

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20380

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来の培養細胞を用いたプロポフォール注入症候群の機序の解明

研究課題名(英文) Cytotoxicity caused by long-term propofol treatment in human induced pluripotent stem cell-derived cell lines

研究代表者

伊藤 裕之 (ITO, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80595554

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)：ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞にプロポフォールが長時間作用した場合の影響を検討した。プロポフォール50 µg/mlを48時間作用させると、NAD<sup>+</sup>/NADH比は40.1%、ATPは17.9%、生細胞プロテアーゼ活性は15.9%低下し、カスパーゼ3/7活性は24.0%上昇した。電子顕微鏡所見では、プロポフォール50 µg/ml群でミトコンドリア分裂像やそれらを貪食するようなオートファゴソーム像、細胞質内の空胞化を認めた。ヒト神経細胞において、プロポフォールの高濃度かつ長時間の曝露により、電子伝達系の抑制によるミトコンドリア機能障害およびアポトーシスによる細胞毒性が誘起されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cultured human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived neurons was used to study the toxic effects of propofol on human neurons. Human iPS cell-derived neural stem cells were cultured for 14 days and differentiated into neurons. These neurons were exposed to propofol for 48 hours. Propofol at 10 µg/ml reduced NAD/NADH ratio by 24.6 %, cell viability by 12.3%, and caspase 3/7 activity was increased by 20.3%. Higher concentration of propofol (50 µg/ml) caused further reduction in ATP level (17.9%), NAD/NADH ratio (40.1 %) and cell viability (15.9%), whereas augmentation in caspase 3/7 activity by 24.0%. Transmission electron microscopy showed autophagosomes, fragmented mitochondria, and many vacuoles in the cytoplasm at 50 µg/ml. Propofol dose-dependently reduced cell viability in cultured neuron at the range above clinical plasma concentration. Inhibitory effect on electron transport might reduce ATP production, which might result in the mitochondrial dysfunction.

研究分野：麻酔科学

キーワード：プロポフォール 毒性 ヒト人工多能性幹細胞 神経細胞

### 1. 研究開始当初の背景

プロポフォール注入症候群はプロポフォールの高用量長時間投与により誘発される致死的合併症であり、心筋・肝臓・筋組織が障害を受ける。この合併症への懸念から、小児への使用など、適応には制限が生じているが、日本集中治療医学会小児集中治療委員会が2014年に行ったアンケート調査では、回答のあった102施設のうち、20施設で小児に対する持続鎮静を行っており、うち11施設では、プロポフォール注入症候群を経験している。この症候群の発生機序は、必ずしも明らかにされていないが、発症した症例の報告からは、ステロイドの投与・炭水化物の不足・カテコラミン投与や全身性炎症が、増悪因子として考えられている。一方、我々の研究グループでは、近年麻酔薬の毒性についてヒトiPS細胞由来の細胞を用いたアッセイ系を構築し、研究を進めている。プロポフォール注入症候群を想定した実験系では、高濃度(50µg/mL)のプロポフォールに曝露した場合には、ヒトiPS細胞から分化させた神経細胞において、ミトコンドリア電位の低下とそれに伴うATPの産生が減少することが観察された。そこで我々は、このように、ヒトiPS細胞由来の神経細胞に高濃度のプロポフォールを長時間作用させる実験系により、プロポフォール注入症候群のメカニズムについて検討できるのではないかと考えた

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトiPS細胞由来の神経幹細胞、を用いたプロポフォールの毒性評価を行うin vitroモデルを作製し、プロポフォールの毒性を明らかにするためのアッセイ系確立を目指す。研究目的を以下に示す

(1) ヒトiPS細胞由来の神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞に対して、濃度依存性に起こるプロポフォールの毒性について、ApoToxGlo Assay kit、Mitochondrial ToxGlo Assay、NAD・NADH Glo assay、ROS-Glo Assay kitを用いた定量により、検討を行う。(2) 毒性が発揮された濃度について、神経幹細胞における細胞の形態および機能的変化について、免疫細胞化学および電子顕微鏡による検討を行う。

### 3. 研究の方法

ヒトiPS細胞由来の凍結神経幹細胞を融解し96ウェルプレートに10000cell/wellの密度で播種し、分化誘導培地を用いて14日かけてドパミン作動性ニューロンに分化させたのち、定められた濃度のプロポフォールを含む培地により培養を行い、次に示す実験を行った。ドパミン作動性ニューロンへの分化培地はリプロセルより購入した。

- (1) 細胞死の検出：生細胞プロテアーゼの定量により、生細胞・死細胞の割合について、定量的な検討を行った。
- (2) アポトーシスの検出：ApoToxGlo Assay kitを用いて、Caspase-3/7活性を測定(Cell Event)した。
- (3) ミトコンドリア機能評価：Mitochondrial ToxGlo Assayにより、プロポフォールの濃度依存性の毒性が、ミトコンドリア機能に依存するかどうかを検討した。関連するパラメーターとして、NAD<sup>+</sup>/NADH比をNAD・NADH Glo assayを用いて検討し、ミトコンドリア膜電位についてはMitoTrackerによる染色から定量を行った。
- (4) ROS-Glo Assayを用いた活性酸素種産生の検討：プロポフォールによる処置後、ROS-Glo Assay kitによる処置を行い、GloMax 発光プレートリーダーにより、活性酸素種の産生を定量した。
- (5) 電子顕微鏡標本作製し、細胞小器官の形態の比較を行った。

ApoToxGlo Assay kit、Mitochondrial ToxGlo Assay、NAD・NADH Glo assay、ROS-Glo Assay kitにおいては、Glomax Microplate Multimode Reader (Promega)を用いて、発行及び定められた波長を用いた系高強度測定が行われた。

### 4. 研究成果

- (1) ヒトiPSC由来神経幹細胞の神経細胞への分化

リプロニューロは、培養開始後1日より突起の伸長が始まり、7日~14日でネットワーク形成が起こる。本研究における観察でも、同様の携帯が観察された。さらに、培養開始後7日および14日におけるIII チュブリン(神経細胞マーカー)及びダブルコルチン(幼若神経細胞のマーカー)の発現を調べたところ、いずれも培養7日後から発現が認められ、培養14日後の検討では、3 Tubulinは91.3±1.2%で発現し、さらにこのなかで、ダブルコルチンは92.9±1.8%で発現していた。また、最終分化した神経細胞のうち30-40%がドパミン作動性神経細胞のマーカーであるTyrosine Hydroxylaseを発現していた。(図1)

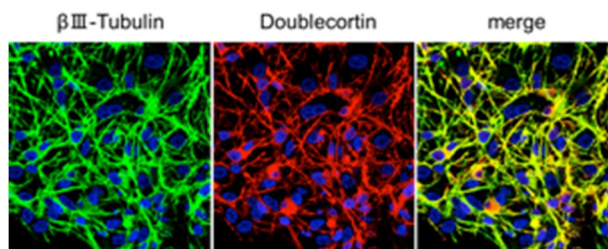


図1 iPS細胞由来培養神経細胞におけるIII チュブリンとダブルコルチンの発現

(2) 幼若神経細胞に対するプロポフォールの影響

Cell Viability: 生細胞プロテアーゼ活性  
 培養14日より、48時間プロポフォール含有培地で培養すると、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度では、生細胞の割合が有意に低下した。(図2)

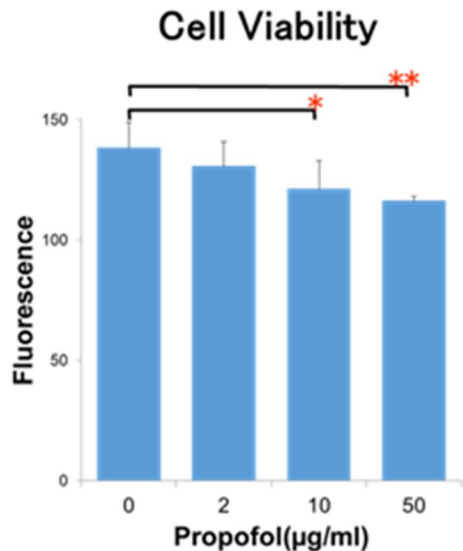


図2 プロポフォール濃度と生細胞マーカー量の変化

Caspase3/7 活性  
 培養14日より、48時間プロポフォール含有培地で培養すると、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度では、Caspase3/7 活性が有意に上昇し、アポトーシスが誘導されていることが示された。(図3)

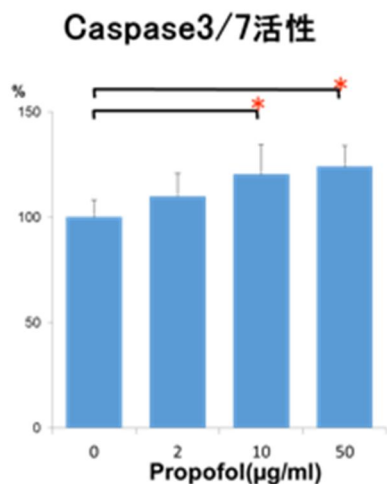


図3 プロポフォール濃度とCaspase3/7 活性の関係

活性酸素種の産生量  
 培養14日より、48時間プロポフォール含有培地で培養した場合でも、活性酸素種の産生量については、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下のプロポフォールでは、有意な影響は認められなかった。む

しろ、高濃度のプロポフォールで、活性酸素種の量が減少する傾向があることが示唆された。(図4)

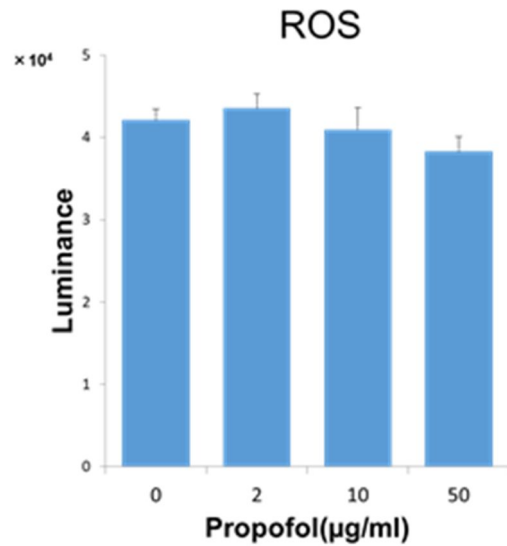


図4 プロポフォール濃度と活性酸素種産生量の関係

(3) ミトコンドリア機能に対するプロポフォールの影響

ATP 産生量  
 培養14日より、48時間プロポフォール含有培地で培養すると、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では、ATP 産生量が有意に低下していた。(図5)

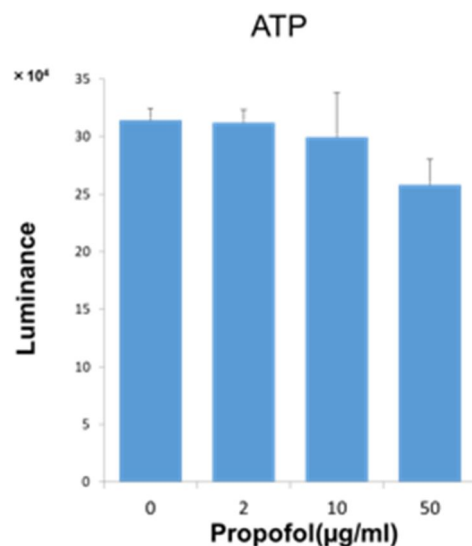


図5 プロポフォールによるATP 産生量の変化

NAD<sup>+</sup>/NADH 比  
 培養14日より、48時間プロポフォール含有培地で培養すると、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度では、NAD<sup>+</sup>/NADH 比が有意に低下した。この結果は、電子伝達系における、ComplexI の機能が低下し、NADH が蓄積し、NAD が減少したことを反

映していると考えられた。(図 6)

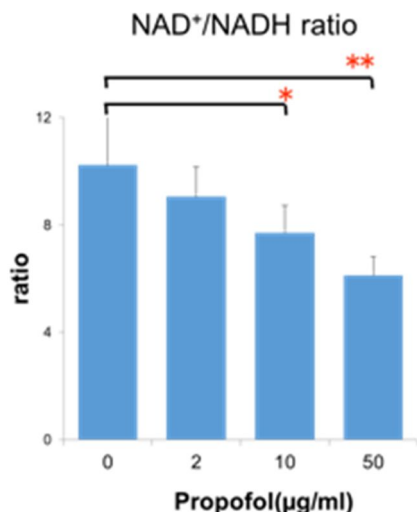


図 6 プロポフォールによる NAD<sup>+</sup>/NADH 比の変化

ミトコンドリア膜電位の定量と形態評価  
培養 14 日より、48 時間プロポフォール含有培地で培養した細胞において、Mitotracker による染色によりミトコンドリア膜電位を定量すると、10 µg/mL 以上の濃度では、NAD<sup>+</sup>/NADH 比が有意に低下した。(図 7)

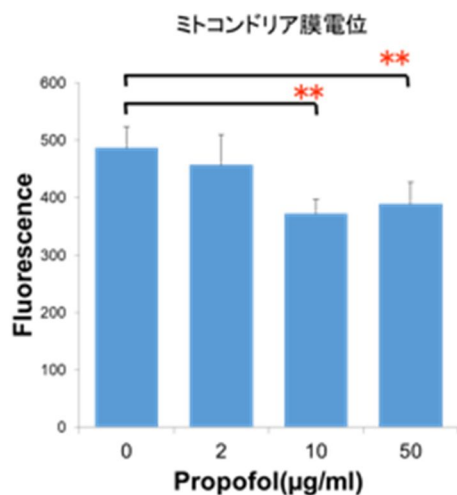


図 7 プロポフォールがミトコンドリア膜で二に及ぼす影響

染色されたミトコンドリアの形態は、プロポフォールが作用していない細胞では、細長い形状を呈していたが、50 µg/mL では、フラグメント化して短縮した形状に変化したものが多くみられた(図 8)。

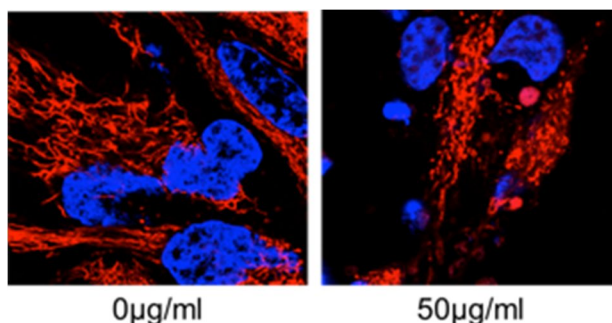


図 8 Mitotracker によるミトコンドリア染色。プロポフォールによるフラグメント化が観察できた。

#### (4) プロポフォール曝露による幼弱神経細胞の微細構造の変化

プロポフォールを作用させていない細胞においてはシナプス様の構造が形成され、内腔構造がはっきりした多数の糸状のミトコンドリアが観察されたが、50 µg/mL では、細胞質内に多数の空胞形成を認め、ミトコンドリアの膨張像、分裂増、および、オートファゴゾームの形成が多数認められた。(図 9)

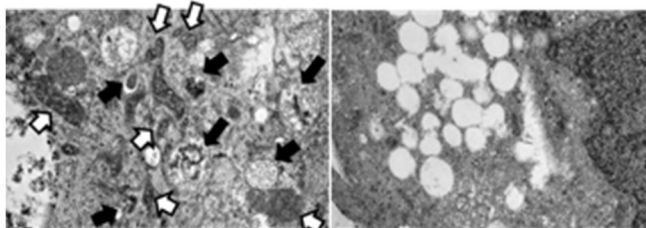


図 9 プロポフォール 50 µg/mL によるミトコンドリアの膨張・分裂像(左写真・白矢印)とオートファゴゾーム(左写真・黒矢印)。右写真では、細胞質内に多数の空胞形成が認められている。

#### (5) 考察

##### ヒト iPSC 由来神経細胞に対するプロポフォールの毒性と評価モデルの確立

本研究では、iPS 細胞から分化誘導を行った結果得られる培養神経細胞を用いて、プロポフォールの毒性に関する検討を行った。細胞は チュブリンやダブルコルチンを効率的に発現しており、幼若神経細胞としての形質を発現していると考えられた。

この細胞に対して、プロポフォールを作用させると、通常の臨床濃度では毒性は発揮されないが、通常の臨床濃度を大きく超える 10 µg/ml 以上の濃度において、アポトーシスの誘導を伴う細胞毒性が誘起された。今回の結果は、先行して行われた、ヒト ES 細胞由来神経細胞の結果と矛盾しない。ES 細胞よりもさらに倫理的制約の低い iPSC 由来の細胞を使用するモデルの確立は、今後の研究に有用であると考えられた。

## プロポフォールによる細胞毒性の機序

今回の結果では、臨床で想定される血中濃度を大きく超えた範囲でプロポフォールが神経細胞に作用すると、ATP の産生が低下し、NAD/NADH 比の低下、ミトコンドリア膜電位の低下、オートファゴゾームの増加やミトコンドリアのフラグメント化が観察された。これらの一連の変化は、プロポフォールによりミトコンドリア機能が傷害され、ATP の産生低下につながっていることや、機能低下に伴い、オートファゴゾーム形成などの変化が起こってきていることを示唆するものである。

今後、この実験系や、ヒト iPS 細胞由来の心筋・肝細胞など様々な細胞に対するプロポフォール長時間・大量曝露の影響を調べることで、プロポフォールの毒性に関するメカニズムの詳細を検討し、毒性回避の解明に迫っていくことができると期待される。

### 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2件)

- ・ 木戸浩司、内田篤治郎、山本雄大、伊藤裕之、榎田浩史. ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞を用いたプロポフォール長時間曝露による毒性評価 ミトコンドリア機能障害およびアポトーシス誘導に関する検討. 日本麻酔科学会第63回学術集会福岡国際会議場 福岡県福岡市 2016年5月26日
- ・ Koji Kido, Hiroyuki Ito, Yudai Yamamoto, Tokujiro Uchida, Koshi Makita. Dose-dependent Cytotoxicity of Propofol in Cultured Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Neurons. Anesthesiology 2016. Chicago, USA. 2016.10.23

〔その他〕

### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 裕之 (ITO, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80595554

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし