

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462432

研究課題名(和文)敗血症時の脳内サイトカイン誘導に麻酔薬が及ぼす影響についての分子生物学的検討

研究課題名(英文)Effect of anesthetics on sepsis-induced cerebral inflammatory cytokine upregulation

研究代表者

田中 具治 (Tanaka, Tomoharu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10402893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：全身麻酔薬(代表的薬剤としてイソフルランおよびプロポフォール)は、マイクログリアの培養系において、LPS刺激下での炎症性サイトカインとくにIL-1bの誘導を、容量/時間依存的に抑制した。また麻酔薬は、LPSにより誘導されるMAPKのリン酸化を抑制し、この機構が麻酔薬作用の機序であることが示唆された。一方、マウスにLPSを投与した敗血症モデルにおいても、イソフルランは脳内のIL-1b誘導を抑制し、血中ACTHの誘導も抑制することが示された。以上から、麻酔薬は敗血症時の脳内IL-1b誘導を抑制し、副腎-下垂体軸によるストレス反応に大きな影響を与える可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：General anesthetics including isoflurane and propofol time- and dose-dependently suppressed inflammatory cytokine, especially IL-1b, upregulation induced by LPS in microglia cell line. Both anesthetics significantly suppressed the phosphorylation of MAPK, and the result suggested that the effect of anesthetics on MAPK is the essential mechanism of cytokine suppression. In the experiment adopting sepsis model mice, isoflurane significantly suppressed IL-1b induction in brain, and decreased ACTH concentration in blood. Those results suggested that general anesthetics affect the sepsis-induced IL-1b induction in brain, and may have a great impact on stress response using hypothalamus-adrenal gland axis.

研究分野：麻酔科学

キーワード：マイクログリア IL-1b 麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症によって全身に炎症反応が引き起こされると、この一環として脳内にも炎症反応が発生し、発熱、食思不振や無気力といった行動の変化、視床下部 / 下垂体 / 副腎軸を介するストレスホルモンの分泌といった一連の反応が開始される。脳における炎症反応は、急性期には、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-)の産生により開始されるが、これらサイトカインは主としてマイクログリアやアストロサイトといったグリア細胞によって産生される。

申請者らのグループでは、これまで麻酔・鎮静薬がグリア細胞に及ぼす影響について報告してきた。その中で、申請者は、マウス由来初代培養グリア細胞において、全身麻酔薬(イソフルラン、プロポフォール、バルビタール、ミダゾラム、ケタミン)が共通して、リポ多糖(Lipopolysaccharide, LPS)刺激下での炎症性サイトカイン、特にIL-1の誘導を、転写レベルにおいて濃度依存的に抑制することを見いだした。

これまで、全身麻酔薬のグリア細胞に対する作用については、まだ十分研究がなされていないが、申請者らが見いだした多数の全身麻酔薬によるIL-1誘導の抑制は、全身麻酔薬がグリア細胞への共通した作用を有することを示唆するものであり、その機序について研究することで、全身麻酔薬の作用の新たな一面を明らかにできるのではないかと考える。

また、臨床的には、近年、敗血症患者が相対的副腎不全を併発し、その程度が予後に影響するとの報告がなされている。一方、基礎医学的には、敗血症モデルマウスを用いた実験において、脳内IL-1誘導が抑制されると副腎からのグルココルチコイド産生が激減することが報告されており、脳内IL-1の誘導は、敗血症時の副腎の反応に大きく影響しうると考えられる。

重症敗血症患者には、しばしば麻酔・鎮静薬の投与が必要となるが、麻酔薬が脳内IL-1誘導を抑制する場合、これが視床下部 / 下垂体 / 副腎軸の反応を抑制して、患者の予後に影響する可能性があると考えられる。実際、臨床的には、集中治療室において、重症患者に対する麻酔薬の投与が少ないほど予後が改善するとの報告があり、現在より適切な麻酔・鎮静薬の投与量、投与方法が検討されているが、申請者らの研究はこれらの試みに対して理論的根拠を与えうると考えている。

## 2. 研究の目的

全身麻酔薬・鎮静薬が、特に敗血症時の脳内サイトカイン誘導に与える作用とその臨床

的影響について明らかにする。

これまでほとんど不明であった全身麻酔薬のグリア細胞に対する作用を、炎症性サイトカイン、特にIL-1誘導の抑制という現象を介してより詳細に検討することが可能である点が、本研究の最大の特色である。予備実験からは、麻酔薬が直接的にグリア細胞とくにマイクログリアに作用している可能性が示唆されており、脳におけるグリア細胞の重要性が近年の研究により明らかになってきていることもあわせて、申請者の研究は、全身麻酔薬の作用の研究において新たなきっかけを与えるものと期待される。

また、敗血症時の視床下部 / 下垂体 / 副腎軸の反応の重要性を考慮すると、麻酔薬によるこれらの反応に対する抑制が、患者の予後に重要な影響を与える可能性が十分ありうると考えられる。その場合、薬剤間での脳内IL-1誘導抑制やグルココルチコイドの血中濃度の差を検討することで、敗血症患者管理において、より適した麻酔・鎮静薬を選択する理論的根拠を与えることが可能となると考えている。

## 3. 研究の方法

### (細胞を用いた研究)

アストロサイトおよびマイクログリアの初代培養系を樹立し、LPS投与下での炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-)誘導に各種麻酔薬が及ぼす影響について検討する。またLPS刺激によるIL-1誘導機構として、既知のものではNF- $\kappa$ B、AP-1といった転写因子を介するものやMAPK経路などが考えられるが、麻酔薬による抑制はどの部分に作用するものかを明らかにする。

初代培養マイクログリア、アストロサイトを用いて、細胞生物学的手法を用いて麻酔薬投与下でのLPS刺激による炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-)の誘導変化とそのメカニズムを検討する。

### #2 実験小動物を用いた実験系

敗血症モデルマウスを作成した後、麻酔薬に暴露し、脳における炎症性サイトカイン誘導とストレスホルモン分泌に及ぼす変化を分子生物学的手法により検討する。

### (マウスを用いた研究)

LPSの腹腔内投与や盲腸結紮穿刺により敗血症モデルマウスを作成したのち、各種麻酔薬に暴露し、脳内の炎症性サイトカイン誘導への影響を検討する。また末梢血中のACTHやグルココルチコイド濃度を測定し、視床下部 / 下垂体 / 副腎軸の反応に麻酔薬がどのように影響するかを検討する。さらにオピオイ

ドやデクスメトミジンなど鎮静目的で使われる他の薬剤で同様の実験を行い、ストレスホルモンに対する影響やマウス致死率の差を検討し、最適な麻酔・鎮静薬投与方法の確立のための基礎的データとする。

#### 4. 研究成果

全身麻酔薬(代表的薬剤としてイソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)は、マイクログリアの培養系(BV-2細胞)において、LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)刺激下での炎症性サイトカインとくに IL-1 $\beta$ mRNA の誘導を、容量/時間依存的に抑制した。また麻酔薬は、LPS により誘導される IL-1 $\beta$  の細胞内蛋白濃度も有意に抑制した。

機序として、炎症性サイトカインの誘導経路としてすでに報告されている NF- $\kappa$ B、AP-1 について検討したが、麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)の有意な影響は認められなかった。一方別の炎症性サイトカイン誘導経路としては、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase)のリン酸化、とくに細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK1/2: Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2)が報告されている。そこで、BV-2細胞を使用した系において、LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)刺激下での ERK のリン酸化について検討したところ、麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)は有意に ERK 1/2 を抑制することが示された。一方、ERK を阻害薬(PD98059)によってあらかじめ抑制しておいた実験系においては、BV-2細胞における LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)刺激下での炎症性サイトカイン誘導は劇的に抑制され、麻酔薬による負荷的な抑制は認められなかった。加えて、他の分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼである p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(p38 MAP kinase)や JNK(c-Jun N-terminal kinases)では、麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)の有意な作用は認められなかった。以上から、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼとくに細胞外シグナル調節キナーゼのリン酸化の抑制作用が、麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)のマイクログリアにおける炎症性サイトカイン抑制作用の詳細な機構であることが示唆された。

一方脳内における炎症性サイトカインの産生源としては、マイクログリア以外にもアストロサイトも報告されている。実際にマウス脳よりアストロサイトを主体とする混合グリア細胞の初代培養系を用いて検討したと

ころ、麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)は、やはり LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)刺激下での炎症性サイトカインとくに IL-1 $\beta$  mRNA の誘導を、容量/時間依存的に抑制した。しかしながら、アストロサイトの培養系細胞である A-1細胞を使用してやはり同様の実験を行ったところ、LPS 刺激下での炎症性サイトカインとくに IL-1 $\beta$  mRNA の誘導自体がはっきりと認められなかった。従って上記の結果から、麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)の炎症性サイトカイン抑制作用の主たる対象としては、少なくともマイクログリアが主体であり、アストロサイトの関与は否定できないにしても、あくまで福次的なものであることが示唆された。

また、これら培養細胞系を使用して得られた麻酔薬の炎症性サイトカイン抑制作用が、in vivo の系でも確認できるかどうかを明らかにするために、マウスの敗血症モデルを使用した。具体的には、Balb/c マウスに LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)を腹腔内投与したのち、マウス脳内の炎症性サイトカインの誘導を麻酔薬(イソフルラン)投与下において比較検討した。マウス前脳皮質内および視床下部において、LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)投与により炎症性サイトカインとくに IL-1 $\beta$  mRNA の誘導が有意に促進された。この IL-1 $\beta$  mRNA の誘導はイソフルランの同時投与により有意に抑制された。また、脳全体をホモジナイズしたのち、蛋白を溶解し、これを Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)法を使用することによって、脳内の IL-1 $\beta$  蛋白濃度を測定した。この測定系により脳内の IL-1 $\beta$  蛋白濃度は、LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)の腹腔内投与によって、有意に上昇しており、これが、麻酔薬(イソフルラン)の同時投与によって、有意に抑制されていた。最後に、脳内とくに視床下部の IL-1 $\beta$  によって大きな影響を受けることが報告されている血中の副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)濃度を、やはり ELISA 法を使用して計測した。血中の ACTH 濃度は、LPS(Lipopolysaccharide, リポ多糖)腹腔内投与によって有意に上昇し、これが麻酔薬(イソフルラン)の同時投与によって有意に抑制していた。

以上の結果から、以下の実験的知見を得た。

(1)麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)は、マイクログリア系培養細胞(BV-2)の LPS 刺激下での IL-1 $\beta$  誘導を転写レベルまた蛋白レベルにおいて共通して抑制すること。

(2)麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォー

ル、ケタミン、チオペンタール)は、マイクログリア系培養細胞(BV-2)のLPS刺激下でのMAPKのリン酸化を共通して抑制し、(1)のメカニズムとして、このMAPKとくにERKのリン酸化が大きく関与している可能性があること。

(3)一方麻酔薬は、LPS刺激下でのNF- $\kappa$ Bや、AP-1の活性化には有意な影響を示さないこと。

(4)マウス敗血症モデルにおいて、脳内のIL-1 $\beta$ 誘導を麻酔薬(イソフルラン)は、転写レベル、蛋白レベルにおいて有意に抑制すること。

(5)マウス敗血症モデルにおいて、血中ACTHの上昇が、麻酔薬(イソフルラン)の投与によって抑制されること。

以上の(1)~(5)の知見から、全身麻酔薬には、共通作用(IL-1 $\beta$ の誘導抑制作用とその基礎となるMAPKのリン酸化抑制作用)があることが示された。検討した麻酔薬(イソフルランおよびプロポフォール、ケタミン、チオペンタール)は、いずれも、臨床的に“全身麻酔作用”を有していることは共通しているが、その化学的性質は、共通していることは少ないと考えられる。もちろんこれら全身麻酔薬が何故作用するのかという根源的な問題に対する解答は現在不明であるが、この一見まったく共通した性質がないように考えられる全身麻酔薬が、このような分子生物学的に明らかにできる共通作用を有するのは、ある意味驚くべきことであり、麻酔薬の作用の興味深い一面を明らかにできたのではないかと考える。これらの作用の詳細な機構をさらに明らかにしていくことにより、麻酔薬の生体における本質的な作用が明らかになっていくことが期待される。

一方臨床的には敗血症性ショックの患者が、集中治療を要するため、ICUにおいて鎮静薬、麻酔薬を投与されることは、一般的に経験されることと考える。これら患者における、視床下部/下垂体/副腎軸を主体とするストレス応答は重要であるが、この反応に麻酔薬が有意な影響を与えうることが本研究から明らかとなった。このことは適切な鎮静が患者予後に影響する可能性を示唆するものであり、臨床的に有意な意義を有しうると考えられる。

## 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1件)

Tanaka T, Kai S, Matsuyama T, Adachi T,

Fukuda K, Hirota K. General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1 expression in glial cells.査読有、PLoS One、2013 Dec 11;8(12):e82930. doi: 10.1371/journal.pone.0082930.

[学会発表](計1件)

田中 具治、廣田 喜一、甲斐 慎一、松山 智紀、福田 和彦  
麻酔薬は敗血症時の視床下部における炎症性サイトカイン誘導を抑制する。

General anesthetics suppress sepsis-induced up-regulation of inflammatory cytokines in mice hypothalamus、日本麻酔科学会第60回学術集会、2013 (最優秀演題を獲得)

[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

京都大学医学部附属病院麻酔科(侵襲反応制御医学講座)のホームページ、研究室案内の“脳内サイトカイン誘導に及ぼす麻酔薬の影響について”( <http://anesthesia.kuhp.kyoto-u.ac.jp/> )において、本研究の内容について記載している。

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 具治 (TANAKA, Tomoharu) 京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教  
研究者番号：10402893

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
廣田 喜一 (HIROTA, Kiichi)、関西医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00283606