

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16499

研究課題名(和文) 脳内麻酔作用部位の同定と遺伝子変化の網羅解析 - 術後脳機能障害の機序解明に向けて -

研究課題名(英文) Identification of brain regions where the general anesthetics induce neural activation

研究代表者

森 啓介 (Mori, Keisuke)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60809375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔薬として、一般的に使用されている吸入麻酔薬セボフルラン、静脈麻酔薬とプロポフォールによりラット脳における神経活動に変化を生じた脳領域を同定した。その脳部位としてカジェハ島、扁桃核、手綱核、視索上核、前庭神経核、孤束核、下オリーブ核、脚間核が確認された。またこれらの領域から4領域(外側手綱核、内側手綱核、前庭神経核、孤束核)に選定し遺伝子発現解析を行った。それぞれの領域で麻酔投与により数%の遺伝子変化を認め、麻酔薬間により変動遺伝子に差異を認めた。また2つの麻酔薬の変動遺伝子の差異から術後悪心嘔吐や術後覚醒時興奮などの術後副作用の発現に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔薬が脳に作用する詳細な部位を同定し、その部位における遺伝子発現変化網羅的に調査した研究は少ない。全身麻酔の作用機序および副作用機序の解明のために、全身麻酔薬(吸入麻酔薬セボフルラン、静脈麻酔薬プロポフォール)による全身麻酔により神経活動の活性化が惹起される脳領域の同定、その領域での遺伝子発現の網羅的解析を詳細に調査した。本研究は、麻酔が脳および神経細胞に与える影響の詳細な分子機構解明や、ひいては術後脳機能障害などの合併症の全容解明に資すると考えている。

研究成果の概要(英文)：We identified a brain region in which the general anesthetic( sevoflurane and propofol) caused changes in neural activity in the rat brain. The brain regions were Kageha Island, amygdala, habenula nucleus, supraoptic nucleus, vestibular nucleus, solitary nucleus, inferior olivary nucleus, and interpeduncular nucleus. Four regions (lateral habenula nucleus, medial habenula nucleus, vestibular nuclei, and solitary nucleus) were selected from these regions and gene expression analysis was performed. Several percentage of gene changes were observed by administration of anesthesia in each region, and differences in variable genes were observed between two anesthetics. The difference in the variable genes of the two anesthetics suggests that it may be involved in the development of postoperative side effects such as postoperative nausea and vomiting and postoperative awakening excitement.

研究分野：麻酔科学

キーワード：全身麻酔 セボフルラン プロポフォール 遺伝子発現解析 c-Fos

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループでは、脳全体において時計遺伝子 *Per2* の発現が抑制されていたことから視交叉上核に解析対象を絞り、詳細な遺伝子発現位相変化やエピジェネティックな発現制御機構等を明らかにしてきた。麻酔科学における基礎研究には領域を神経核レベルにまで限定することが重要である一方で、解析領域・解析遺伝子を限定することにより得られる知見も限定されてしまう点が弱点となっているという問題意識を強く認識してきた。また他研究グループのこれまでの研究にも同様の問題が指摘でき、全身麻酔薬の脳の作用部位を同定するような研究ではその部位における遺伝子発現変化網羅的に記述したものは少なく、また逆に網羅的な解析では脳を詳細な脳領域に分けて解析したものが少ないという背景であった。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は全身麻酔の作用機序、および副作用機序の解明のために、全身麻酔薬（吸入麻酔薬セボフルラン、静脈麻酔薬プロポフォール）による全身麻酔により神経活動の活性化が惹起される脳領域の同定、その領域での遺伝子発現の網羅的解析を詳細に記述することにある。本研究は、麻酔が脳および神経細胞に与える影響の詳細な分子機構解明や、ひいては術後脳機能障害などの合併症の全容解明に資すると考えている。

#### 3. 研究の方法

最も使用されている全身麻酔薬として吸入麻酔薬セボフルラン、静脈麻酔薬プロポフォールがある。本研究では、全身麻酔薬（セボフルラン・プロポフォール）が惹起する神経活性化部位の同定、及びその部位での遺伝子発現変化を詳細かつ網羅的に解析し全身麻酔の作用機序及び副作用機序の解明を目的として行った。Wistar ラット 8-10 週齢のオスを使用し、1 時間の麻酔負荷後、全脳を摘出した。群分けはセボフルラン群（2.4%）及びコントロール群とプロポフォール群（10mg/kg 静注後 36mg/kg/hr 持続静注）、イントラリポス群（プロポフォールと同量）及びシャム群と設定した。麻酔負荷により活性化される脳部位の同定を神経活性マーカーである c-Fos の mRNA、及びタンパク質の発現を In situ hybridization と免疫染色を用いて可視化し c-Fos 陽性細胞をカウントしコントロールと比較解析した。レーザーマイクロダイセクション(LMD:laser microdissection)によりそれらの部位を麻酔負荷群、対照群より採取した。麻酔により活性化された部位における遺伝子発現変化を発現アレイにより網羅解析で行った。遺伝子発現解析には Clarion™ S Array, Rat を使用した。

#### 4. 研究成果

全身麻酔薬として、一般的に使用されているものは吸入麻酔薬・静脈麻酔薬がある。当初は、最も使用されている吸入麻酔薬セボフルランについてのみ解析を進める予定であった。しかしながら全身麻酔薬の作用、副作用機序の解明を想定した場合、吸入麻酔薬のみならず静脈麻酔薬の解析も行い比較検討した方がより広く深い知見が得られると判断したため、静脈麻酔薬として最も使用されているプロポフォールについても解析を行ったため、当初計画していたよりも時間を要した。

麻酔により c-Fos 発現に差を認める脳部位としてセボフルランではカジェ八島、扁桃体、内側手綱核、前庭神経核、孤束核、下オリーブ核、脚間核でプロポフォールでは外側手綱核、前庭神経核、下オリーブ核で確認された（表 1 及び図 1）。

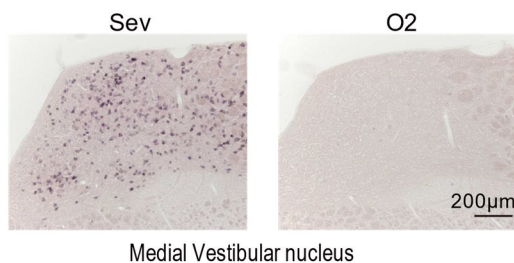
表 1

セボフルラン c-Fos 発現	IHC	ISH
カジェ八島	上昇	上昇
	0.038	0.01
扁桃体	上昇	上昇
	0.001	0.015
内側手綱核	上昇	上昇
	<0.001	<0.001
脚間核	上昇	上昇
	<0.001	0.01
前庭神経核	上昇	上昇
	<0.001	<0.001
孤束核	上昇	上昇
	0.001	<0.001
下オリーブ核	上昇	上昇
	<0.001	0.003

プロポフォール c-Fos 発現	IHC	ISH
外側手綱核	上昇	上昇
	0.007	0.01
前庭神経核	上昇	上昇
	0.001	0.032
下オリーブ核	上昇	上昇
	<0.001	<0.001

(数値はP値を示し、プロポフォール群はイントラリス群と比較した結果)

図 1



(図 1 は c-Fos 発現解析の代表的な写真 : in situ hybridization)

麻酔負荷群及び対照群のラットから LMD を用いて c-Fos 発現に差を認めた脳領域から採取した。外側手綱核からの glutamatergic output は propofol-induced 鎮静に重要である(引用 1)。c-Fos 発現解析からセボフルランとプロポフォールで内側及び外側手綱核でそれぞれ c-Fos 発現上昇の違いを認めた。また全身麻酔薬には術後嘔気嘔吐などの副作用があ

る。前庭神経核や孤束核は嘔吐中枢の一つとして考えられており(引用2)、c-Fos 発現解析よりセボフルランでは両方の領域で一方プロポフォールでは前庭神経核のみで c-Fos 発現上昇を認めた。このことから麻酔の作用機序または副作用への関連性を考慮し c-Fos 発現解析で得られた脳領域から4領域(外側手綱核:LHb、内側手綱核:MHb、前庭神経核:MVe、孤束核:Sol)に選定した。これらの神経核は小さいため発現アレイ解析に十分な量のRNAを採取するために5匹の動物から試料をプールした。

LMDで採取した試料からRNA抽出を行い、発現アレイ解析を行った。遺伝子発現解析では解析した23188個の遺伝子のうち各麻酔薬によりFC>2もしくはFC<0.5変動した遺伝子はセボフルラン群の内側手綱核で1.55%、外側手綱核で1.05%、前庭神経核で4.12%、孤束核で1.38%、一方プロポフォール群では内側手綱核で2.29%、外側手綱核で1.60%、前庭神経核で1.87%、孤束核で2.44%であった。発現アレイ解析からそれぞれの領域で麻酔投与により数%の遺伝子変化を認め、麻酔薬間により変動遺伝子に差異を認めた。両麻酔薬により特定の機能を持った遺伝子に影響せず、全体にわたり遺伝子変化をもたらした。両麻酔薬間で共通して変化した遺伝子は内側手綱核で9個、外側手綱核で6個、前庭神経核で30個、孤束核で7個のみであった。また孤束核でのEgr1の発現上昇がPONV発症の分子学的メカニズムに関与している可能性がある(引用3)本研究ではセボフルランのみでEgr1発現の上昇を認めていたことから、薬剤間の術後嘔気嘔吐の発症リスクの差は孤束核でのEgr1発現の差に起因する可能性がある。

#### 結論

セボフルランとプロポフォール麻酔により神経活動に変化を生じた脳領域を同定した。またこれらの領域では各々の麻酔薬により多彩な遺伝子変化を生じていた。麻酔による神経活性化領域の違いや発現遺伝子の差異は、それぞれの麻酔薬作用特性や術後嘔気嘔吐などの術後有害事象発生の違いの神経基盤となっている可能性が示唆され、上記を2021年度内に論文報告する予定である。

#### (引用文献)

Excitatory Pathways from the Lateral Habenula Enable Propofol-Induced Sedation  
Cigdem Gelegen et. al. / 2018, Current Biology28, 580-587

日臨麻会誌 Vol.37 No.4, 407~417, 2017

Egr1 Gene Expression in the Nucleus of the Solitary Tract in a Shrew Model of Postoperative Nausea and Vomiting/ The anesthesiology annual meeting2019

#### 論文の進捗状況

本研究での当初計画した実験系は遂行できており、すべての実験系に対して結果を得ている状況である。よって2021年度内に論文報告できると考えている。

#### 学会発表の情報

第126回日本解剖学会総会・全国学術集会で上記研究の一部を報告した。  
日本麻酔科学会第68回学術集会で発表予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nobutaka Kamei, Shimpei Higo, Atsuhiko Sakamoto, Hitoshi Ozawa
2. 発表標題 Identification of brain regions where the general anesthetics sevoflurane and propofol induce neural activation using c-Fos as a marker of neuronal activity
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会、全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nobutaka Kamei, Shimpei Higo, Atsuhiko Sakamoto, Hitoshi Ozawa
2. 発表標題 Identification of brain regions where the general anesthetics sevoflurane and propofol induce neural activation using c-Fos as a marker of neuronal activity
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	亀井 信孝  (Kamei Nobutaka)	日本医科大学・麻酔科学教室・大学院生  (32666)	
研究協力者	水野 友喜  (Mizuno Tomoki)	日本医科大学・麻酔科学教室・大学院生  (32666)	

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
---------	---------