者

井浦 晃 (Iura, Akira)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40467551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの脳より海馬を摘出し、スライスを作成した。これを人工脳脊髄液で灌流した状態で、顕微鏡下にCA3領域の錐体細胞に対してパッチクランプを行い、細胞電流を記録した。ベースラインの記録後、灌流液にミダゾラム(0.2 μ M)を加えて再度電流を記録した。ミダゾラム投与により、10～20pAの基線上昇がみられ、ミダゾラムのTonic電流増強効果が示された。GABAA受容体5サブユニット阻害薬であるL-655708(50nM)を投与したところ、Tonic電流の減少がみられた。すなわち、海馬神経細胞においてL-655708はミダゾラムのTonic電流増強効果に拮抗する作用を持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the influence of anesthetics on GABAA receptor using electrophysiological method (slice patch clamp).

Male C57BC6 mice (8 weeks age) were sacrificed and removed hippocampus under urethane anesthesia (intraperitoneal injection 1.5-2.0 g/kg). Hippocampus was sliced to 250 μ m. The slices were kept in standard artificial cerebrospinal fluid ACSF saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ at room temperature for at least 60 min before recording. Whole-cell patch clamp (voltage clamp) recordings were performed from pyramidal cell in CA3 region of the hippocampus slices under a microscope. Membrane potentials were held at 0 mV.

Tonic current amplitude was calculated as the difference in the holding current before and after drug application. Application of midazolam increased baseline current 10-20 pA. Application of L-655708 (50nM) decreased baseline current. It is demonstrated that L-655708 antagonize current enhancement effect of midazolam in hippocampus neuron.

研究分野：麻酔科学

キーワード：GABAA受容体 5サブユニット Tonic電流 海馬 麻酔薬

1. 研究開始当初の背景

現在医療現場では、新生児から高齢者まで多くの人々が手術や検査のために全身麻酔を受けている。全身麻酔薬投与後に発生する認知機能障害は個人差が大きい、高齢者ではそのリスクが増大する。遷延する認知障害は患者の QOL を低下させるのみならず、入院期間の長期化など医療費の増大にもつながり、社会全体へ悪影響を及ぼす。そのため、全身麻酔後の認知障害発症のメカニズムを解明し、その予防法ないし治療法を開発することは、患者にとっても、また社会にとっても、非常に大きな意義があると考えられる。全身麻酔薬の作用機序は、いまだ完全には解明されていないが、中枢神経において、抑制性神経伝達を担う GABAA 受容体の作用を増強することにより効果を発揮するという説が最も有力である。GABAA 受容体は Cl⁻イオンのイオンチャネル型受容体であり、GABA の結合によりチャネルが開くことで細胞外から細胞内へ Cl⁻イオンが流入し、細胞の興奮を抑制する。電気生理学的手法 (パッチクランプ) を用いた研究により、全身麻酔薬はこの作用を増強して神経細胞を過分極させることが示されている。その結果、中枢神経系全体の神経伝達が抑制され、意識消失をもたらされると考えられている。

GABAA 受容体を介した抑制性電流には、Phasic 電流と Tonic 電流が存在する。Phasic 電流は、シナプス小胞に存在する GABA がシナプス間隙に放出され、シナプス後膜に存在する受容体に結合することによって発生する一過性の電流で、Tonic 電流は、シナプス外に漏出してきた低濃度の GABA が、シナプス外に存在する GABA に非常に高い親和性を持つ GABAA 受容体に結合することで、持続的に発生する電流である。電気生理学的手法による記録では Phasic 電流は短時間のスパイクとして記録され、Tonic 電流は基線の

変化として記録される。

近年 Tonic 電流は麻酔のメカニズム研究で非常に注目されている。例えば、海馬錐体細胞では、静脈麻酔薬プロポフォールは Phasic 電流、Tonic 電流をともに増強するが、Tonic 電流のほうが 30 倍以上も増強されるなど、麻酔作用メカニズムに重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

GABAA 受容体は 5 つのサブユニットからなる五量体であり、これまでに、 $\alpha 1\sim 6$ 、 $\beta 1\sim 3$ 、 $\gamma 1\sim 3$ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 κ 、 λ 、 μ 、 ν 、 ξ 、 \omicron 、 π 、 $\rho 1\sim 3$ の 19 種類のサブユニットが確認されている。これらのサブユニットは、脳内の決まった部位に多く発現することで、特定の機能に強く関与する。例えば、 $\alpha 1$ サブユニットは脳内に広く分布して鎮静に関与するが、 $\alpha 2$ サブユニットは感情を司る扁桃体に強く発現し抗不安作用に強く関与すると考えられている。記憶・学習をつかさどる海馬には脳内の他の部位と比較して、 $\alpha 5$ サブユニットが多く存在することが示され、tonic 電流に関与することが明らかになっている。以上より、GABAA 受容体の $\alpha 5$ サブユニット選択的阻害薬は、記憶障害をもたらす薬剤や病態に対して有効な治療薬となる可能性がある。実際、GABAA 受容体 $\alpha 5$ サブユニット選択的阻害薬である RG1662 は、成人ダウン症患者及びアルツハイマー病患者の認知機能障害に対する治療効果が期待され、すでに治験が行われている。

毎年多くの人々が全身麻酔を受けているにも関わらず、麻酔薬による認知機能障害発症のメカニズムについて詳細な検討はされておらず、これらを検証することの意義は非常に大きい。吸入麻酔薬による記憶障害に対して GABAA 受容体 $\alpha 5$ サブユニット選択的阻害薬の有用性が示唆される先行研究がわずかにあるが、その詳細なメカニズムについての検討は行われていない。

認知機能障害は周術期合併症として非常に

大きな問題となっており、今回の研究がその予防、治療法の開発につながる可能性が示唆される。また、GABAA 受容体 5 サブユニット選択的阻害薬の効果について詳細な研究を行うことによって、全身麻酔後の認知機能障害のみならず、記憶障害をもたらす他の疾患、例えばダウン症やアルツハイマー病などのメカニズム解明や治療法の開発にもつながる可能性がある。

2. 研究の目的

麻酔薬が海馬の神経細胞に及ぼす影響を調べることにより、麻酔薬により発生する認知機能低下のメカニズム解明につながるのではないかと考えられる。記憶に密に関与する海馬では GABAA 受容体 5 サブユニットが多く存在し、様々な麻酔薬が GABAA 受容体に作用することから、全身麻酔後にみられる認知障害の発症メカニズムに、海馬における GABAA 受容体 5 サブユニットを介する抑制性電流が関与しており、5 サブユニット選択的阻害薬が麻酔後の認知障害発症の予防ないし治療に有用であるという仮説を検証することを目的とした。具体的には、海馬スライスを用いたパッチクランプ法で、麻酔薬が海馬の GABA 電流を増強する効果を調べた。また、麻酔薬による GABA 電流への影響に対して 5 サブユニット選択的阻害薬がどのような効果を示すかを検証した。

3. 研究の方法

8 週齢のオス C57BC6 マウスを CO の過剰投与にて安楽死させたのち、断頭して海馬を摘出し、250 μm の厚さで海馬スライスを作成した。これを人工脳脊髄液 (ACSF) で灌流した状態で、顕微鏡下に CA3 領域の錐体細胞に対してホールセルパッチクランプ (voltage clamp) を行い、細胞電流を記録した。固定電位は 0mV とした。また、電位依存性 Na チャネル及びグリシン受容体の影響を除外する目的で、灌

流液中に Na チャネルブロッカーであるテトロドトキシン (0.5 μM) 及びグリシン受容体阻害薬であるストリキニン (2 μM) を加えた。ベースラインの記録を行った後、灌流液にミダゾラム (0.2 μM) を加え一定時間灌流を行った後、再度電流を記録した。薬剤投与前後での基線の変化を Tonic 電流として検証し、最終的には GABAA 受容体の antagonist であるピククリン (20 μM) を投与することで、ブロックされた電流の Amplitude を測定し比較検討した。また、ミダゾラム暴露後に L-655708 (50nM) を含む灌流液を投与して電流変化を測定した。

4. 研究成果

ミダゾラム (20 μM) 投与により、10 ~ 20pA の基線上昇がみられ、ミダゾラムの Tonic 電流増強効果が示された。GABAA 受容体 5 サブユニット阻害薬である L-655708 (50nM) を投与したところ、Tonic 電流の減少がみられた。すなわち、海馬神経細胞において L-655708 はミダゾラムの Tonic 電流増強効果に拮抗する作用を持つことが示された。これにより、GABAA 受容体 5 サブユニット選択的阻害薬が麻酔後の認知障害発症の治療に有用であるという可能性が示唆された。

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 0 件)

なし

[学会発表](計 0 件)

なし

[図書](計 0 件)

なし

[産業財産権]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井浦 晃 (Iura Akira)

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40467551