

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861252

研究課題名(和文) In vitroイメージングを用いた吸入麻酔薬セボフルランの標的分子の探索

研究課題名(英文) Characterization of sevoflurane effects on Per2 expression using ex vivo bioluminescence imaging of the suprachiasmatic in transgenic rats

研究代表者

安齋 めぐみ (Anzai, Megumi)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30719000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬による時計遺伝子Per2発現抑制を麻酔効果の指標として、吸入麻酔薬の作用メカニズムの解明を目的としている。

1)発光タンパク質ルシフェラーゼを発現するトランスジェニックラットから視交叉上核スライス培養を作成し、sevoflurane投与下でルシフェラーゼ発光のイメージングを行い、領域による応答性の差異、時刻による応答性の差異を検討した。更に薬理的な実験から麻酔薬への応答にはGABA受容体の活性が必要であることを明らかにした。2) 麻酔により誘起される生化学的イベントの詳細な解析を進めるため、株細胞GT1-7を用いた麻酔応答系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Remarkable and reversible suppression of Per2 mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus (SCN) by inhalation anesthetics is considered as a biochemical marker of the anesthetic effect. This project aims to elucidate the mechanism of inhalation anesthetics paying attention to this suppressive effect. 1) We adopted an imaging system for SCN slices derived from Per2-dLuc transgenic rats. This system was able to examine the intra-SCN regional specificity, time-dependency, and pharmacological basis of sevoflurane-effects. Pharmacological experiments revealed that GABAergic signals played important roles in the anesthetic effect.

2) The SCN contains various types of neurons, and this complexity makes it difficult to investigate the molecular mechanisms of anesthesia. Here, we established an in vitro experimental system using a cell line, GT1-7, which will open up the possibility to investigate more precisely the mechanisms underlying anesthetic action.

研究分野：麻酔科学

キーワード：時計遺伝子 Per2 sevoflurane phase-shift 概日リズム GABA受容体 株細胞

1. 研究開始当初の背景

吸入麻酔薬による全身麻酔は手術において頻用されているが、その標的分子に関する研究はほとんど行われていない。我々の研究グループは先行研究において、吸入麻酔薬 sevoflurane が各臓器の多くの遺伝子の発現に影響を与えることを報告した(Sakamoto et al, 2005)。その中で、麻酔薬の標的増加と考えられている脳において、時計遺伝子の一つである *Per2* の発現抑制が認められた。生物は約 24 時間周期の概日リズムを維持しており、これは睡眠や覚醒、体温、ホルモン分泌などのリズム制御を行う生命活動の根本的な生体機能といえる。この概日リズムは、時計遺伝子と呼ばれる転写因子をコードする一連の遺伝子によって保たれている。我々が着目している *Per2* 遺伝子は、自身のタンパク質による負のフィードバックによって約 24 時間の周期的発現を示し、ほかの時計遺伝子群の発現を調整するため、時計遺伝子の中核であると考えられている。また *Per2* は、時計遺伝子の中で最も解析が進んでいる遺伝子の一つであり、概日リズムの制御中枢である視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) に強く発現することが知られている。近年、我々のグループが行った *Per2* を標的とした研究により、以下の事実が明らかとなった。

- 1) 視交叉上核において sevoflurane がマウス、ラットの *Per2* 発現を可逆的に抑制する (Ohe et al. 2010, Anzai et al. 2013)。
- 2) *Per2* プロモーター制御下で発光タンパク質ルシフェラーゼを発現するトランスジェニックラット (*Per2-dLuc* トランスジェニックラット) より単離した SCN の培養切片に、sevoflurane による発光リズムの位相変化が認められることから、sevoflurane による視交叉上核への作用は脳内のほかの神経核・血中ホルモン濃度などを介した間接的な作用ではなく、SCN への直接的作用であることが

明らかとなった (Anzai et al, 2013)。

3) sevoflurane による *Per2* 発現抑制はエピソード的な効果を示すことを見出した (Mori et al 2014)。

2. 研究の目的

先行報告を踏まえ、SCN への麻酔作用として、以下の問題を設定した。

SCN の神経細胞は麻酔に影響をいずれも同様に受けるのか？

麻酔薬の投与時刻により、SCN の応答は異なるのか？

海馬では GABA 受容体を介した麻酔薬への応答が報告されているが、SCN においても麻酔薬 sevoflurane は GABA 受容体そのもの、もしくはその下流の細胞内シグナル伝達因子のいずれかを標的分子としているのか？

麻酔により誘起される生化学的イベントに関して、これ以上の詳細な解析を進めるためには、SCN は領域が小さく、多種類の神経細胞で構成されており、生化学的な分析には不向きである。そこで均一で大量調整が可能な株細胞を用いた麻酔応答系の確立を試みる。

3. 研究の方法

□ *Per2-dLuc* トランスジェニックラットから SCN スライス培養を作成し、高感度 CCD カメラ付き顕微鏡システムによって発光のイメージングを行った。吸入麻酔薬 sevoflurane をスライス培養に投与する SCN の撮影画像を背内側、背外側、腹内側、腹外側の 4 領域に分割し、それぞれの領域での sevoflurane 下での発光リズムへの影響を検討した。

発光リズムの上昇開始期 (6a.m ~ 14-p.m.)、

上昇期後期(14p.m~22p.m.)、下降期(22p.m.~6a.m.)に sevoflurane を投与して、応答を比較した。

GABA_A 受容体阻害剤(bicuculline)、GABA_B 受容体阻害剤単独ずつあるいは、両方投与し、それぞれの培養条件での sevoflurane による発光リズムへの影響を検証した。

マウス視床下部由来の GT1-7、ラット SCN 由来の N14.5 細胞の cell line に *luc* 遺伝子をトランスフェクションし安定的に *dLuc* 遺伝子を発現する GT1-7:6D3、N14.5:4B8.1 を確立した。*Per1-dLuc* を発現する SCN 由来の株細胞 RS182 と合わせて、発光をリアルタイムで計測し、麻酔薬投与による発光リズムへの影響を検討した。

4. 研究成果

SCN 内のすべての領域において麻酔薬への応答性に差はなく、SCN 内の全ての細胞が麻酔薬に応答すると考えられる。

発光リズムの上昇開始期では麻酔処置中は発光量が低下を続け、位相が後退した。上昇後期では、麻酔により位相の前進が、下降期では発光リズムに影響は認められなかった。以上より麻酔薬は位相により異なる効果を概日リズムに与えることが明らかとなった。

GABA 受容体阻害剤を用いた実験により、GABA 受容体阻害剤単独投与では sevoflurane 投与により麻酔効果は消失しなかったが、両方の阻害剤を投与すると麻酔による発光リズムへの影響は消失した。sevoflurane が発光リズムに影響を及ぼすためには、GABA 受容体 A、B のいずれかは機能できなければならないと推察される。

株細胞に一定濃度の吸入麻酔を投与しつ

つ培養し、発光リズムをモニターできるシステムを開発した。視床下部由来の株細胞 GT1-7:6D3 細胞では sevoflurane により発光が抑制され、発光リズムの位相変化を観察した。このシステムにより、GT1-7:6D3 を用いて麻酔薬へ応答する際の生化学的な変化の詳細解析を進める展望が開けた。

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)

Matsuo I, Iijima N, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Sakamoto A, Ozawa H. Characterization of sevoflurane effects on *Per2* expression using ex vivo bioluminescence imaging of the suprachiasmatic nucleus in transgenic rats.

Neuroscience Reseach.査読有 2015年
DOI:10.1016

Nagamoto S, Iijima N, Ishii H, Takumi K, Higo S, Aikawa S, Anzai M, Matsuo I, Nakagawa S, Takashima N, Shigeyoshi Y, Sakamoto A, Ozawa H.

Establishment of an in vitro cell line experimental system for the study of inhalational anesthetic mechanisms. Neuroscience Reseach.査読有 2016年
DOI:10.1016

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

永本盛嗣、飯島典生、相川優子、石井寛高、肥後心平、託見健、安齋めぐみ、坂本篤裕、小澤一史. 2015年株化細胞を用いた in vitro 吸入麻酔薬作用解析実験系の確立. 第42回日本神経内分泌学会 第23回日本行動神経内分泌研究会 合同学術集会 9月、仙台

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

安齋 めぐみ (ANZAI, Megumi)
日本医科大学 医学部 助教
研究者番号：30719000

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

飯島 典生 (IIJIMA, Norio)
日本医科大学 医学部 准教授
研究者番号：00285248

坂本 篤弘 (SAKAMOTO, Atsuhiro)
日本医科大学 大学院 医学研究科 教授
研究者番号：30196084

小澤 一史 (OZAWA, Hitoshi)
日本医科大学 大学院 医学研究科 教授
研究者番号：60169290

肥後 心平 (HIGO Shinpei)
日本医科大学 医学部 助教
研究者番号：50623922

託見 健 (TAKUMI, Ken)
日本医科大学 医学部 助教
研究者番号：40553269