

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K11753

研究課題名(和文) 再生神経細胞の軸索ガイダンスにおける麻酔薬の関与

研究課題名(英文) Involvement of anesthetics in axon guidance of regenerating neurons

研究代表者

富岡 重正 (Tomioka, Shigemasa)

徳島文理大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：70188770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞から分化誘導した再生神経細胞に対して、神経毒性あるいは神経保護効果を持つと報告されている全身麻酔薬がどのように作用するか検討した。現在頻用されている全身麻酔薬プロポフォールは、低濃度では再生神経細胞の神経突起伸長を軽度増強したが、高濃度では抑制した。また、再生神経細胞に圧を負荷すると、神経突起伸長は抑制されたが細胞死には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経再生の臨床応用が活発に進んでいる。臨床において、iPS細胞や組織幹細胞から分化誘導した神経細胞の患者への移植は全身麻酔法下に行われることになり、神経再生医療に麻酔薬の使用は避けられない。そこで、安全な神経再生医療の実現に向けて、再生神経細胞に対する麻酔薬や軸索ガイダンス因子の作用、および移植後の圧負荷環境に対する再生神経細胞の挙動を把握しておくことは極めて重要である

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of general anesthetics, which are reported to have neurotoxic or neuroprotective effects, on regenerating neurons induced from bone marrow mesenchymal stem cells. Propofol, a commonly used general anesthetic, mildly enhanced neurite outgrowth in regenerating neurons at low concentrations, but inhibited it at higher concentrations. Pressure-loaded regenerating neurons showed inhibition of neurite outgrowth but did not lead to cell death.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：神経再生 麻酔薬 軸索ガイダンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経再生の臨床応用が活発に進んでいる。臨床において、iPS 細胞や組織幹細胞から *in vitro* で分化誘導した神経細胞の患者への移植は全身麻酔法下に行われることになり、神経再生医療において全身麻酔薬の使用は避けられない。一方、幼若な神経細胞は、神経突起先端部の成長円錐を軸索誘導(軸索ガイダンス)によって伸長させ、他の神経細胞とシナプス形成をおこなうことによって神経ネットワークを構築し、高次元の神経機能を獲得する。近年、全身麻酔薬は発達期の脳に対して神経毒性を有することが数多くの論文で報告されているが、再生神経細胞を用いた研究は見当たらない。

軸索ガイダンスは、神経系の発生段階において正しい神経回路形成を行うのに重要なプロセスである。この軸索ガイダンスを制御するいくつかの誘引および反発因子が見つまっている。その中で、セマフォリンは軸索伸長を反発する効果を持っており、セマフォリン 3A 阻害薬は脊髄損傷モデルにおける軸索再生促進作用を有することが報告されている。さらに、全身麻酔薬であるプロポフォールを低濃度暴露させると、セマフォリン 3A による成長円錐崩壊作用を改善することが native 神経細胞において報告されているが、再生神経細胞を用いた研究は未だ報告がない。

神経再生医療において、*in vitro* で培養された再生神経細胞を生体に移植することを想定した場合、移植された再生神経細胞は低酸素に暴露されたり、浮腫などによる組織圧を周囲から持続的に受けることになる。一般的に行われている培養実験は無圧状態で行われており、圧負荷条件下での再生神経細胞の動態を観察することは極めて重要である。

2. 研究の目的

神経再生医療が安全に実施されることを目的に、骨髄間葉系幹細胞から分化誘導した再生神経細胞を用いて下記 3 つの基礎研究をおこなった。

- (1) 再生神経細胞に対して、現在頻用されている全身麻酔薬を作用させて形態学的変化を解析する。
- (2) 再生神経細胞に対して、軸索ガイダンス因子であるセマフォリン 3A およびネトリン-1 を作用させた場合の形態学的影響、さらに全身麻酔薬プロポフォールを添加した場合の影響について形態学的に解析する。
- (3) 再生神経細胞に対して、さまざまな圧を負荷させた場合の形態学的変化およびアポトーシス誘導の有無について解析する。

3. 研究の方法

- (1) すべての実験は、我々がすでに確立し論文(Neuro Endocrinol Lett, 2012)にて報告した、マウス骨髄間葉系幹細胞を成長因子などを含む培養液に交換することによって再生神経細胞へと分化誘導する培養実験系を用いて行った。
- (2) 分化誘導した再生神経細胞に対して、全身麻酔薬を添加し、経時的に再生神経細胞の形態学的変化を観察し解析した。全身麻酔薬は、プロポフォール(1~500 μM)、ケタミン(10 μM ~1mM)、ペントバルビタール(10 μM ~1mM)について検討した。
- (3) 分化誘導した再生神経細胞に対して、軸索ガイダンス因子であるセマフォリン 3A およびネトリン-1 を添加し形態学的変化を観察した。添加したセマフォリン 3A は 10pM とした。また、ネトリン-1 は 5, 50, 100, 200, 500ng/ml の濃度で添加した。さらに、セマフォリン 3A 10pM、ネトリン-1 200ng/ml に調整した条件下に低濃度プロポフォール(1, 2, 3 μM) を添加し、低濃度プロポフォールの影響についても検討した。
- (4) 分化誘導した再生神経細胞をネッパジーン社灌流培養チャンバーCB200-PM-SS に装着し圧負荷を行い形態学変化を解析した。負荷した圧は 15, 50, 150mmHg とした。また、アポトーシス誘導の解析は、Caspase-3/7 Apoptosis Assay Kit を用いて Caspase-3/7 の発現を蛍光顕微鏡にて観察した。また、圧負荷後には圧を開放し、再び炭酸インキュベーター内で培養を継続し細胞の形態変化についても観察した。
尚、これら再生神経細胞の形態学的変化の解析は、顕微鏡下で写真を撮影した後、その写真を解析ソフト Image J にて計測しおこなった。

4. 研究成果

- (1) 再生神経細胞への全身麻酔薬の作用について
全身麻酔薬であるプロポフォール(1 μM ~500 μM)、ケタミン(10 μM ~1mM)、ペントバルビタール(10 μM ~1mM)の再生神経細胞への作用について調べた。脳保護作用があるとされている低濃度プロポフォール(1~5 μM)は、軽度の神経突起伸長の増強作用が見られたが有意ではなかった。逆に、高濃度のプロポフォール添加では軽度伸長抑制作用が見られた。ケタミン、ペントバルビタールは 100 μM 以下の濃度では有意な神経突起伸長の抑制作用は見られなかったが、100 μM 以上の高濃度では神経突起伸長の抑制が見られた。以上の結果より、臨床で使用さ

れる濃度の全身麻酔薬は分化誘導後の神経細胞の神経突起伸長を抑制しないことが明らかとなった。また、分化誘導後 48 時間、72 時間と長時間作用させたが結果は同様であったことから、作用時間による影響はないと考えられた。

(2) 再生神経細胞に対する軸索ガイダンス因子の作用および全身麻酔薬プロポフォールの影響について

軸索ガイダンス因子(セマフォリン 3A, ネットリン-1)の再生神経細胞に対する作用について検討した。その結果、10pM 濃度以上のセマフォリン 3A は、分化誘導後約 5~6 時間後に神経細胞の神経突起および成長円錐の形態を崩壊させる像が観察された。ネットリン-1 を 200ng/ml の濃度で添加したところ、神経突起の伸長には影響を及ぼさなかったが神経突起の分枝数がやや増加する傾向が見られた。

これら軸索ガイダンス因子の作用に対して全身麻酔薬プロポフォールの影響について検討した。全身麻酔薬プロポフォールは高濃度では神経突起抑制作用が認められたため、低濃度 1~5 μM にて検討した。その結果、10pM のセマフォリン 3A 存在下に 5 μM 濃度のプロポフォールを添加すると、崩壊の進行は止まりやや改善する傾向が認められた(図 1)。また、ネットリン-1 存在下に低濃度プロポフォールを添加しても影響は見られなかった。

セマフォリンは代表的な反発性軸索ガイダンス因子で、神経軸索の伸長を制御している。セマフォリン 3A 阻害薬は脊髄損傷の軸索再生促進作用があり、低濃度プロポフォールはセマフォリン 3A の軸索崩壊を改善すると報告されているが、本研究でも軽度であるがセマフォリン 3A の抑制作用を改善させた。一方、神経軸索の誘因または反発作用を有するとされている軸索ガイダンス因子のネットリン-1 は、神経突起の伸長には影響はなく神経突起の分枝数を増加させたが、プロポフォールはこれらに影響を及ぼさなかった。

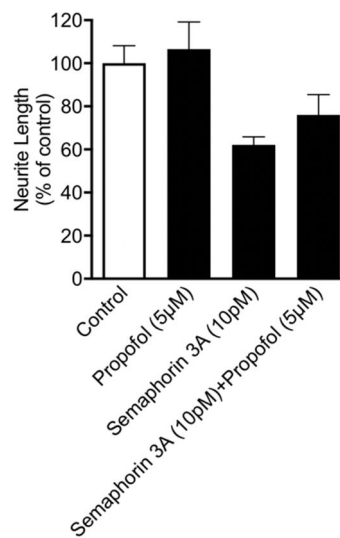


図1 PropofolとSemaphorin 3Aの作用

(3) 再生神経細胞への圧負荷の影響について

分化誘導した再生神経細胞をネッパジーン社灌流培養チャンバーCB200-PM-SS に装着し圧負荷を行った。負荷した圧は 15, 50, 150mmHg とした。15mmHg の圧を負荷しても再生神経細胞体の膨張は見られず、神経突起の伸長にも影響は見られなかった。50mmHg の圧負荷では、再生神経細胞体の面積は約 20~50%膨張し、神経突起の伸長も軽度抑制された。150mmHg の圧負荷では、再生神経細胞体の面積は約 2 倍 (220%) まで膨張し、神経突起の伸長はほぼ完全に抑制された。成長円錐および再生神経細胞同士のシナプス形成もほぼ消失した(図 2)。また、その後再生神経細胞を圧負荷状態から無圧状態に開放し培養を継続したが、神経突起は軽度伸長するも圧負荷前の状態に戻ることはなかった。さらに、この圧負荷による再生神経細胞の反応にアポトーシスが関与しているか否かを Caspase-3/7 Apoptosis Assay Kit を用いて検討した結果、Caspase-3/7 の発現は見られなかった。

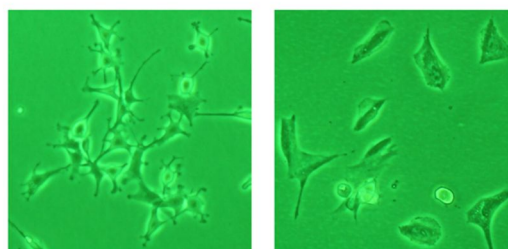


図 2. 圧負荷による形態学的変化

これらの結果より、再生神経細胞に強い圧を負荷することによって、神経突起伸長抑制、細胞体の膨張等が見られるもののアポトーシスによる細胞死が生じることはないことが明らかとなった。つまり、神経再生医療において、移植した神経細胞に組織圧などの圧が負荷された場合、神経細胞の成長が抑制されることがあっても細胞死に至る可能性は低いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	里村 一人 (Satomura Kazuhito) (80243715)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究分担者	館原 誠晃 (Tatehara Seiko) (90380089)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関