

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：94416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09359

研究課題名(和文) siRNA導入神経細胞のバイオイメージングから探る麻酔薬の神経保護戦略

研究課題名(英文) Neuroprotective strategies of anesthetic agents explored by bioimaging of siRNA transfected neurons

研究代表者

澁田 達史 (Shibuta, Satoshi)

医療法人徳洲会野崎徳洲会病院(附属研究所)・研究所・独立研究員

研究者番号：20324767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経発達期の神経細胞において臨床濃度のプロポフォル(PPF)は、細胞内カルシウム濃度を上昇させ細胞死を引き起こす。プレコンディショニング(PC)は致死的な重度のストレスを与える前に軽度のストレスを与えることにより細胞や組織に耐性を与えることである。今回、神経発達期のニューロンにおいて臨床使用濃度PPFを与える前に、その低濃度PPFを暴露しPCによる保護作用の有無を調べた。その結果PPF-PCは後の臨床使用濃度PPFによる細胞内カルシウム濃度の上昇や細胞死には影響を与えなかった。今回の我々の研究においては発達期におけるPPFによる神経毒性に関してはPCによる緩和作用は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

麻酔薬は現代医学において不可欠な存在である。近年、麻酔薬が発達期小児において神経毒性を示すとされる基礎研究結果が次々と発表されるに及び、麻酔薬の使用に重大な懸念がしめられることとなった。そこでわれわれは麻酔薬の安全性の確認ならびに毒性への対策を行うことが急務であると考え、麻酔薬の神経毒性並びに対処方法に関する研究を行った。プレコンディショニング(PC)は致死的な重度のストレスを与える前に軽度のストレスを与えることにより耐性を与えることである。そこで今回は、臨床使用濃度において細胞内カルシウム濃度を上昇させ、細胞死を引き起こしたプロポフォルに対しPCによる神経毒性軽減効果を研究することとした。

研究成果の概要(英文)：At therapeutic concentrations, propofol (PPF), significantly elevates intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and induces neural death during the developmental period. Preconditioning (PC) enables specialized tissues to tolerate major insults better compared with tissues that have already been exposed to sublethal insults. Here, we investigated whether the neurotoxicity induced by clinical concentrations of PPF could be alleviated by PPF-PC. Cortical neurons from E17 Wistar rat fetuses were cultured, and on day in vitro (DIV) 2, the cells were preconditioned by exposure to PPF at 100 nM or 1 μ M for 24 h. For morphological observations, cells were exposed to clinical concentrations of PPF for 24 h. Ca-imaging revealed significant PPF-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation in cells on DIV 4 regardless of PPF-PC. Additionally, PPF-PC did not alleviate cell death induced by PPF. Our findings indicate that PPF-PC does not alleviate PPF-induced neurotoxicity during the developmental period.

研究分野：麻酔科学

キーワード：神経細胞 麻酔薬 発達脳 プレコンディショニング 神経伝達物質 カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

現代の医学においては、麻酔薬は外科手術のみならず鎮静鎮痛など日常的に幅広く臨床に用いられており欠くことのできない存在である。麻酔薬は、脳代謝の抑制による酸素必要量の抑制、グルタミン酸受容体の抑制、細胞内カルシウムの上昇抑制、フリーラジカルスカベンジャーとしての作用などの機序により脳虚血や低酸素傷害に対して神経保護作用を持つことが期待されていた。しかし、1999年にIkonomidou等がケタミン曝露による胎児脳のアポトーシス増加を報告して以来、脳発達期における麻酔薬曝露は、短期間の神経変性にとどまらず長期的な認知障害を引き起こす可能性が数々の動物実験により示唆された。しかしながら発達脳に傷害を与える正確なメカニズムは不明であった。これらを解明するために神経細胞の特定の遺伝子を制御した上で、麻酔薬を投与し、低酸素性傷害を曝露し、形態学的に観察された生存神経細胞機能をバイオイメージング法及び免疫組織学的検査により質的な評価を行う研究を試みることにした。申請者らは平成7年よりラットの初代培養脳神経細胞を用いて静脈麻酔薬、酵素阻害薬等の薬物や低温療法の脳保護作用ならびに幼弱脳における麻酔薬の神経毒性について精力的な研究を行ってきた。我々の開発したShibuta's modelは正常脳組織由来の個々の初代培養脳神経細胞を培養皿の外側からマーキングすることにより、同一細胞を長期間、安価、簡便に観察することを可能にしたもので、その独創的な手法は高い評価を受けている。同モデルを利用し、麻酔薬や低温療法の神経保護作用を細胞レベルで解析した我々の一連の研究は欧米の学術雑誌に掲載されている。1998年のフリーラジカルスカベンジャー(FRS)としてのチオペンタールナトリウム(TPS)の脳保護作用(Shibuta S et al, Br J Pharmacol 1998 124: 804-819.筆頭著者)を始めとして、低温による神経細胞保護の研究(Shibuta S et al. J Neurosci Res. 15;65(6):583-90 2001)、プロポフォールでは神経保護作用が認められない(Shibuta S et al. Neuroreport 2001 12: 295-298)事や、誘導型一酸化窒素合成酵素阻害薬による脳神経保護作用(Shibuta S et al J Neurol Sci. 2003 215(1-2):31-6)、ケタミンによる神経保護作用とTPS同時投与による相加作用(Shibuta S et al, Br J Anaesth 2006 97 (4): 517 - 24)、FRSであるエダラボンの神経保護作用は僅かな温度差に影響されることを示した論文(Shibuta S et al Br J Anaesth 2010 104: 52 - 58)も欧米の一流学術誌に掲載された。2015年には新たにカルシウム(Ca)イメージング法を実験手法として用い、幼若神経細胞においてケタミンを曝露した場合、後日グルタミン酸を負荷すると、神経細胞内Ca濃度が異常に上昇し、細胞死が増強すること、そしてこのような反応はTPSでは見られないことをNeurosci Res誌において発表(2015 98: 9-16)し、さらに、低酸素曝露に対し、TPSは形態学的に細胞保護機能を示した一方で、生存細胞におけるカルシウムイメージングによる解析では、グルタミン酸刺激による応答性は極めて良好に保持されたが、アセチルコリンに対する反応は大きく減弱していたこと(J Neurol Sci 2016 365: 126-131)や3種類の麻酔薬、チオペンタール(TPS)、ミダゾラム(MDZ)、プロポフォール(PPF)をそれぞれ培養日数(DIV)の異なる神経細胞に投与し、細胞死の状況を形態学的手法により調べ、さらに麻酔薬投与による神経細胞内カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)上昇をカルシウムイメージング法によって調べた。(Neurotoxicology 69: 320-9; 2018)

2. 研究の目的

これらの研究成果をもとに、ラット初代培養脳神経細胞へ siRNA を導入し、遺伝子発現抑制モデルを作成し、麻酔薬によるプレコンディショニングモデルを完成させ、このモデルを利用し、低酸素曝露による神経傷害を行い、神経細胞に対して、形態学的観察を基礎に、免疫組織学的染色法、カルシウムイメージング法を用いて麻酔薬によるプレコンディショニング効果を解析し、

分子生物学的特徴を明らかにすると同時に、神経保護作用のメカニズムをカルシウムイオンの動態制御及び、神経細胞死に密接に関与する p53 をはじめとする遺伝子群の分子シグナリングからみたメカニズムを中心に解明することを目的とした。本研究の実施により、麻酔薬や温度による神経細胞の生死における分子生物学的特徴が解析されることは、虚血や低酸素の際に関与する遺伝子や特定の系の役割に関する基礎的研究の発展において有意義な知見が得られ、ひいては細胞死を防ぐ薬物治療法の開発に繋がり、臨床医学においても脳神経保護作用としての麻酔薬の適切な使用法に道を開くものと期待された。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養システム

われわれが既に確立している初代培養大脳皮質神経細胞モデルを利用した。妊娠 17 日目ウイスターラットより仔体大脳皮質を取り出した。髄膜と血管を剥離し、パストールピペットで物理的に脳組織を断片化した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の 0.25%トリプシンで 37 °C で 20 分間処理した。分散した細胞は DMEM で $0.6 \sim 1.0 \times 10^6$ 個/ml の濃度に希釈した。DMEM 培養液の組成は、4% HS、8% FCS、2% B-27 Supplement Minus AO、50 IU/ml ペニシリン、50 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンであった。細胞懸濁液は、カルシウムイメージング用として直径 35 mm のポリエルリジンでコーティングされたフィルムボトムディッシュ (FD10300; Matsunami Glass Ltd) を、細胞毒性形態学研究用として 2 mm グリッドの組織培養ディッシュ (Nunc, Naperville) にそれぞれ撒かれた。

培養 (DIV) 2 日目に、細胞を対照群 (DMSO+ PBS)、100 nM、1 μM の PPF (PPF-プレコンディショニング: PC) への曝露による前処理とともに曝露した。尚これらの PC は、ニューロンの生存率には影響しなかった。

PC 24 時間後 (DIV 3)、培養培地を完全に交換した。非神経細胞の増殖を防ぐために、培養細胞を 5-FU (5 $\mu\text{g/ml}$) で処理した。その後、培養ニューロンを、8% FCS、4% HS、および 2% B-27 サプリメントを含む DMEM で、インキュベーターで維持した。インキュベーターの条件は 5% CO₂、湿度 100%、温度 37 °C とした。

DIV 4 に、培養液を破棄した神経培養皿に対し Ca²⁺ 感受性指示薬、10 μM Fluo4-AM、および 0.025% プルロニック酸 F-127 を室温で 30 分間曝露し NBS (Normal Bath Solution) で 2 回洗浄した。蛍光測定システム (Aquacosmos®; 浜松ホトニクス) および倒立位相差顕微鏡 (Axiovert 200®; Carl Zeiss) を使用して、細胞内カルシウム濃度 ([Ca²⁺]_i) を測定した。ニューロンの蛍光励起 (450 ~ 490 nm) として 150 W キセノンランプを使用し、曝露中の潜在的な細胞損傷を回避するためフィルター交換器 (C8214; 浜松ホトニクス) を使用し、油浸対物レンズ (Fluor® × 40、カールツァイス) を通じて一連の画像は、積分時間 2 秒、120 秒で収集した。画像解析には処理ソフト (Aquacosmos®) を使用した。データは、各細胞の定義された領域内の平均相対蛍光として表された。初代皮質培養ニューロンに対する PPF の効果を推定するために、PPF 添加時の蛍光強度 (F_{max}) の平均最大変化を測定した。その際、PPF アプリケーション (F₀) の前に取得したベースライン蛍光に対して正規化をおこなった。

PPF 溶液 (10, 100 μM) と対照液 (DMSO+ NBS) は、使用直前に準備した。ニューロンがこれら試験薬に反応しなかった場合に備えて、KCl 溶液 (60mM) も調製し、ニューロンが KCl にも反応しなかった場合、ニューロンは死んでいると見なされ、そのデータは分析から除外した。

本研究では 46 の培養皿でニューロンの応答を評価した。[Ca²⁺]_i については、培養皿あたり 50 個のニューロンを無作為に選択し、細胞のカルシウム応答曲線を解析から以下の数値を指標とした。(1) 50 個のニューロンのうち、F_{max} が 1.5 を超えるニューロンの数 (2) 50 個のニューロンの F_{max} 値。対照群 (NBS + DMSO) の F_{max} より PPF に対するカルシウム応答

の高さ Fmax/対照における Fmax=height ratio(HR) を算出した。

(2) PPF による神経毒性の評価

神経毒性は、写真システム (Axiovert 25; Carl Zeiss 並びに Nikon D90) を使用して、Shibuta のモデルに従って評価した。初代培養皮質ニューロンを PPF もしくは対照試験液(PBS+DMSO) に 24 時間曝露した。各培養皿に置いて 3 視野の写真は、試験薬曝露の直前 (DIV 3) と実験終了時 (DIV 4) に撮影した。本研究では、69 枚の培養皿を使用した。細胞死を判定する方法としては、0.4% トリパンブルー染色法を採用した。各視野において約 200~300 個のニューロンをカウントし、染色されていない細胞の数 / 実験直前の細胞の総数より生存率を計算した。PPF 投与群と対照群の細胞生存率の比を細胞生存比 (SR) と定義した。

(3) 統計分析

群間の統計的比較は、JMP Pro1 13.2.0 ソフトウェア (SAS Insti. Inc., Cary, North Carolina) を使用して行った。データは、平均値および平均値の標準誤差 (SEM) として表示した。平均間の差は、ANOVA (分散分析) を使用し、両側 Tukey-Kramer 有意差検定を行った。統計的有意性は $P < 0.05$ に設定とした。

4. 研究成果

(1) カルシウムイメージングによる解析

50 個のニューロンのうち、Fmax が 1.5 を超えるニューロンの数 : Table 1

Table 1: The number of neurons that had FMax > 1.5 in 50 cells.

PPF	PPF-PC			
	0	100 nM	10 μM	1 μM
0	1.80 ± 0.66	0.75 ± 0.48	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
10 μM	7.00 ± 2.02	10.40 ± 2.62	4.00 ± 1.22	4.00 ± 1.22
100 μM	19.60 ± 2.71	22.33 ± 3.09	22.50 ± 4.78	22.50 ± 4.78

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273219.t001>

PPF-PC なしで DIV 4 に対照液が曝露された Fmax>1.5 のニューロンの数は 1.80 ± 0.66 であった。100 nM の PPF-PC を行ったニューロンでは、DIV 4 に対照液が曝露された Fmax>1.5 のニューロンの数は 0.75 ± 0.48 であった。DIV 4 に 10、100 μM の PPF 溶液を曝露した群では、それぞれ 10.4 ± 2.62、22.3 ± 3.09 であった。一方、1 μM の PPF-PC が行われたニューロンでは、DIV 4 で対照液が曝露された Fmax>1.5 のニューロンの数は 0 であり、10、100 μM の PPF 溶液を曝露した群では、それぞれ 4.0 ± 1.22、22.5 ± 4.78 であった。

50 個のニューロンの Fmax 値から算出した HR 値による比較 : Table 2。DIV 2 までの PPF-PC によって、HR に有意な影響を確認することは出来なかった。

Table 2: Height Ratios (HR) of neurons exposed to PPF (N) = number of dishes.

PPF	PPF-PC			
	0	100 nM	10 μM	1 μM
0	1 (5)	0.95 ± 0.01 (4)	0.95 ± 0.02 (5)	0.95 ± 0.02 (5)
10 μM	1 (5)	1.06 ± 0.03 (5)	0.99 ± 0.05 (5)	0.99 ± 0.05 (5)
100 μM	1 (5)	1.01 ± 0.03 (6)	1.01 ± 0.04 (6)	1.01 ± 0.04 (6)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273219.t002>

(2) 形態学的解析

DIV3-4 に PPF または対照液を 24 時間曝露した初代培養神経細胞の透過光によるマイクロイメージで観察を行った。対照液 (PBS + DMSO) では、PPF-PC の有無にかかわらず神経細胞死を誘発しなかった。DIV 3 での PPF 曝露 (10、100 μM) は、SR を著しく減少させたが、PPF-PC の存在による影響を受けなかった (Table 3)。

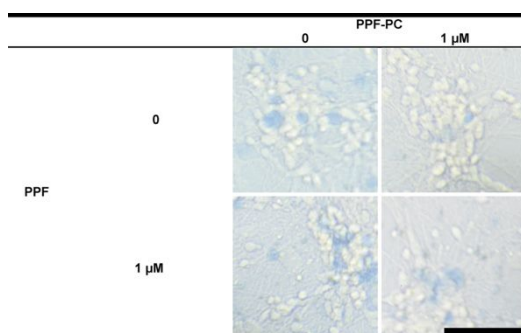
Table 3: Survival ratios (SR) of neurons exposed to PPF (N) = number of dishes.

PPF	PPF-PC			
	0	100 nM	1 μM	
0	1 (7)	0.98 \pm 0.06 (7)	0.99 \pm 0.04 (7)	
10 μM	0.84 \pm 0.06 (7)	0.85 \pm 0.04 (7)	0.84 \pm 0.02 (7)	
100 μM	0.82 \pm 0.03* (8)	0.82 \pm 0.04* (9)	0.80 \pm 0.02* (10)	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273219.t003>

図 1 : Transmitted light microphotographs of primary cultured cortical neurons exposed to vehicle (DMSO in PBS) or 100 μM PPF on DIV 3, taken 24 h after the exposure. Regardless of PPF-PC on DIV 2, PPF exposure on DIV 3 significantly induced neuronal death compared to vehicle. Scale Bar = 100 μm .

doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273219.g006>



(3) 初代培養神経細胞における siRNA の導入

初代培養神経細胞における siRNA の導入に関しては試薬 (Invitrogen™ Lipofectamine™ MessengerMAX Transfection Reagent; Thermo Fisher Scientific) を用いて、遺伝子導入条件の確認を行ったものの、細胞への siRNA の導入状況は安定して 70% 以上の成功率を記録することがなかった。限られたリソースを有効に使うため、プレコンディショニングに関わる形態学分析並びにカルシウムイメージング解析に集中することとした。

(4) まとめ

以上の結果は、PPF-PC は、臨床使用濃度の PPF によって誘発される細胞内カルシウムの上昇や神経死を *in vitro* で軽減することがなかったことを示唆している。PPF-PC は、神経発達期において、PPF による神経毒性からニューロンを保護する可能性が少ないと考えられる。今回の結果は、小児科における PPF の安全性について新たな知見を提供しており、発達期における PPF の使用は、可能な限り制限されるべきであると示唆されるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibuta Satoshi, Morita Tomotaka, Kosaka Jun	4. 巻 17
2. 論文標題 Effect of preconditioning on propofol-induced neurotoxicity during the developmental period	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0273219 ~ 0273219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0273219	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 -

1. 著者名 岩切さと子 吉田力丸 森田知孝 澁田達史	4. 巻 1
2. 論文標題 Arduino と感圧センサーを用いた喉頭展開の際に舌根部にかかる圧力の測定デバイスの試作	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本麻酔集中治療テクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 66-70
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 澁田達史 森田知孝	4. 巻 26
2. 論文標題 新設医科大学における学生教育：英語による小児麻酔科学講義	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児麻酔学会誌	6. 最初と最後の頁 82-87
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田 知孝, 澁田 達史
2. 発表標題 プロポフォルプレコンディショニングによる幼若神経細胞傷害への保護効果について ~Caイメージングによる比較検討~
3. 学会等名 第69回日本麻酔科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 知孝, 澁田 達史
2. 発表標題 胎児期のケタミン曝露は幼児期ドパミン曝露による神経細胞傷害性に影響を与えるか
3. 学会等名 第27回日本小児麻酔学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 知孝, 澁田 達史
2. 発表標題 胎児期のケタミン曝露は幼児期セロトニン曝露による 神経細胞傷害性に影響を与えるか
3. 学会等名 日本集中治療医学会 第6回北海道支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 知孝, 澁田 達史, 小阪 淳
2. 発表標題 プロポフォルプレコンディショニングによる幼若神経細胞傷害への保護効果について
3. 学会等名 第25回日本神経麻酔集中治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田知孝, 澁田達史
2. 発表標題 ラット大脳皮質神経細胞においてプロポフォルによるプレコンディショニングは生存率を上昇させるか
3. 学会等名 日本小児麻酔学会第25回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澁田達史, 森田知孝
2. 発表標題 新設医科大学における学生教育：英語による小児麻酔科学講義
3. 学会等名 日本小児麻酔学会第25回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 知孝, 内田 整, 萩平 哲, 澁田 達史
2. 発表標題 レーザー血流計を用いた麻酔導入時の毛細血管血流の変化の比較検討
3. 学会等名 第37回日本麻酔・集中治療テクノロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 力丸, 森田 知孝, 澁田 達史
2. 発表標題 Arduinoと感圧センサーを用いた喉頭展開の際にかかる圧力測定デバイスの試作
3. 学会等名 第37回日本麻酔・集中治療テクノロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomotaka Morita, Osamu Uchida, Satoshi Shibuta
2. 発表標題 CONTINUOUS WOUND INFILTRATION OF ROPIVACAINE FOR POSTOPERATIVE ANALGESIA AFTER LAPAROSCOPIC PHEOCHROMOCYTOMA SURGERY IN A PAEDIATRIC PATIENT
3. 学会等名 The European Society of Regional Anaesthesia & Pain Therapy) Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Ketamine potentiates glutamate-induced Ca
<https://atlasofscience.org/ketamine-not-tps-potentiates-glutamate-induced-ca-neurotoxicity/>

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	森田 知孝 (Morita Tomotaka)		
研究協力者	小阪 淳 (Kosaka Jun)		

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