

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20116

研究課題名(和文) iPS細胞を基盤とした麻酔薬の神経毒性誘発機構の基礎的解明

研究課題名(英文) Basic study of neurotoxicity mechanism of anesthetics based on iPS cells

研究代表者

千々岩 みゆき (Chijiwa, Miyuki)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：80407080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではiPS細胞を使う事で、ヒトの神経細胞における麻酔薬の神経毒性誘発機構を解明することを目的とした。iPS細胞から誘導した神経細胞にケタミンを暴露させた後、フラックスアナライザーを用いてミトコンドリアの機能解析を行った。その結果、Basal RespirationとATP Productionが減少した。このことからケタミンはiPS細胞から誘導した神経細胞のミトコンドリアの機能を低下させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康者、アルツハイマー患者由来のiPS細胞から誘導した神経細胞に対する麻酔薬の影響を検証できた事で、動物レベルで報告のある神経毒性の機序をヒトの細胞で、非疾患と疾患の比較検証が可能となった。麻酔薬の安全性をより高めることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanism mechanism of anesthetics in human neurons by using iPS cells. Neurons derived from iPS cells were exposed to ketamine, and then mitochondrial functional analysis was performed using a flux analyzer. Therefore, basal respiration and ATP production decreased. This indicates that ketamine reduces the mitochondrial function of neurons derived from iPS cells.

研究分野：麻酔科

キーワード：麻酔学 iPS 神経毒性

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

1. 研究開始当初の背景

麻酔薬は神経保護作用があるといわれる一方、麻酔薬に長時間暴露されることによる神経毒性については議論がある。麻酔薬の神経毒性は、健常者にも起こりうる可能性もあるが、吸入麻酔薬であるイソフルランがアルツハイマー病様の变化を引き起こす可能性や、アルツハイマー病の病態を悪化させる可能性が動物レベルで示唆されているがいまだそのメカニズムは明らかではない。ヒトでは個人の病態など、背景が多様である為、正確な判定が困難であるが、iPS細胞を使う事で、ヒトの神経細胞における麻酔薬の神経毒性誘発機構の解明が可能となる。

ケタミンはNMDA受容体のアンタゴニストとして作用するが、プロポフォール等はGABA受容体に作用する。GABAは成熟脳では抑制性であるのに対し、幼弱脳では興奮性である。そのため、発達期においてはGABA作動性麻酔薬の影響があるのではないかと想像できる。吸入麻酔薬による細胞毒性の機序の一つに小胞体は細胞外から細胞質へのCa²⁺流入が挙げられる。ミトコンドリアには細胞質のCa²⁺濃度を安定させる役割があり、細胞質内のCa²⁺濃度の上昇が続くとミトコンドリアの呼吸鎖のアンカップリングを起こしてATP産生を低下させ、ミトコンドリア自身に障害をもたらすことが示唆されている。

2. 研究の目的

ケタミンは数多くの動物実験データから、幼弱脳への神経毒性がある事が明らかになっている。iPS細胞から誘導した神経細胞へのケタミンの神経毒性について、ミトコンドリアの機能障害とオートファジーがミトコンドリアの電子伝達系を阻害する可能性を示す報告がある。遺伝子的に神経疾患を持つiPS細胞からの誘導神経細胞では、その神経毒性に相違があるのかを検証したい。

3. 研究の方法

健常者(H群)アルツハイマー患者由来(A群)の樹立されたiPS細胞(各2株以上)から神経細胞への誘導方法を確立し、安定発現した細胞株を複数得た。

誘導した神経細胞に静脈麻酔薬のケタミン(0, 20, 100 μM)を加えて、24時間後にミトコンドリア機能を細胞外フラックスアナライザーで解析した。解析方法はミトストレステストであり、まずBasal Respirationを測定後、

OligomycinでミトコンドリアのComplex IVを阻害することでATP産生を妨げ、次に脱共役剤であるFCCPによってミトコンドリアの最大呼吸能を測定、最後にRotenoneとAntimycin Aによって全てのComplexを阻害することでミトコンドリアの機能を停止した。フラックスアナライザー assay 後、プレートの各wellの細胞をヘキスト染色し、細胞数をカウントした。細胞数でnormalizeした後に解析を行った。

麻酔薬の影響の有無と健常者とアルツハイマー患者由来の神経細胞を比較検討した。

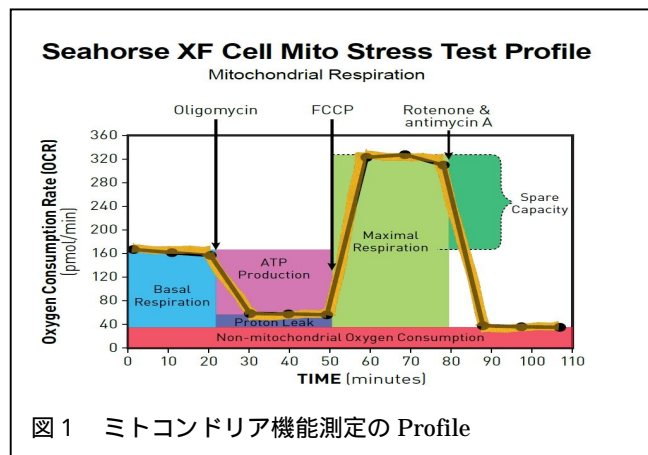


図1 ミトコンドリア機能測定のプロファイル

4. 研究成果

健常者由来を1株(H-1)、アルツハイマー患者由来を2株(A-1, A-2)を使ったミトコンドリアの機能解析結果を図2に示した。

図2の結果より、Basal Respiration等の数値を計算した結果を図3に示した。A-1, A-2に比べるとH-1はBasalおよびATP Productionが高かった。健常者由来iPS細胞から誘導した神経細胞のミトコンドリア機能はアルツハイマー患者由来のiPS細胞から誘導した神経細胞に比べるとBasalの呼吸速度が早く、またATP産生能力も高いことが示された。

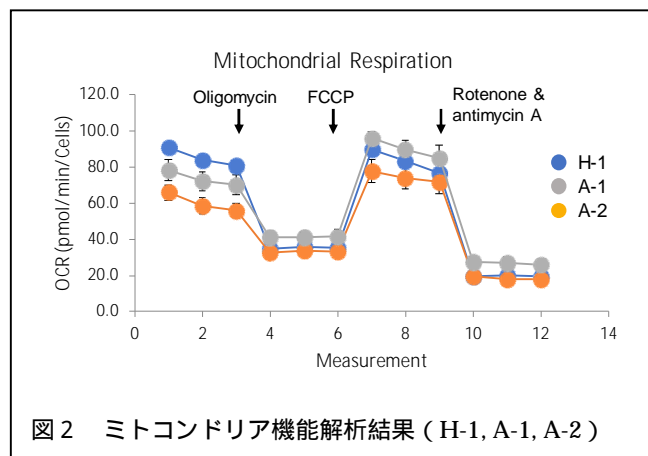
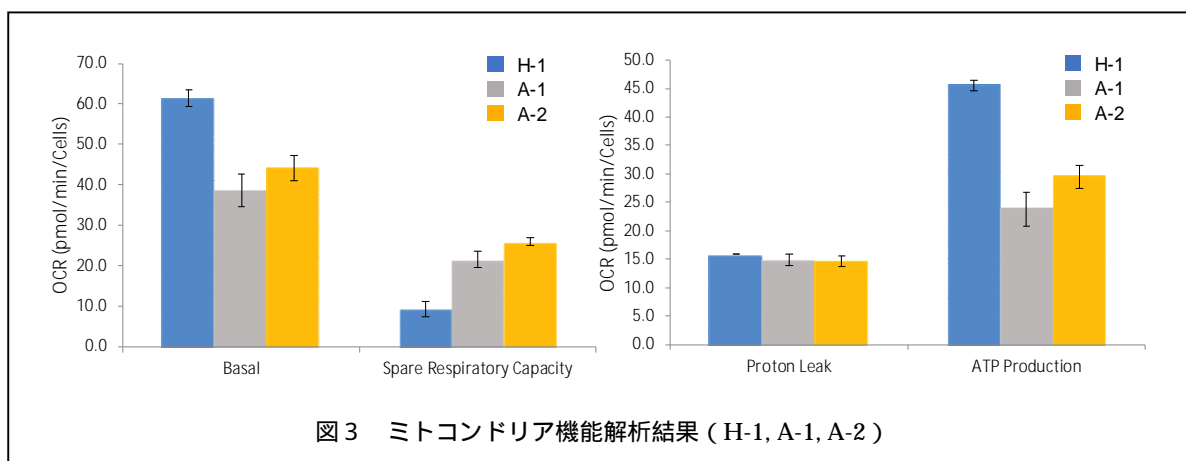
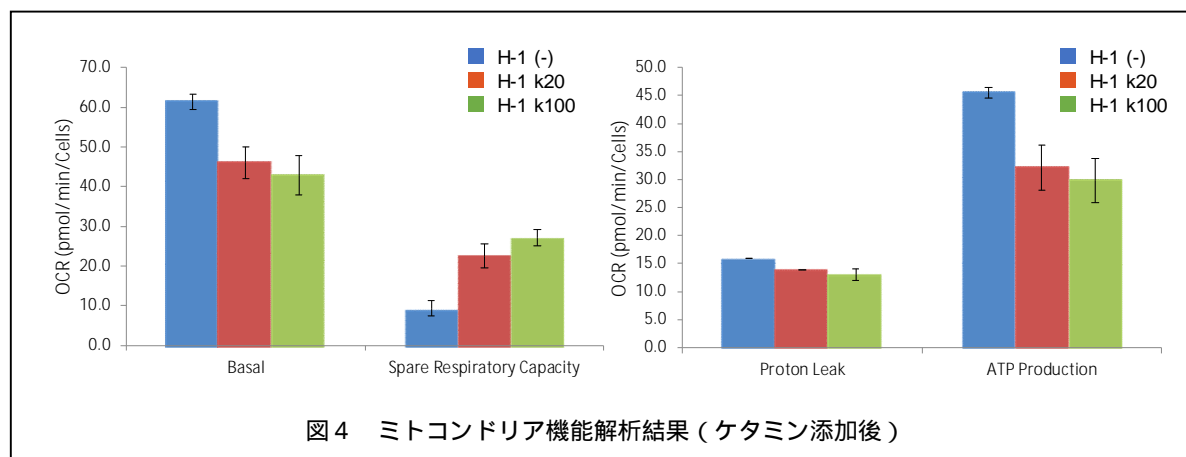


図2 ミトコンドリア機能解析結果 (H-1, A-1, A-2)



次に健常者由来 iPS 細胞から誘導した神経細胞をケタミン (0,20, 100 μ M)を加えた後のミトコンドリアの機能解析結果を図4に示した。加えたケタミンの濃度依存的に Basal および ATP Production が低くなった。iPS 細胞から誘導した神経細胞はケタミンによって機能障害を起していることが示された。今後、機能障害の機序についてさらなる検討が必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Shimizu H, Shimoda M, Mochizuki S, Miyamae Y, Abe H, Chijiwa M, Yoshida H, Shiozawa J, Ishijima M, Kaneko K, Kanaji A, Nakamura M, Toyama Y, Okada Y.: Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Is Up-Regulated and Involved in Hyaluronan Degradation in Human Osteoarthritic Cartilage. **Am J Pathol.** 188(9):2109-2119 (2018). 査読有

Ishida Y, Fujita H, Aratani S, Chijiwa M, Taniguchi N, Yokota M, Ogihara Y, Uoshima N, Nagashima F, Uchino H, Nakajima T.: The NRF2-PGC-1 β pathway activates kynurenine aminotransferase 4 via attenuation of an E3 ubiquitin ligase, synoviolin, in a cecal ligation/perforation-induced septic mouse model. **Mol Med Rep.** 18(2):2467-2475(2018). 査読有

Ueno M, Shiomi T, Mochizuki S, Chijiwa M, Shimoda M, Kanai Y, Kataoka F, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D, Okada Y: ADAM9 is over-expressed in human ovarian clear cell

carcinomas and suppresses cisplatin-induced cell death. **Cancer Sci.** 109(2):471-482(2018).

査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。