

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791470

研究課題名（和文）アストロサイトのカルシウムオシレーションに対する揮発性麻酔薬の影響

研究課題名（英文）The effect of volatile anesthetics on calcium oscillation in astrocyte

研究代表者 吉村 聖子（YOSHIMURA SEIKO）

和歌山県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：40468286

研究成果の概要（和文）：

揮発性麻酔薬の作用機序に関して、グルタミン酸作動性ニューロンはその標的の候補として考えられている。アストロサイトはシナプス間隙でグルタミン酸の放出を調節することが知られている。アストロサイトのグルタミン酸放出の機序としてカルシウムオシレーションが知られている。本研究ではカルシウムオシレーションとグルタミン酸濃度の関連性を揮発性麻酔薬の有無の条件で測定することを目的とした。結果としてグルタミン酸濃度の測定値にばらつきが多く、明らかな傾向は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Glutamatergic neurons have been one of the candidates for the target site of volatile anesthetics. It has been shown that astrocyte regulate the release of glutamate at synaptic cleft. This regulation is associated with calcium oscillation. The purpose of this study was to elucidate the relationship between calcium oscillation and glutamate release in the condition with or without volatile anesthetics. The result was no significant association because of the concentration of glutamate was vary widely.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：カルシウムオシレーション、グルタミン酸、アストロサイト、揮発性麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

揮発性麻酔薬の中枢神経におよぼす鎮静作用の機序の候補は、脳神経細胞の興奮の抑制という観点から、GABAA受容体、Two-pore-domain K<sup>+</sup> channels、NMDA受容体といった受容体に対する作用があげられている(1)。アストロサイトはニューロンのシ

ナプス伝達に積極的な役割を示していることが近年明らかになっている(2)。アストロサイトのシナプス間隙での作用の1つとしてグルタミン酸放出がある。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質であり、NMDA受容体もグルタミン酸受容体の一つである。また、キシロンの麻酔作用はグルタミン酸を介した経

路を標的としていることが示されている(3)。アストロサイトは元来、非興奮性細胞であるが、細胞内カルシウム濃度のごく短時間の一過性上昇の繰り返し、すなわち、カルシウムオシレーションをおこしていることが知られるようになった(4)。近年では、そのカルシウムオシレーションによって、アストロサイトのグルタミン酸放出が制御されていることが明らかにされている(5)。揮発性麻酔薬にはカルシウム拮抗薬としての働きがあり、細胞内カルシウム上昇を抑えることが示されている(6)。しかし、アストロサイトのカルシウムオシレーションを揮発性麻酔薬が阻害するか否かについては明らかにされていない。

これまでの揮発性麻酔薬の中樞神経系への作用点を考えたとき、GABAA 受容体に対する GABA-induced Cl<sup>-</sup> currents と高濃度麻酔薬での GABAA の活性化、Two-pore-domain K<sup>+</sup> channels による過分極の形成、NMDA 受容体の抑制による意識レベルの低下といった神経ニューロンの活動性の変化を直接標的として作用機序が論じられてきた(1)。本研究では、従来、神経細胞の栄養供給源としか見なされていなかったアストロサイトに着目し、アストロサイトのカルシウムオシレーションの抑制が、興奮性神経伝達物質分泌作用を抑え、中枢、さらに意識の抑制を促しているという発想が独創的である。本研究では、揮発性麻酔薬によるアストロサイトのカルシウムオシレーションの抑制はグルタミン酸放出を抑えるという結果が予想される。この結果からアストロサイトでのカルシウムオシレーションを対象とした麻酔薬の鎮静作用機序の一端が明らかとなり、将来的には、意識を選択的に抑制し、より副作用の少ない揮発性麻酔薬を開発することが可能となるという意義をもつ。

#### 引用文献

(1) Franks NP. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci.* 2008 9(5):370-86.

(2) Perea G., Araque A. Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes. *J Neurosci* 2005 25(9):2192-2203.

(3) Dickinson R., Peterson BK., Banks P., Simillis C., Martin JCS., Valenzuela CA., Maze M., Franks NP. Competitive Inhibition at the Glycine Site of the N-Methyl-D-aspartate Receptor by

Anesthetics Xenon and Isoflurane. *Anesthesiology* 2007 107(5):756-767.

(4) Fellin T., D'Ascenzo M., Haydon PG. Astrocytes Control Neuronal Excitability in the Nucleus Accumbens. *The ScientificWorldJOURNAL* 2007 7(S2):89-97.

(5) D'Ascenzo M., Fellin T., Terunuma M., Revilla-Sanchez R., Meaney DF., Auberson YP., Moss SJ., Haydon PG. mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 104(6):1995-2000.

(6) Ishikawa A., Ogawa K., Tokinaga Y., Uematsu N., Mizumoto K., Hatano Y. The mechanism behind the inhibitory effect of isoflurane on angiotensin II-induced vascular contraction is different from that of sevoflurane. *Anesth Analg.* 2007 Jul;105(1):97-102.

#### 2. 研究の目的

アストロサイト由来マウス培養細胞 (KT-5) での、カルシウムオシレーションを観察する。その方法は、クローズドチャンバシステムで共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより行う。ライブセルイメージングを取り入れることにより、従来の細胞内カルシウム計測法では困難であった細胞内カルシウムの経時的、空間的広がりを高感度で観察することが可能となる。さらにカルシウムオシレーションに基づくグルタミン酸放出をマイクロダイアリス法にて検出する。マイクロダイアリス法を用いることにより、培養細胞上清での局所的、高感度なグルタミン酸濃度測定が可能となる。揮発性麻酔薬の存在の有無により、カルシウムオシレーションの抑制が起きるか否か、それに伴って興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の濃度に変化があるかを測定し、揮発性麻酔薬がアストロサイトのカルシウムオシレーションを抑制することと、アストロサイトからのグルタミン酸放出との間の関連性を明らかにする。

本研究では、中枢神経系に対する揮発性麻酔薬の鎮静作用について、その作用点がアストロサイトのカルシウムオシレーションの抑制に基づくグルタミン酸放出の抑制であるという仮説をたて、アストロサイトのカルシウムオシレーション、グルタミン酸放出に対する揮発性麻酔薬の効果を明らかにし、揮発性麻酔薬による鎮静作用の機序解明の発端とすることを目的とした。

#### 3. 研究の方法

マウス由来アストロサイト培養細胞 (KT-5) をカバーガラス上で培養する。カルシウム指示薬である Fluo-3 AM を室温で 5 分、負荷する。クローズドチャンバーシステムにカバーガラスをセットし、リングル液で灌流し、余剰な Fluo-3 AM を洗い流す。還流を止め、共焦点レーザー顕微鏡 FV300 (OLYMPUS™) を用いてカルシウムオシレーションの観察を開始する (サンプリングレートは 1Hz とする) 1)。

還流液を採取し、HTEC-500 微量生体試料分析システム (エイコム株) によりマイクロダイアリシスを行ってグルタミン酸濃度を計測する。

以上によりカルシウムオシレーションとグルタミン酸放出との関連を再現する条件を検討する。

平成 22 年度：揮発性麻酔薬の影響の検討

マウス由来アストロサイト培養細胞 (KT-5) をカバーガラス上で培養する。カルシウム指示薬である Fluo-3 AM を室温で 5 分、負荷する。クローズドチャンバーシステムにカバーガラスをセットし、リングル液で灌流し、余剰な Fluo-3 AM を洗い流す。揮発性麻酔薬 (イソフルラン、セボフルラン) を 15 分暴露する。還流を止め、共焦点レーザー顕微鏡 FV300 (OLYMPUS™) を用いてカルシウムオシレーションの観察を開始する (サンプリングレートは 1Hz とする)。

還流液を採取し、HTEC-500 微量生体試料分析システム (エイコム株) によりマイクロダイアリシスを行ってグルタミン酸濃度を計測する。

揮発性麻酔薬はイソフルラン、セボフルランそれぞれ 3 点の濃度で測定する。

・ 揮発性麻酔薬は脂溶性が高く、あらゆる細胞、細胞内の構造物とその作用点としてとりあげられることとなる。さらに、中枢神経系での鎮静作用の作用点を検討するという事は、中枢での数多くの神経ニューロンを対象としてしまい、問題が複雑になる。よって本研究では、まず、実験系を簡略化することからこの問題にアプローチすることとした。すなわち、培養細胞系を用い、自発的なカルシウムオシレーションの観察と同時にグルタミン酸濃度を測定する、というものである。

#### 4. 研究成果

マウス由来アストロサイト培養細胞 (KT-5) をカバーガラス上で培養し、クローズドチャンバーシステムでカルシウム指示薬である Fluo-3 AM をカルシウム指示薬としたカルシ

ウムオシレーションの共焦点レーザー顕微鏡での観察の条件検討を行った。

グルタミン酸の測定のために、還流液を採取し、HTEC-500 微量生体試料分析システム (エイコム株) によりマイクロダイアリシスを行ってグルタミン酸濃度測定を行った。この時の緩衝液として、PBS、生理食塩水を当初用いたところ、15 分後の最後のサンプルの採取の時には生存した細胞を認めることができず、この実験系での緩衝液として不相当であることが明らかとなった。この時の緩衝液としてクレブスリングル液 (pH7.4) を用いると 15 分後の最後のサンプルを採取したときでも細胞の生存率がたかく、本研究にはクレブスリングル液を用いることが至適であった。

グルタミン酸濃度の測定結果は、有意な結果、傾向も認められなかった。データのばらつきが大きく安定した結果を得ることができなかった。コントロールとして用いた、細胞上清からのサンプルではなく、精製したグルタミン酸では  $10^{-9}$  mol/l の濃度でもピークを得ることができた。

安定した結果を得られなかった原因として、経時的に培養上清を採取する際、細胞成分が壊れることによる内因性のグルタミン酸の漏出が混ざったためと考えた。試料の採取量は  $300 \mu\text{l}$  とし、採取時に細胞には触らないように細心の注意を払い、細胞成分を物理的に破壊しないように気をつけたが、採取の仕方に検討が必要であったことも考えられる。今後は、グルタミン酸濃度測定に関して、バブリングしながら揮発性麻酔薬に暴露させるという実験系を改良する必要があると考えられた。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉村 聖子 (YOSHIMURA SEIKO)

和歌山県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：40468286

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

時永 泰行 (TOKINAGA YASUYUKI)

和歌山県立医科大学 医学部助教

研究者番号：60438281