

令和元年5月31日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20062

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬によるPer2発現抑制機構の解明-ICU症候群の機構解明を志向して-

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying the suppressive effect of sevoflurane on the clock gene Per2 expression.

研究代表者

肥後 心平 (Higo, Shimpei)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50623922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔を用いた手術後には睡眠覚醒リズム障害などが生じる。これは、視床下部で概日リズムを作っている遺伝子Per2の発現量が麻酔により変化するためであると考えられる。このPer2発現変化の機構を明らかにすることを研究目的とした。本研究により、全身麻酔薬セボフルランによるPer2発現変動は、抑制性の神経伝達物質GABAによるシグナル伝達に関わっていることを明らかにした。また、より安定した実験手法を確立するため、Per2発現に応じたルシフェラーゼレポーターをもつ視床下部由来不死化細胞株の樹立・細胞株を用いた観測系を作り、今後の生化学的解析に向けた基盤づくりを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術後に見られるリズム障害・せん妄等はICU症候群・集中治療後症候群と呼ばれ、術後の予後に重要である。ICU症候群は多種の原因による複合的な症状であるが、睡眠覚醒リズム障害に関しては麻酔の副作用が原因のひとつとして挙げられる。麻酔がリズム障害の原因となる機序は明らかではなかったが、本研究により、視床下部の視交叉上核における時計遺伝子の発現がGABA性の神経シグナル伝達を介して抑制されていることが明らかとなり、ICU症候群予防法の樹立につながる事が期待される。また、気相分子が神経細胞に及ぼす影響を観測するための系を作ったことにより、将来的な基礎研究につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Surgery under general anesthesia often cause a set of symptoms including sleep and other circadian rhythm disturbances. Our previous studies indicate these rhythm disturbances are caused by the suppression of the expression of a clock gene Per2 in the hypothalamus. The aim of this study is to clarify the molecular mechanisms underlying the suppression.

We showed sevoflurane, a commonly used anesthetic, inhibits Per2 expression via GABAergic signal transduction in the suprachiasmatic nucleus, the circadian rhythm center in the hypothalamus. We also established an in vitro experimental system using a cell line to investigate the detailed mechanisms underlying anesthetic action. This system could be used for the investigation of the effects of other volatile substances on cultured cells. Our experimental system will become a platform for further investigation of the effect of anesthetics on the expression of clock genes.

研究分野：神経科学

キーワード：全身麻酔 時計遺伝子 セボフルラン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔は手術に不可欠なものであるが、術後の睡眠覚醒障害・せん妄を始めとする ICU 症候群の一因となりうると考えられている。しかし、その分子機構に関する報告は少ない。近年、概日リズムを司る時計遺伝子が術後の睡眠覚醒障害・気分障害に関与するという報告があり、また我々の研究から全身麻酔薬セボフルランがマウスの脳で時計遺伝子 Per2 の発現を抑制することがわかってきた。さらに睡眠覚醒リズム障害の詳細に迫るために概日リズムを司る視床下部視交叉上核に着目して調査したところ、セボフルランがマウス・ラットで視交叉上核の Per2 発現を可逆的に抑制・発現周期の位相変化を引き起こし、それに伴い個体の行動リズムも変化すること（これは人間の術後睡眠覚醒障害に相当すると考えられる）、単離した視交叉上核の培養切片でも Per2 抑制作用は観察されるため、セボフルランは他の神経核からの入力・血中ホルモン濃度などを介さず、視交叉上核へ直接作用すること、Per2 抑制効果は Per2 プロモータ領域のヒストンアセチル化の抑制によることなどを明らかにしてきた。

セボフルランによる Per2 の発現抑制に関しては部分的な分子機構を明らかにしつつある。これらの結果はマウス・ラットの個体を使用するか、または個体から単離摘出した視交叉上核を用いた ex vivo の実験系で行ってきたが、さらに詳細な薬理学・生化学的解析を試みるためには、より安定した in vitro の実験系の確立が必要な状況である。

2. 研究の目的

上記のように、セボフルランによる時計遺伝子 Per2 の発現制御の分子機構の解明は部分的なものであるため、さらに詳細な分子機構の描像を得るにはセボフルランがどのような細胞内シグナル伝達機構を介して視交叉上核の影響を与えているか、薬理的・生化学的解析を必要とする。このため、本研究の目的は、不死化細胞株を用いた Per2 発現 in vitro 観測系の確立、および確立した実験系を用いて、セボフルラン投与から Per2 発現抑制に至るまでの細胞内シグナル伝達経路を、薬理学実験・生化学実験により明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 不死化培養細胞を試料としたルシフェラーゼ発光の経時的観測系の確立

実験系の確立には、培養細胞を長期間培養しつつ、リアルタイムで Per2 発現の増減を確認することを可能にする必要がある。このため、Per2 プロモーター下にルシフェラーゼをレポーターとして組み込んだ不死化細胞の安定発現株を作成し、長期培養条件下で経時的にルシフェラーゼ発光を測定する機器の作成、の2点を作成する。ルシフェラーゼ発光の検出には暗箱内での高感度 CCD カメラ、もしくはフォトンカウンターを用いる。また、セボフルランは気相麻酔薬であるため、気相薬剤を培養細胞に負荷するための気化器・エアフローコントローラを組み込む。

(2) 不死化細胞株のセボフルラン応答性の確認

培養細胞は、株によって遺伝子発現が異なるため、安定発現株を作成した後にその細胞株が、およそ 24 時間の時計遺伝子発現周期を持っている点、マウス・ラットの視交叉上核における反応と同様にセボフルランにより Per2 抑制がなされる点を確認されない限り、良い in vitro モデルとならない。そのため、複数の視床下部神経細胞由来の不死化細胞株で安定発現株を作成し、良いモデルとなる細胞株を選定する。

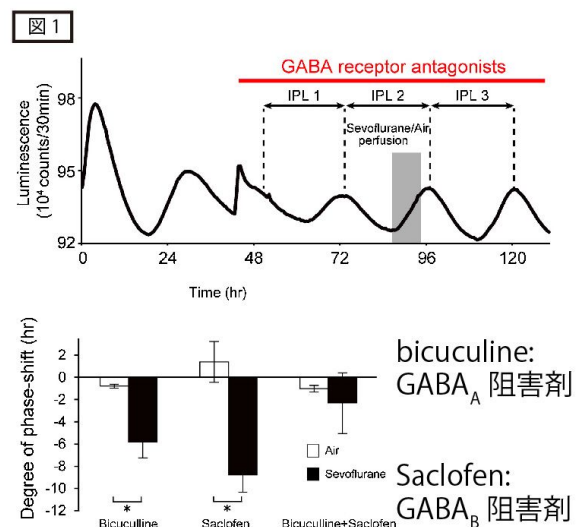
(3) 薬理学・生化学実験

薬理的・生化学的な実験を行うために、セボフルランを気相投与しつつルシフェラーゼ発光を計量する実験系を作成し、シグナル伝達経路の阻害剤を同時投与した際の Per2-ルシフェラーゼ発光の抑制を観測し、セボフルランの投与から発現抑制に至るシグナル伝達経路を同定する。

4. 研究成果

(1) セボフルランの Per2 抑制作用における GABA 受容体の関与

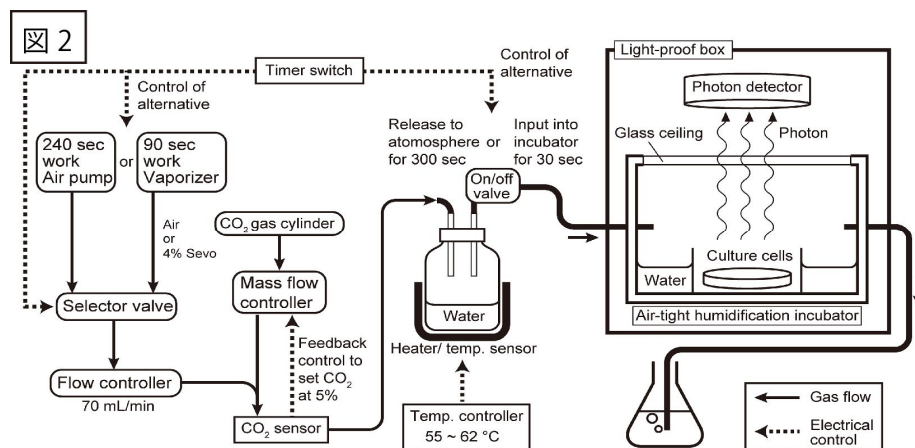
培養細胞を用いた実験系の確立に先立ち、Per2 プロモーター下にルシフェラーゼを発現するトランスジェニックラットを用い、セボフルランの気相投与が行えるか確認を行った。また、研究対象とする視交叉上核の神経細胞が GABA 作動性が主であり、視交叉上核内の相互投射によって時計遺伝子発現の周期が維持させられていることから GABA 性シグナル伝達がセボフルランによる発現抑制に関わる可能性があると考え、培養細胞での薬理実験に先立って、単離した視交叉上核急性スライスを用いた GABA 阻害実験を行った。GABA 性のシグナル伝達にはイオンチャンネル型の GABA_A 受



容体・代謝型の GABAB 受容体の 2 種類が存在するが、両受容体の阻害剤を同時投与した際にセボフルランによる Per2 発現抑制・発現周期の位相変化が完全に消失すること、またどちらかの阻害剤の単独投与では完全には抑制効果・発現周期の位相変化が消失しないことが示された(図 1 研究成果・雑誌論文)。この結果より、セボフルランの作用は GABA 性のシグナル伝達が関与しており、またその作用発現には 2 種類両方の GABA 受容体が必要であることが示唆された。

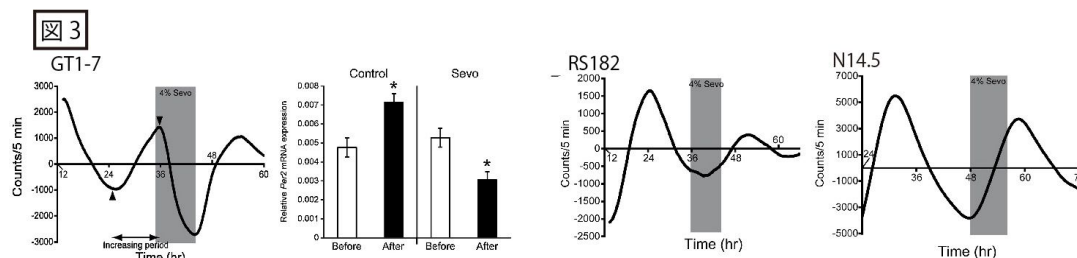
(2) 不死化培養細胞を試料としたルシフェラーゼ発光の経時的観測系の確立

麻醉気化器、エアフローコントローラ、細胞培養装置、フォトンカウンター等を組み合わせて、ルシフェラーゼ発光の経時的観測系を作成した。観測系の概略図を図 2 に示す(研究成果・雑誌論文)。本研究で作成したこの実験系は、本実験では気化麻醉薬の投与を行ったが、広く気相薬剤を培養細胞に投与できる系であるため、今まであまり行われてこなかった気相薬剤の培養細胞実験系に広く応用できるものと考えられる



(3) 不死化細胞株のセボフルラン応答性の確認

本研究では、マウス視床下部由来の細胞である GT1-7 細胞、同じく視床下部視交叉上核由来の細胞である N14.5 細胞株、ラット視交叉上核由来の細胞株である RS182 細胞の 3 つの不死化細胞株をもとに安定発現株の作成を行った。これらを上記で作成した実験系を用いてセボフルラン投与実験を行った結果、GT1-7 細胞で単離した視交叉上核と同様の Per2 発現抑制が確認され、GT1-7 細胞が麻醉による時計遺伝子発現抑制に有用な培養細胞モデルとして使用可能であることがわかった(図 3 研究成果・雑誌論文)。しかしながら、視交叉上核由来の細胞である N14.5, RS182 細胞ではこの発現抑制は確認されなかったため(図 3)、不死化細胞株になる際に大きく遺伝子発現の制御様式が変わっていることが示唆される。



(4) 吸入麻醉薬 Sevoflurane による脳内賦活ニューロンの局在探索

2017 年度より上記で作成した実験系の計測部の不具合で観測値のばらつきが生じたため、その修復・改善と並行して、セボフルランの投与が惹起する神経活性領域の全脳マッピングを副課題として設定し研究を推進することとした。これは、いままで研究標的を視交叉上核に絞って詳細な解析を行ってきた一方で、広範な脳領域におけるセボフルランの影響を記述したデータが不足していたためであり、セボフルラン応答性能領域の同定後に視交叉上核に加えてそれらの領域の遺伝子発現を詳細解析するための足がかりの研究であると言える。神経興奮性マーカーとして c-Fos を用い、30 分・1 時間のセボフルラン負荷を行ったラットの全脳で神経賦活領域を同定した。嗅覚系の伝導路に關与するカジェハ島を中心に、内側手綱核や台形核等、複数のセボフルラン応答神経核を同定して学会発表を行った(学会発表)。セボフルラン麻醉負荷による神経賦活化部位の同定はこれまで行われておらず、今後セボフルランが神経に与える影響を研究する上で良い基礎データとなると期待される。また、c-Fos の発現により明らかになったセボフルラン応答神経核には、これまで研究対象として用いてきた視床下部視交叉上核は含まれておらず、セボフルランによる Per2 遺伝子発現の抑制様式に関しては、神経の活性化・発火頻度上昇などを伴わないシグナル伝達によるということが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Matsuo I, Iijima N, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Ishii H, Sakamoto A, Ozawa H

“Characterization of sevoflurane effects on Per2 expression using ex vivo bioluminescence imaging of the suprachiasmatic nucleus in transgenic rats”
Neuroscience Research, Volume 107, June 2016, Pages 30-37

査読あり

DOI: 10.1016/j.neures.2015.11.010

Nagamoto S, Iijima N, Ishii H, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Matsuo I, Nakagawa S, Takashima N, Shigeyoshi Y, Sakamoto A, Ozawa H.

“Establishment of an in vitro cell line experimental system for the study of inhalational anesthetic mechanisms”

Neuroscience Letters, Volume 620, 4 May 2016, Pages 163-168

査読あり

DOI: 10.1016/j.neulet.2016.04.005

[学会発表](計 2件)

中川真志, 肥後心平, 石井寛高, 飯島典生, 坂本篤裕, 小澤一史

「c-Fos 発現を指標とした吸入麻酔薬 Sevoflurane による脳内賦活ニューロンの局在探索」
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2018 年

永本盛嗣, 飯島典生, 相川優子, 石井寛高, 肥後心平, 託見健, 安齋めぐみ, 坂本篤裕, 小澤一史

「株化細胞を用いた in vitro 吸入麻酔薬作用解析実験系の確立」

第 42 回日本神経内分泌学会 第 23 回日本行動神経内分泌研究会 合同学術集会, 2015 年

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。