

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890234

研究課題名(和文) 脳内神経伝達からみた吸入麻酔薬の発達脳に与える影響とその解析

研究課題名(英文) Effects of volatile anesthetic on neural circuits in the mouse brain during postnatal development

研究代表者

菅澤 佑介 (SUGASAWA, Yusuke)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80459114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス領域外受容体は脳機能調節に重要な役割を担うとされ、なかでもシナプス領域外GABA受容体はGABAに対する高い親和性と緩慢な脱感作特性を有しTonic currentを提供している。本研究では吸入麻酔薬セボフルランの領域外GABA受容体に対する作用を検討した。セボフルラン投与によりP3～35のマウス脳線条体においてTonic GABA電流は増大をみとめ、その大きさは日齢とともに増加し、GABA transporter blockerの添加でセボフルランの効果が増強された。吸入麻酔薬投与に伴う発達期のTonic GABA電流増大がその後の脳発達に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Volatile anesthetic sevoflurane, which is widely used in pediatric surgery, has proposed effects on GABA_A receptor-mediated extrasynaptic tonic inhibition. In the developing striatum, medium-sized spiny projection neurons possess tonic GABA currents, which function in excitatory-inhibitory balance and maturation of striatal neural circuits. We examined effects of sevoflurane on the tonic GABA currents of medium spiny neurons in developing striatal slices. Sevoflurane strongly increased GABA_A receptor-mediated tonic conductance at postnatal days 3 to 35. Antagonist of GABA transporter (GAT-1) NO-711 further increased tonic GABA conductance during the application of sevoflurane, thereby increasing total magnitude of tonic currents. Our findings suggest that sevoflurane can affect the tone of tonic GABA inhibition in a developing striatal neural network.

研究分野：麻酔科学

科研費の分科・細目：麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 脳内神経伝達

1. 研究開始当初の背景

1990年代より N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体遮断薬と gamma-aminobutyric acid (GABA) 受容体作動薬がシナプス形成期の脳に対してアポトーシスを伴う神経変性を来し、その後の学習能力低下や行動異常を引き起こすという研究結果が数多く報告されている。近年の基礎医学における分子生物学・生理学の技術的進歩により、吸入麻酔薬の作用機序の解析が進められ、その分子標的がかなり明らかにされてきた。脳内抑制シナプス伝達を担っている GABA 受容体やグリシン受容体などの受容体チャネルの活性増強や興奮性シナプス電位の抑制、さらには静止膜電位の形成に関与するリーク型カリウムチャネルの活性化等が報告されている。

元来、シナプス伝達は静的なものではなく、むしろさまざまな因子や操作により正の方向にも負の方向にも調節できる一連の高度かつダイナミックな過程を含んでいる。またシナプスにおいては、入力線維の短い反復刺激がグルタミン酸作動性シナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation; LTP) を引き起こすことが観察されており、LTP が学習および記憶に関与すると考えられている。このように脳神経系では多数の神経細胞がネットワークを形成しており、我々麻酔科医が日常的に使用している吸入麻酔薬もこの神経ネットワーク活動に影響を与える可能性が高い。幼児期の吸入麻酔薬暴露が学習障害や行動異常を誘発する可能性が指摘され、その作用機序の中心に大脳皮質および海馬が取りあげられている。これまで我々は、神経情報の入力と出力が定量的に発現している大脳皮質 基底核の神経回路を対象として、吸入麻酔薬が神経伝達機能に与える影響について検討してきた。

近年多くの脳機能分子が明らかにされつつあるが、麻酔科学研究の中心的課題である麻酔薬の神経回路内伝達制御原理は解明に至っていない。Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) は神経細胞に豊富に存在し、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合タンパク、イオンチャネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによってそれらタンパク機能を調節し、シナプス伝達の可塑性、さらには学習・記憶をはじめとする高次脳機能に重要な役割を果たすと考えられている。そこで本研究では、大脳皮質や海馬において学習や記憶に関与するとされる CaMK をはじめ、プロテインキナーゼ C (PKC)、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 系、および神経終末端の G タンパク質の伝達物質放出調節における吸入麻酔薬の影響について免疫ブロットにより定量し、その発現機序を解析したい。

2. 研究の目的

吸入麻酔薬は小児手術でも一般的に使用されるが、その作用機序は未だに解明されていない。これまで数多くの研究結果から吸入麻酔薬が発達期の脳に与える影響が報告されており、曝露後の学習能力低下や行動異常を引き起こすとされている。脳内では多種多様の膜タンパク質と細胞内シグナル分子が学習や記憶の形成に関与している。本研究ではこれらの細胞内シグナル伝達物質の定量化という生化学的仕法と Whole-cell Patch-clamp 法を中心とした電気生理学的仕法により、吸入麻酔薬暴露が発達期の脳内伝達物質放出機構に与える影響について検討する。

学習や記憶はシナプスにおける電気信号の伝達効率が変化することにより成立している。このシナプス伝達効率は伝達物質の放出効率とシナプス後細胞の受容体を介する応答効率によって決定され、いずれのメカニズムにも多種多様の膜タンパク質と細胞内シグナル分子が関与している。神経伝達に関する研究の対象観察は主に CA1 領域で行われている。これは CA1 が記憶・学習に強く影響を与える部位であると考えられているためである。また海馬にも多く存在する CaMK であるが、LTP を含めた数種類のシナプス可塑性にとって重要な酵素としてその特性が注目されており、シナプス後高密度構造にきわめて豊富に存在する多サブユニット セリン/スレオニン タンパク質リン酸化酵素である。この酵素を薬理的に阻害すると LTP が阻止され、学習と記憶に障害を与えることは広く知られている。さらにスパインの形態変化を引き起こすこと、あるいはシナプスの GABA 受容体、そして最近では K イオンチャネルの関与が重要視されているため、その関連性を解析したい。

3. 研究の方法

(1) 吸入麻酔薬長期暴露と細胞内シグナル伝達の免疫ブロットによる定量化

細胞内シグナル定量解析の意義として、海馬では Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK)、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) が記憶・学習の獲得過程に関与している。特に CaMK は海馬の興奮性入力である錐体細胞の樹状突起に高濃度に発現しているため、スパインの形態変化を引き起こし、シナプスのグルタミン受容体 (GluR1) の量を変化されることによりシナプス伝達効率を長期的に変化させるといわれている。このためシナプス伝達長期増強 (LTP)、長期抑制 (LTD) などのシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。一方、MAPK は核内の cAMP response element binding protein (CREB タンパク質) をリン酸化して神経の回路形成や生存に関与するタンパク質発現を調節している。そこで吸入麻酔薬暴露による中枢神経系への影響につい

て検討するため、マウスを吸入麻酔薬に1日あたり5時間暴露(約4~5日間)し、大脳皮質および海馬を摘出する。各組織を0.5%TritonX-100、プロテアーゼ阻害薬、ホフファターゼ阻害薬を含む可溶性バッファーでホモジナイズ、さらに遠心分離により細胞抽出液を得る。そしてCaMK、プロテインキナーゼC(PKC)、MAPKの定量変化を免疫ブロット法により解析する。また海馬では神経終末において興奮性伝達物質:グルタミン酸の放出に關与するsynapsinIを定量化し、後シナプスではAMPA受容体(GluR1)を免疫ブロットにより定量する。

(2) GABA受容体に与える吸入麻酔薬の影響

エーテル麻酔下にマウスの脳を取り出し、スライサーにより250-300 μ mの厚さの大脳皮質-線条体-海馬スライスを作製、のち有酸素下に人工脳脊髄液(pH=7.4)中に置く。これにより約6時間以上の脳スライスの生存が可能となるが、その後、大脳皮質-線条体-海馬スliceを顕微鏡下に移し、Whole cell patch clamp法を行う。刺激電極は大脳皮質上に置き、各細胞の電気生理的発火パターンを確認してそれぞれの細胞の同定を行う。現在、マウスの線条体ではmedium spiny neuron(MSニューロン)、さらにコリナージックニューロン、GABA/parvalbuminニューロン、ソマトスタチン/NOSインターニューロンの4種類の細胞が知られている。すなわち、投射ニューロンはインターニューロンから様々な制御を受け、大脳皮質からの情報を伝えていくことになるが、ここで吸入麻酔薬の添付をおこない、興奮性シナプスおよび抑制性シナプス後電位記録を取り、吸入麻酔薬によるシナプスへの影響を観察する。さらにシナプス可塑性のシンプルな一例として、Paired-Pulse Facilitation (PPF)が挙げられる。スライスに2つの連続した電氣的パルス刺激を与えると、2回目の刺激の誘発反応が1回目のものよりも高い電位として観察されるが、これは前シナプス性のメカニズムでシナプス末端へのCa²⁺イオン濃度の累積により神経伝達物質の放出が増強されるために起こるとされている。PPFはシナプスが正常に機能していることのチェックや、LTP/LTD試験を行う際の適切な刺激強度を調整するために良く使われている。このため、吸入麻酔薬の添加に関する実験でも応用できる。我々は既にGABA受容体の刺激薬であるMuscimolでの反応を得ているが、ここでは線条体や海馬における吸入麻酔薬のGABA受容体への応答を検討する。

(3) 虚血神経終末端のGタンパク質の伝達物質放出調節における吸入麻酔薬の影響

伝達物質の放出抑制に働く3量体Gタンパク質のほかに神経終末端内には単量体Gタンパク質が存在する。Gタンパク質の活性阻害薬や促進剤をそれぞれcalyx of Held神経終末端内に直接注入し、シナプス反応の振幅に対する作用をみる。また高頻度刺激によるシ

ナプス抑制と回復時間を検討する。この高頻度刺激により枯渇したシナプス小胞の補給をこの単量体Gタンパク質は促進すると予想されるが、吸入麻酔薬への曝露によりどのような影響を受けるかを解析する。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系のGABAによる抑制作用は発達期においても重要な役割を果たしていると考えられており、それに対する麻酔薬の影響も懸念されている。我々は脳発達期のtonic電流に対する麻酔薬の影響についての実験を進めている。方法は日齢(P)3~35のマウス脳スライスを作成し、線条体:medium spiny neuron(MSN)からwhole-cell patch-clampを用いて細胞内電流を測定した。電圧は0mV固定とし、人工脳脊髄液にスライスを灌流、灌流液にセボフルランを添加し吸入麻酔薬のtonic電流に対する作用を観察した。結果はP3~35でtonic GABA電流が記録され日齢を経るに従い増大し、P28で平衡状態に達した。また全ての日齢でセボフルランの添加によりtonic電流の増強が観られた。さらにGABA transporter(GAT)のtonic電流への影響を観察するため、GAT-1のblockerであるNO-711を添加した。NO-711の添加で同様にtonic電流は増大しその度合いはP14で有意に増大していた。これらの結果からはセボフルラン投与によってtonic電流が増強されており、吸入麻酔薬の作用機序としてtonic電流が関与していることが示唆された。またNO-711の添加によりtonic電流が増強していたことからセボフルランは内因性GABAに反応することが考えられた。さらにP14ではセボフルランへの作用程度が異なっておりP14付近の発達過程においてセボフルラン作用機序に対する変曲点があるように思われた。発達期においてはGABA受容体サブユニットの構成変化が生じるとされており、このことがセボフルランの作用に影響している可能性がある。これらの結果をふまえ、発達期における吸入麻酔薬の作用とGABA受容体サブユニットの変化についての研究を進めている。

(2) 神経細胞間の情報伝達はシナプスを介するネットワークが主要な機能構造であると考えられていたが、1995年頃よりシナプス領域外に存在する受容体の機能と特性が明らかとなり、それまで脇役であったこの領域外受容体が脳機能調節に重要な役割を担うことが理解されてきた。なかでもシナプス領域外GABA受容体はGABAに対する高い親和性と緩慢な脱感作特性から、細胞周囲のGABA濃度センサーとして働き、持続的な電流(Tonic current)を提供している。我々の研究でも、吸入麻酔薬(セボフルラン)の領域外GABA受容体に対する強力な作用が観察された。2MACの吸入麻酔薬投与(MAC;最小肺泡濃度)によりいずれの日齢(P7、P14、P21、P28)でもTonic GABA電流は増大をみ

とめ、また GABA transporter blocker の添加でセボフルランの効果が増強されたことから、中因性 GABA に反応して Tonic GABA 電流を増大させていると考えられた。即ち線条体細胞ではセボフルランが Tonic GABA 電流を増大させた。さらにその大きさは生後 7 日 (P7) から 28 日 (P28) までは日齢とともに増加した。また細胞膜容量 () で補正すると、日齢との間に強い相関関係がみられ、この時期の Tonic GABA 電流の増大が、吸入麻酔薬の『興奮作用』と関連してその後の脳発達に影響を与える可能性が示唆された。今後は脳の成長発達課程における GABA 受容体サブユニットの変化をも含め解析を進める計画である。さらに老化モデルマウスに対する同様の実験を行い、老化現象とこの領域外 GABA 受容体との関連性の検討を加えたい。

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. Sugasawa Y, Hayashida M, Inada E: Discrete subaortic stenosis diagnosed intraoperatively. J Anesth 28: 311, 2014. 査読有
DOI 10.1007/s00540-013-1701-x
2. 菅澤佑介, 榎本達也, 松本園子, 飯田史絵, 原 厚子, 光畑裕正: 加味帰脾湯の慢性痛に対する効果. 痛みと漢方 24: 52-56, 2014. 査読有
<http://www.k-kenkyukai.com/toutsu/>
3. Kumakura S, Yamaguchi K, Sugasawa Y, Murakami T, Kikuchi T, Inada E, Nagaoka I: Effects of nitrous oxide on the production of cytokines and chemokines by the airway epithelium during anesthesia with sevoflurane and propofol. Mol Med Rep 8: 1643-8, 2013. 査読有
DOI: 10.3892/mmr.2013.1745
4. Sugasawa Y, Hayashida M, Yamaguchi K, Kajiyama Y, Inada E: Usefulness of stroke volume index obtained with the FloTrac / Vigileo system for the prediction of acute kidney injury after radical esophagectomy. Ann Surg Oncol 20: 3992-8, 2013. 査読有
DOI 10.1245/s10434-013-3084-5
5. Kasagi Y, Hayashida M, Sugasawa Y, Kikuchi I, Yamaguchi K, Okutani R, Takeda S, Inada E: Antiemetic effect of naloxone in combination with dexamethasone and droperidol in patients undergoing laparoscopic gynecological surgery. J Anesth 27: 879-884, 2013. 査読有
DOI 10.1007/s00540-013-1630-8

[学会発表](計 3 件)

1. 安藤望, 三浦正巳, 青崎敏彦, 菅澤佑介, 工藤治, 西村欣也, 稲田英一: 発達期のマウス線条体における tonic GABA 電流への吸入麻酔薬の影響と作用機序. 日本麻酔科学会 第 60 回学術集会. 2013 年 5 月 23 日 ~ 25 日. 札幌
2. 本間裕之, 菅澤佑介, 山口敬介, 林田眞和, 稲田英一: 食道癌手術終了時の S V I 低値は術後腎機能障害の危険因子になり得るか? 日本麻酔科学会 第 60 回学術集会. 2013 年 5 月 23 日 ~ 25 日. 札幌
3. 若林彩子, 山口敬介, 菅澤佑介, 北嶋由佳, 熊倉誠一郎, 稲田英一: 麻酔法の違いによる食道癌手術の気道炎症及び全身性炎症の比較検討. 日本麻酔科学会 第 60 回学術集会. 2013 年 5 月 23 日 ~ 25 日. 札幌

6. 研究組織

研究代表者

菅澤佑介 (SUGASAWA, Yusuke)

順天堂大学医学部 准教授

研究者番号: 80459114