

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592248

研究課題名(和文) 全身麻酔薬の中樞神経系に対する脳保護作用の分子機序の解析

研究課題名(英文) Intracellular signaling of neuroprotection by general anesthetics

研究代表者

田辺 久美子 (TANABE, Kumiko)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30402209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔薬の中には中樞神経系における保護効果を示すと報告されている薬剤があるが、その機序の詳細は解明されていない。C6グリア細胞において、全身麻酔薬が神経栄養因子、神経障害因子に及ぼす影響を検討した結果、静脈麻酔薬midazolam、dexmedetomidineがinterleukin (IL)-1 によるIL-6遊離を抑制することを見いだした。その分子機序として、midazolamはIL-1 によるSTAT3のリン酸化抑制を介して、IL-6遊離を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：General anesthetics are reportedly to have neuroprotective effects. However, the detailed intracellular mechanisms have not been fully clarified. We investigated effects of intravenous anesthetics on neurotrophic factor or cytokine release from rat glioma cell line, C6 cells. In conclusion, midazolam or dexmedetomidine suppressed IL-1beta-induced IL-6 release. Midazolam inhibited IL-1beta-induced IL-6 via suppression of STAT3 phosphorylation in C6 glioma cells. However, exact mechanism of dexmedetomidine in IL-1beta-induced IL-6 release was not elucidated.

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：全身麻酔薬 中樞神経保護 サイトカイン アストロサイト

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系は神経細胞、アストロサイト、マイクログリアから構成されている。これらは、互いに神経伝達物質、または電気生理学的活動を介してネットワークを構築し、中枢神経系の働きを維持している。アストロサイトは神経細胞へのエネルギー供給およびシナプス部での伝達物質の除去作用、マイクログリアは中枢神経系におけるマクロファージ用の作用を持つ。炎症性神経疾患のみならず、神経変性疾患や虚血性疾患などにおいても、変性に陥った神経細胞の周囲に活性化されたアストロサイトやマイクログリアの存在が確認されている。

(2) 中枢神経系が障害を受けると活性化アストロサイト、マイクログリアが変性神経細胞を貪食・処理すると同時に、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、interferon $\gamma$  (IFN $\gamma$ )などのサイトカイン、Nitric oxide (NO)、フリーラジカル、興奮性アミノ酸など神経障害因子を産生する。それにより神経細胞が障害されると同時に、IL-2、IL-3、IL-6、GM-CSF等の神経栄養作用を持つサイトカインや、GDNF、BDNFなど神経栄養因子、神経成長因子(NGF)の産生を誘導するIL-1、IL-4、IL-5、TGF $\beta$ などのサイトカインの産生が促進され、神経細胞の障害を軽減させる方向に働く。

(3) 全身麻酔中や、鎮静中など、患者の意識が確認できない状態においては、その神経機能を評価することは容易ではない。そのため、しばしば中枢神経保護効果があるとされている薬剤の使用や、処置が行われることがある。例えば、鎮痛・鎮静効果を有する $\alpha_2$  agonistのdexmedetomidineは中枢神経保護作用を有するとされている。しかし、全身麻酔薬が中枢神経の長期予後に及ぼす影響は未だ明らかとされておらず、中枢神経系における保護効果の詳細は解明されていない。

### 2. 研究の目的

(1) 中枢神経障害時にアストロサイトから産生される、神経障害因子、神経栄養因子の産生機序を明らかにする。

(2) 全身麻酔薬がアストロサイトから産生される神経障害因子、神経栄養因子に及ぼす影響を検討し、その細胞内情報伝達機構を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 神経細胞死との関連が示唆されているサイトカイン(IL-1 $\beta$ 、6、10、TNF- $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 等)、NO、フリーラジカル、興奮性アミノ酸などの合成・分泌に及ぼす影響をimmunoblot法、PCR法、ELISA法により検討する。

(2) 神経栄養因子として働くサイトカイン

(IL-1、2、3、4、5、6、TGF- $\beta$ )、GDNFなどの神経成長因子の合成・分泌に及ぼす影響をimmunoblot法、PCR法、ELISA法により検討する。

(3) 全身麻酔薬(propofol、midazolam、ketamine、dexmedetomidine、sevoflurane)が神経障害因子、神経栄養因子の合成・分泌に及ぼす影響をimmunoblot法、PCR法、ELISA法により検討する。

### 4. 研究成果

(1)1、ラットの脊髄後角神経細胞において、lidocaine、tetracaine、ropivacaineはcapsaicinによるp44/p42 MAP kinaseのリン酸化を抑制したが、levobupivacaineは影響を及ぼさなかった。2、lidocaine、tetracaine、levobupivacaineはNMDAによるp44/p42 MAP kinaseのリン酸化を抑制したが、ropivacaineは影響を及ぼさなかった。3、lidocaine、tetracaineはAMPAによるp44/p42 MAP kinaseのリン酸化を抑制したが、ropivacaine、levobupivacaineは影響を及ぼさなかった。4、lidocaine、tetracaine、ropivacaineはionomycinによるp44/p42 MAP kinaseのリン酸化を抑制したが、levobupivacaineは影響を及ぼさなかった。脊髄後角神経細胞におけるp44/p42 MAP kinaseの活性化は術後の遷延痛に関与しているとされている。以上より、局所麻酔薬はその種類により脊髄後角神経細胞のp44/p42 MAP kinaseの活性化に対する影響が異なり、術後の遷延痛に対しても異なる影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2)1、静脈麻酔薬のdexmedetomidineはC6細胞においてIL-1 $\beta$ によるIL-6遊離・産生を抑制した。2、8-brom-cAMPはIL-1 $\beta$ によるIL-6遊離・産生を増強したが、8-bromo-cGMPは影響を及ぼさなかった。3、IL-1 $\beta$ はcAMPを増加しなかった。また、dexmedetomidineはforskoline (adenylyl cyclase活性化)によるcAMPの増加には影響しなかった。4、yohimbine ( $\alpha_2$ 受容体拮抗薬)はdexmedetomidineによるIL-6遊離抑制に影響しなかった。5、dexmedetomidineはIL-1 $\beta$ によるp38 MAP kinase、SAPK/JNK、I $\kappa$ B、NF $\kappa$ B、c-Junのリン酸化に影響しなかった。以上より、dexmedetomidineはIL-1 $\beta$ によるIL-6遊離抑制を介して中枢神経系の免疫に影響を与えることが示唆された。

(3)1、ラット足底切開による術後疼痛モデルにおいて、ET-1のくも膜下腔への投与は疼痛閾値を上昇した。2、ET-1のくも膜下腔投与による疼痛閾値の上昇はBQ-123(ET<sub>A</sub>受容体阻害薬)、BQ-788(ET<sub>B</sub>受容体阻害薬)により抑制された。3、足底切開によって脊髄後根神経節のERK陽性神経細胞数、脊髄後角の活性化マイクログリア数は増加するが、ET-1のくも膜下腔への投与はこれを抑制した。4、BQ-123、

BQ-788 により ET-1 による陽性神経細胞数増加、脊髄後角の活性化マイクログリア増加抑制は解除された。5、PD98059(MEK 阻害薬)のくも膜下腔への投与は、足底切開による疼痛閾値の低下を抑制した。以上より、ET-1 のくも膜下投与は脊髄後根神経節の神経細胞および脊髄後角のマイクログリアにおける ET<sub>A</sub>、ET<sub>B</sub> 受容体の刺激を介して鎮痛作用を示す事が明らかとなった。

(4)1、FGF-2 は C6 グリオーマ細胞において Akt、GSK3 をリン酸化した。2、FGF-2 による GDNF 遊離は wortmanin、LY294002 (PI3 kinase 阻害剤)により抑制された。3、FGF-2 による GDNF 遊離は PI3 kinase の down regulation により抑制された。4、PD98059 (MEK 阻害剤)、SP600125 (SAPK/JNK 阻害剤)は FGF-2 による Akt のリン酸化に影響を与えなかった。5、wortmanin、LY294002 は p44/p42 MAP kinase、SAPK/JNK のリン酸化に影響を与えなかった。以上より、FGF-2 は p44/p42 MAP kinase、SAPK/JNK 経路とは独立して、PI3 kinase/Akt 経路を介して GDNF 遊離を促進することが示された。

(5)1、静脈麻酔薬の midazolam は C6 細胞において IL-1 による IL-6 遊離を抑制した。2、IL-1 による IL-6 遊離は wedelolactone (IκB kinase の阻害剤)、SP600125 (SAPK/JNK の阻害剤)、JAK inhibitor I (JAK の阻害剤)によって抑制されたが、PD98059 (MEK1/2 の阻害剤)は影響を及ぼさなかった。3、midazolam は IL-1 による STAT3 のリン酸化を抑制したが、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、IκB には影響しなかった。以上より、midazolam は IL-1 による STAT3 の活性化抑制を介して IL-6 遊離を抑制することが示された。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1 Zhang L, Tanabe K, Yanagidate F, Kawasaki Y, Chen G, Dohi S, Iida H: Different effects of local anesthetics on extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in rat dorsal horn neurons. Eur J Pharmacology. 査読有 2014 In Press
- 2 Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H: Dexmedetomidine suppresses interleukin-1β-induced interleukin-6 synthesis in rat glial cells. Int J Mol Med. 査読有 2014 In Press
- 3 Chen G, Tanabe K, Yanagidate F, Kawasaki Y, Zhang L, Dohi S, Iida H: Intrathecal

endothelin-1 has antinociceptive effects in rat model of postoperative pain. Eur. J. Pharmacol. 査読有 696, 40-46, 2012

4 Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Iida M, Kozawa O, Iida H: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt on basic fibroblast growth factor-induced glial cell line-derived neurotrophic factor release from rat glioma cells. Brain Res. 査読有 1463, 21-29, 2012

5 Tanabe K, Kozawa O, Iida H: Midazolam suppresses interleukin-1β-induced interleukin-6 release from rat glial cells. J Neuroinflammation 査読有 8, 68, 2011

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1 田辺久美子、Midazolam の interleukin-1 によるグリア細胞からの interleukin-6 遊離抑制機序、日本麻酔科学会第 60 回学術集会、2013.05.23-25、札幌
- 2 田辺久美子、Rho-kinase 阻害薬によるグリア細胞からの Interleukin-6 産生抑制機序、日本麻酔科学会第 58 回学術集会、2011.05.19-21、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田辺 久美子 (TANABE KUMIKO)

岐阜大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30402209

(2)研究分担者

小澤 修 (KOZAWA OSAMU)  
岐阜大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：90225417

(3)連携研究者

( )

研究者番号：