

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K16755

研究課題名（和文）脊髄虚血に対する硫化水素の有効性と作用機序の解析

研究課題名（英文）Neuroprotective mechanisms of hydrogen sulfide on ischemic spinal cord injury

研究代表者

菅澤 佑介（Sugasawa, Yusuke）

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：80459114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：セボフルランの臓器保護作用にKATPチャンネルが重要な役割を担うとされる。本研究では低酸素誘導性EPSP増大に対するセボフルランのKATPチャンネルを介した効果を検討した。ニューロンはエネルギー枯渇時、神経膠細胞から供給された乳酸をエネルギー源とするため、乳酸のEPSPへの影響も併せて検討した。セボフルランは低酸素誘導性EPSP増大を抑制しKATPチャンネル阻害薬はその作用を消失させた。セボフルランが乳酸輸送体であるモノカルボン酸トランスポーター阻害薬投与群において酸素・グルコース存在下でもEPSP増大を抑制しなかったことからセボフルランの効果にモノカルボン酸トランスポーターの関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周術期合併症として低酸素血症や臓器虚血があるが、手術症例が高齢化する日本において脳虚血が危惧される症例は今後増加していくことが予想される。脳血管障害の予防のために術中の厳密な血圧管理や脳組織酸素化モニターなどが臨床の現場では行われているが、その迅速な発見や予防は現状では難しい。本研究では臨床現場で頻用される吸入麻酔薬セボフルランの脳に対する臓器保護作用について検討し、セボフルランの脳保護効果がKATPチャンネルを介した作用機序であることが示された。さらに、セボフルランの効果にモノカルボン酸トランスポーターの関与が考えられた。セボフルランは全身麻酔での手術中に中枢神経保護作用を示す可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Sevoflurane has drawn attention because of its preconditioning effects in hypoxic conditions. In our brain slice experiments, deprivation of oxygen and glucose depolarized neurons to subthreshold potentials, and the pre-administration of sevoflurane prolonged the time to depolarization. A KATP channel inhibitor reversed the prolonged time to depolarization and the prevention of the pathological potentiation of excitatory responses, indicating that the short exposure to sevoflurane likely participates in neuroprotection against hypoxia via activation of KATP channels. A monocarboxylate transporter blocker also depolarized striatal neurons. Interestingly, the blockade of monocarboxylate transporters that supply lactate to neurons caused the pathological potentiation, even in the presence of enough oxygen and glucose. In this case, sevoflurane could not prevent the pathological potentiation, suggesting the involvement of monocarboxylate transporters in the sevoflurane-mediated effects.

研究分野：麻酔薬の分子薬理学

キーワード：虚血 ATP感受性Kチャンネル 再灌流障害 吸入麻酔薬 NMDA受容体 モノカルボン酸トランスポーター
プレコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

外傷による脊髄損傷や胸腹部大動脈手術において脊髄虚血による対麻痺は重篤な合併症である。発生率は約 10%に達し、その中で急性対麻痺が減少している反面、術直後は無症状で、後に発症する遅発性対麻痺は増加傾向にあり、治療法が模索されている。本研究開始当初の目的はこの遅発性対麻痺の効果的な新しい治療法を開発することであり、遅発性対麻痺のマウスモデルを作成し、遺伝子工学的研究手法と生化学的手法に加え、Whole-cell Patch-clamp 法を中心とした電気生理学的手法を導入することで、近年多彩な臓器保護作用が報告されている硫化水素 (H₂S) の、遅発性対麻痺に対する治療効果の検討とその作用機序を解明することであった。

2. 研究の目的

周術期合併症として低酸素血症や臓器虚血があるが、手術症例が高齢化する日本において中枢神経の虚血状態が危惧される症例は今後増加していくことが予想される。脳血管障害の予防のために術中の厳密な血圧管理や脳組織酸素化モニターなどが臨床の現場では行われているが、その迅速な発見や予防は現状では難しい。本研究では周術期中枢神経虚血治療を目的として、臨床現場で頻用される吸入麻酔薬セボフルランの脳に対する臓器保護作用について検討した。セボフルランは臓器保護作用のあるプレコンディショニング効果を持ちその作用機序として ATP 感受性 K チャネルが重要な役割を担うとされている。マウス脳スライスを用いて虚血再灌流障害の一因である低酸素誘導性の興奮性シナプス後電位 (EPSP) 増大に対するセボフルランの K_{ATP} チャネルを介した効果を検討した。またニューロンはエネルギー枯渇時、神経膠細胞から供給された乳酸をエネルギー源として使用するため、乳酸の細胞膜電位や EPSP への影響も併せて検討した。

3. 研究の方法

B6J マウス(日齢 14 - 35)脳スライスを作製しホールセルパッチクランプ法を用いて線条体 MS neuron から細胞膜電位や EPSP を計測した。酸素グルコース欠乏環境はスクロース外液に窒素を併用して作製した。K_{ATP} チャネル阻害薬としてグリベンクラミド、乳酸輸送体であるモノカルボン酸トランスポーターの阻害薬として -cyano-4-hydroxycinnamic acid(4CIN)を使用した。

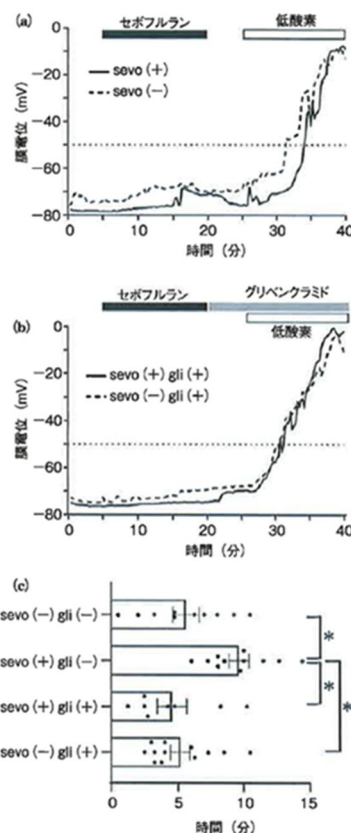
4. 研究成果

(1) MS 細胞におけるセボフルラン前投与の効果

マウス線条体の 90%以上を占める MS 細胞に対して、パッチクランプ法を用いて細胞膜電位を記録した。MS 細胞を低酸素状態にすると、膜電位は急激に脱分極側にシフトし、発火閾値 (threshold potential) である -50 mV にいたるまでの時間は平均して 5.62 ± 1.0 分であった。一方で、セボフルラン 4% (脳スライス実験における 1.5 - 2 MAC 程度の濃度) を 15 分間投与した群では、9.65 ± 0.7 分であり、脱分極するまでの時間が有意に延長した(図 1a)。さらに、セボフルラン投与後に K_{ATP} チャネルの阻害薬であるグリベンクラミドを投与したところ、その延長効果は消失した(グリベンクラミド併用群:4.56 ± 1.1分)(図 1b,c)。これらの結果から、セボフルランが K_{ATP} チャネルを介するプレコンディショニング効果を持つ可能性が示唆された。

(2) 低酸素状態における乳酸の影響

次に、MS 細胞が低酸素状態となった場合に、乳酸がどのような影響を与えるのかを検討した。神経膠細胞において、モノカルボン酸トランスポーターは乳酸を神経細胞へ運搬する役割を担う。先の実験内容において、予めモノカルボン酸トランスポーター阻害薬である 4-CIN を用いて神経膠細胞からの乳酸供給を止めた状態で低酸素を誘導したところ、細胞膜電位はより脱



【図 1】セボフルラン前投与の効果

分極側にシフトし、発火閾値である -50 mV に至るまでの時間は平均して 4.42 ± 1.0 分であった(図 2a)。さらに 4-CIN 投与下においてはセボフルラン投与群と非投与群では差を認めなかった(図 2b)。以上より、低酸素環境において、乳酸は神経細胞のエネルギー源として膜電位維持に関与しているものと考えられた。

(3) 虚血誘導性 EPSP に対するセボフルラン前投与の効果

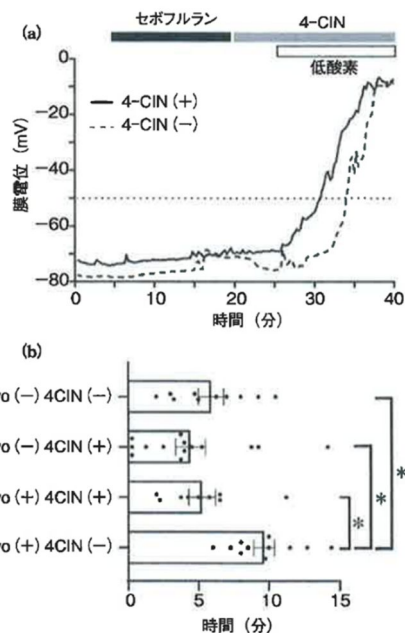
虚血誘導性 EPSP の増大に対するセボフルランの影響を検討した。まず、セボフルランを投与せず、3 分間の低酸素状態とした後に通常環境に戻したところ、EPSP は時間が経過するに連れ徐々に大きくなった。次に予めセボフルランを虚血前に投与したところ、過剰な EPSP の発生を抑制した。さらに、グリベンクラミドを併用してセボフルランを投与したところ、その効果は消失し過剰な EPSP が出現した(記録開始時と 45 分後の時点での EPSP の比較: control group, 202.6 ± 34.7 %; sevoflurane group, 88.2 ± 10.6 %; sevoflurane and glibenclamide group, 263.6 ± 15.2 %)。これらの結果から、過剰な EPSP 入力に対するセボフルランの作用も K_{ATP} チャネルを介していることが示唆された。

(4) 乳酸と EPSP

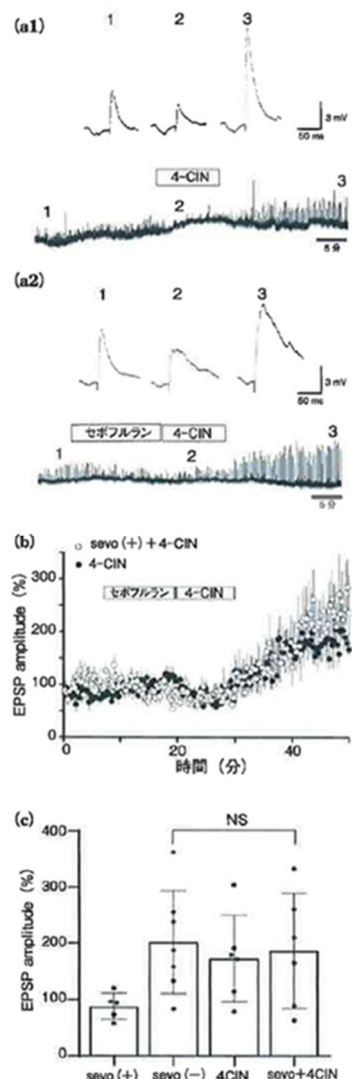
最後に乳酸が EPSP に対してどのような作用を及ぼすのかを検討した。EPSP 記録中にモノカルボン酸トランスポーター阻害薬である 4-CIN を投与したところ、EPSP の一時的な低下がほぼすべての細胞で確認され、シナプス伝達への乳酸の関与が強く示唆された。乳酸のシナプス可塑性への影響は近年報告されており、我々の実験でも同様の現象が観察された。驚くべきことに酸素とグルコースの存在下であっても、4-CIN 投与によって EPSP は時間経過に連れて大きくなった(図 3a1)。低酸素のような強い刺激ではなく、神経細胞への乳酸の供給を阻害するという比較的弱い刺激によって虚血再灌流と同様の EPSP 過剰入力が生じるとい現象は大変興味深いと考えられた。そこへセボフルランを投与して観察したが、セボフルランは EPSP の過剰入力を抑制しなかった(図 3a2, b, c)。さらに、NMDA 受容体の阻害薬である AP-5 を投与したところ、EPSP の過剰入力は生じなかった。以上より、乳酸阻害による EPSP の過剰入力に一部 NMDA 受容体が関与することが示唆された。セボフルランの効果が現れなかった理由の考察として、 K_{ATP} チャネルの活性化には虚血のような劇的な脱分極刺激を必要とし、より軽微な刺激ではシグナル伝達の活性化やチャネル開口には至らない可能性が推測できる。細胞死が起こりかねないような深刻な状況にこそ、吸入麻酔薬は保護効果を発揮する可能性がある。

(5) 結論

セボフルランのプレコンディショニング効果と乳酸の働きについて、電気生理学的仕法を用いて検証した。セボフルランの前投与は K_{ATP} チャネルを介して脳神経細胞保護効果をもたらした。さらに、乳酸も低酸素環境での膜電位の保持に貢献していた。また、虚血誘導性の EPSP の過剰入力に対してもセボフルランは効果があったが、乳酸の遮断によって生じた EPSP 増大は抑制しなかった。



【図 2】膜電位に対する乳酸の影響



【図 3】乳酸が EPSP に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugasawa Yusuke, Cheng Wayland WL, Bracamontes John R, Chen Zi-Wei, Wang Lei, Germann Allison L, Pierce Spencer R, Senneff Thomas C, Krishnan Kathiresan, Reichert David E, Covey Douglas F, Akk Gustav, Evers Alex S	4. 巻 9
2. 論文標題 Site-specific effects of neurosteroids on GABAA receptor activation and desensitization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e55331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.55331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akk Gustav, Germann Allison L., Sugasawa Yusuke, Pierce Spencer R., Evers Alex S., Steinbach Joseph Henry	4. 巻 98
2. 論文標題 Enhancement of muscimol binding and gating by allosteric modulators of the GABAA receptor: relating occupancy to state functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 303-313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/molpharm.120.000066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda Masataka, Ando Nozomi, Sugasawa Yusuke, Inoue Ritsuko, Nakauchi Sakura, Miura Masami, Nishimura Kinya	4. 巻 50
2. 論文標題 Volatile anesthetic sevoflurane pretreatment alleviates hypoxia induced potentiation of excitatory inputs to striatal medium spiny neurons of mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3520 ~ 3530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa Yusuke, Bracamontes John R., Krishnan Kathiresan, Covey Douglas F., Reichert David E., Akk Gustav, Chen Qiang, Tang Pei, Evers Alex S., Cheng Wayland W.L.	4. 巻 192
2. 論文標題 The molecular determinants of neurosteroid binding in the GABA(A) receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105383 ~ 105383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsmb.2019.105383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Cheng Wayland W.L., Budelier Melissa M., Sugasawa Yusuke, Bergdoll Lucie, Queralt-Martin Maria, Rosencrans William, Rostovtseva Tatiana K., Chen Zi-Wei, Abramson Jeff, Krishnan Kathiresan, Covey Douglas F., Whitelegge Julian P., Evers Alex S.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Multiple neurosteroid and cholesterol binding sites in voltage-dependent anion channel-1 determined by photo-affinity labeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1269 ~ 1279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 福田征孝, 安藤望, 河内山幸, 菅澤佑介, 西村欣也	4. 巻 44
2. 論文標題 セボフルラン; 虚血耐性獲得現象って本当?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 295-306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Melissa M. Budelier, Wayland W.L. Cheng, Zi-Wei Chen, John R. Bracamontes, Yusuke Sugasawa, Kathiresan Krishnan, Laurel Mydock-McGrane, Douglas F. Covey, Alex S. Evers	4. 巻 1 8 6 4
2. 論文標題 Common binding sites for cholesterol and neurosteroids on a pentameric ligand-gated ion channel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 128-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2018.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 工藤治, 菅澤佑介, 井関雅子, 玉川隆夫, 千葉聡子, 林田真和	4. 巻 67
2. 論文標題 悪心・嘔吐対策のドロペリドールとせん妄・不穏に対するハロペリドールの投与により術後悪性症候群を呈した1症例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 麻酔	6. 最初と最後の頁 647-650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Yoko, Iida Hiroki, Amaya Fumimasa, Matsuo Kanako, Matsuoka Yutaka, Kojima Keiko, Matsuno Fumitaka, Hamaguchi Takayuki, Iseki Masako, Yamaguchi Keisuke, Takahashi Yoshika, Hara Atsuko, Sugasawa Yusuke, Kawamata Mikito, Tanaka Satoshi, Inagaki Yoshimi, Otsuki Akihiro, Yamazaki Mitsuaki, Ito Hisakatsu	4. 巻 32
2. 論文標題 Prevalence of chronic postsurgical pain after thoracotomy and total knee arthroplasty: a retrospective multicenter study in Japan (Japanese Study Group of Subacute Postoperative Pain)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 434 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-018-2481-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto M, Hayashida M, Kakemizu-Watanabe M, Ando N, Mukaida H, Kawagoe I, Sugasawa Y, Inada E	4. 巻 32
2. 論文標題 B-type natriuretic peptide and hemoglobin are two major factors significantly associated with baseline cerebral oxygen saturation measured using the INVOS oximeter in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Vasc Anesth	6. 最初と最後の頁 187-196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2017.04.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugasawa Yusuke, Fukuda Masataka, Ando Nozomi, Inoue Ritsuko, Nakauchi Sakura, Miura Masami, Nishimura Kinya	4. 巻 132
2. 論文標題 Modulation of hyperpolarization-activated cation current Ih by volatile anesthetic sevoflurane in the mouse striatum during postnatal development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 8 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 福田征孝, 菅澤佑介, 安藤望, 掛水真帆, 山本牧子, 西村欣也, 林田真和, 稲田英一	4. 巻 21
2. 論文標題 術後に高度徐脈を伴う心筋虚血を来し緊急冠動脈バイパス術を要した川崎病性冠動脈瘤縫縮術の麻酔経験.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本心臓血管麻酔学会誌	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Germann Allison L., Pierce Spencer R., Tateiwa Hiroki, Sugasawa Yusuke, Reichert David E., Evers Alex S., Steinbach Joseph Henry, Akk Gustav	4. 巻 100
2. 論文標題 Intrasubunit and intersubunit steroid binding sites independently and additively mediate 1,2-L GABA _A receptor potentiation by the endogenous neurosteroid allopregnanolone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 19-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/molpharm.121.000268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Krishnan Kathiresan, Qian Mingxing, Feltes McKenna, Chen Zi-Wei, Gale Sarah, Wang Lei, Sugasawa Yusuke, Reichert David E., Schaffer Jean E., Ory Daniel S., Evers Alex S., Covey Douglas F.	4. 巻 16
2. 論文標題 Validation of Trifluoromethylphenyl Diazirine Cholesterol Analogues As Cholesterol Mimetics and Photolabeling Reagents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1493 ~ 1507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.1c00364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 菅澤佑介	4. 巻 45
2. 論文標題 GABA-A受容体の分子薬理学	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 1397-1405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sugasawa Y, Covey DF, Akk G, Evers AS
2. 発表標題 Site-specific effects of neurosteroids on GABA _A receptor activation and desensitization
3. 学会等名 Association of University Anesthesiologists 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wang L, Chen ZW, Bracamontes JR, Qian M, Krishnan K, Sugasawa Y, Akk G, Covey DF, Evers AS
2. 発表標題 Mapping inhibitory neurosteroid binding sites in GABAA receptors
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河内山宰, 福田征孝, 山崎翔, 山口愛, 菅澤佑介, 川越いづみ
2. 発表標題 ヒトマクロファージの分化およびプロポフォール投与によるGABA _A 受容体サブユニットの遺伝子発現の変化
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田征孝, 安藤望, 河内山宰, 菅澤佑介, 掛水真帆
2. 発表標題 酸素グルコース欠乏下におけるマウス線条体でのセボフルランと乳酸のシナプス伝達や再灌流障害に対する作用
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会第23回学術大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 菅澤佑介, 福田征孝, 安藤望, 三浦正巳, 西村欣也, 稲田英一
2. 発表標題 発達期における線条体Cholinergic interneuronの過分極活性化陽イオン電流 (I _h) に対するセボフルランの影響.
3. 学会等名 日本麻酔科学会第64回学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Fukuda M, Ando N, Sugasawa Y, Inoue R, Nakauchi S, Miura M, Nishimura K
2. 発表標題 Volatile anesthetic pretreatment alleviates the hypoxia-induced depolarization through ATP-sensitive potassium channels in the striatal medium spiny neurons of mice.
3. 学会等名 The 40th annual meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 福田征孝, 安藤望, 菅澤佑介
2. 発表標題 低酸素環境下での幼若脳線条体における吸入麻酔薬セボフルランの影響.
3. 学会等名 日本小児麻酔学会第23回大会
4. 発表年 2017年～2018年

〔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

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		
米国	Washington University in St.Louis		