

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08873

研究課題名(和文) 精神的ストレスで惹起される循環障害の細胞内機序と麻酔薬の修飾効果に関する研究

研究課題名(英文) Circulatory derangement resulting from mental stress and the modification caused by anesthetics

研究代表者

木下 浩之 (KINOSHITA, Hiroyuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：70291490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、すでに研究代表者らが明らかにしている思春期で発生する揮発性麻酔薬セボフルラン吸入で発生する恐怖記憶定着モデルマウスで、記憶障害個体と血管内皮機能障害の関連の有無を明らかにすることを目的とした。記憶障害マウスでは、アセチルコリンによる大動脈血管内皮依存血管弛緩反応が減弱していた。しかし、その機序は明らかにできていないため、これについては今後の研究が待たれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにされた揮発性麻酔薬セボフルランによる恐怖記憶定着モデル動物での血管内皮機能障害は、臨床麻酔の現場で恐怖を強く感じた個体で血管の機能が異常をきたす可能性を示唆するものである。すなわち、精神ストレスと心血管障害との因果関係の一部を明らかにした点で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The current study was conducted to evaluate the relationship between memory disturbance and endothelial dysfunction in the adolescent mice undergoing the volatile anesthetic sevoflurane inhalation. In the model with memory disturbance, we found that the endothelium-dependent relaxation of the mice aorta was significantly impaired, whereas the action mechanisms have been unclear. Further studies will require to verify them.

研究分野：麻酔学

キーワード：麻酔薬 記憶 血管内皮機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまで、思春期マウスのセボフルラン吸入が恐怖記憶（心的外傷後ストレス障害 = PTSD）形成に及ぼす影響を明らかにしてきた。幼若あるいは高齢マウスとは逆に、生後4週思春期マウスでは、その吸入により恐怖記憶定着が増強し、海馬で記憶に伴う細胞骨格構成が増強することを研究代表者らは明らかにした。しかし、これらPTSDモデル動物の記憶に対する麻酔薬作用が、どのような細胞内機序で年齢という時間窓での相違を発生させるかは不明であり、研究代表者らも今まで検討していない。近年、臨床アウトカム研究で、PTSDが心血管疾患発症のリスクファクターとなりうることが示唆されている。PTSD患者では、血漿中エンドセリン1レベルが上昇傾向にあるが、PTSDが心血管疾患を発生させる機序の詳細は不明である。しかし、これらPTSD動物での内皮障害発生の機序は不明である。オートファジーは細胞を再構築するホメオスタシス機構であるが、当初は、発ガンや加齢など各種病態の誘因であるとされていた。一方で、これがストレス下で生体が生存するために役割を果たすことが近年示唆されるようになった。実際、動物では、オートファジーを維持すると、加齢に伴う記憶および心血管機能障害を改善、予防できるが、年齢という時間窓でこれらの作用が変化するかは不明である。また、オートファジーが、麻酔薬で増強する恐怖記憶やそれに伴う心血管障害にどのように関与するかも未知である。ヒトの恐怖記憶や不安の構築、心血管系機能制御にオートファジーが関与するかについての知見は乏しい。妊婦は出産に対する不安など種々の精神的ストレスにさらされており、一種のPTSDモデルと言える。また、子癩前症妊婦では、血管への酸化ストレス増大に伴う内皮機能障害が発生するとされており、研究代表者らもそれを最近報告した。これら病態等で、精神的ストレスや心血管病態の重症度とヒト組織中オートファジー活性の関係は臨床では明らかでなく、その連関に対する麻酔薬の修飾作用も未知である。

2. 研究の目的

(1)麻酔薬暴露で増強する恐怖記憶定着でのオートファジーの関与を解明：思春期のみで発生する麻酔薬による恐怖記憶定着(PTSDモデル動物)の機序に年齢という時間窓での脳オートファジー活性の変化が関与するか、さらに、オートファジー活性化および抑制物質投与がこれらの恐怖記憶定着にどのように影響するか、を明らかにする。

(2)恐怖記憶定着個体での体循環障害の機序とオートファジーの役割を解明：恐怖記憶の定着(PTSDモデル動物)が体循環での内皮機能障害を引き起こす機序に体血管局所でのオートファジーの関与はあるか、オートファジー活性化および抑制物質全身投与や血管への直接適用はこれら血管機能異常にどのように影響するか、を明らかにする。

(3)恐怖記憶が体循環障害を惹起する伝播経路の解明：PTSDモデル動物の恐怖を記憶した脳から体循環異常を惹起するストレス信号伝達の機序として体液性因子に着目する。すなわち、エンドセリン1、循環を制御するmiRNA、オートファジーマーカー、オートファジー活性化あるいは抑制物質が、恐怖記憶を体循環へ伝播する因子あるいは制御物質かを明らかにする。

(4)女性周術期の精神ストレスおよび心血管障害の程度と摘出組織中オートファジー活性の関連の解明：(1)-(3)で検討するオートファジー活性が恐怖や不安、血管内皮機能や心機能異常に及ぼす作用が、思春期の卵巣腫瘍手術、妊娠期の帝王切開術、閉経後の子宮ガン手術などの各年齢層の患者で年齢という時間窓で異なるか、子癩前症をはじめとする産婦人科病態で顕著となるか、麻酔薬暴露による影響を受けるか、を臨床的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1)麻酔薬暴露で増強する恐怖記憶定着におけるオートファジーの関与

生後4週(思春期)、20週(成体)、1年(高齢)の雌C57BL6マウスに対し、パッシブアポイダンスSMARTビデオ行動解析システムで恐怖記憶定着を連続3日間観察する。初日、暗室を連結した明室に各マウスを入れ順化、2日目、マウスが明室から暗室に入室するまでを獲得時間とし暗室内で電気ショックを加えて直ちに空気2 L/分(対照群)あるいはそれにセボフルラン2.5%(セボフルラン群)を混じり2時間吸入させる。3日目、マウスが明室から暗室に入る潜時を保持時間(恐怖記憶が強力な個体は延長)とし、実験終了後に海馬を摘出、オートファジーマーカータンパク発現をウエスタンブロットティングで評価する。本実験で、思春期のみで発生する麻酔薬による恐怖記憶定着に各年齢という時間窓での脳オートファジー活性の変化が関与するか、さらに、オートファジー活性化あるいは抑制物質(3MA)の全身(腹腔内)投与はこれらの恐怖記憶定着にどのように影響するか、を明らかにする。

(2)恐怖記憶定着個体での体循環障害の機序とオートファジーの役割

生後4週(思春期)、20週(成体)、1年(高齢)の雌C57BL6マウスで恐怖記憶定着の対照群あるいはセボフルラン群を作成し記憶実験終了後に大動脈を摘出する。この血管で、内皮機能(等尺性張力変化、アセチルコリン)、活性酸素種レベル、(1)で検討したオートファジーマーカーおよび活性酸素種産生酵素NADPHオキシダーゼ発現を評価する。以上より、思春期で発生する麻酔薬での恐怖記憶定着モデルでのみ内皮機能障害が発生するか、それに血管でのオートファジー活性の変化が関与するか、さらに、オートファジー活性化、抑制物質の全身投与あるいは血管局所での適用はこれら内皮機能異常に影響するかを調べ、恐怖記憶個体での血管機能異

常でのオートファジーの関与を明らかにする。

(3)恐怖記憶が体循環障害を惹起あるいは抑制する体液性因子

(1)で作成したPTSDモデルマウスの海馬および血管でのエンドセリン1、循環を制御するmiRNA、オートファジーマーカー、オートファジー活性化あるいは抑制物質の組織中レベルの違いを調べる。海馬と血管でのレベル上昇あるいは低下傾向が同一の物質について血清中又は白血球中レベルを測定し、恐怖記憶に派生し血管へ伝播する血管障害惹起物質やその抑制因子を推測する。さらに、(2)で内皮機能改善に有効であった物質が、この血管障害惹起物質あるいはその抑制因子の海馬、血清あるいは白血球中、血管中レベルを低下もしくは上昇させるかを明らかにする。

(4)女性周術期の精神ストレスおよび心血管障害の程度と摘出血管組織中オートファジー活性の関連

思春期の卵巣腫瘍手術、正常および病的妊娠の帝王切開術、閉経後の子宮ガン手術などの各年齢層の患者で、Psychological function testで評価した術前、術後の恐怖や不安の程度、臨床的血管内皮機能検査および血中酸化ストレスマーカー（d-ROM）レベル結果と摘出血管（腫瘍血管、胎盤血管、子宮血管）でのオートファジー活性（オートファジーマーカーのレベル測定）との相関を麻酔前後の差を含め検討する。

4. 研究成果

初年度には、セボフルラン 2.5%を 2 時間吸入させて恐怖記憶が増強した思春期マウスで、アセチルコリンによるマウス大動脈血管内皮依存性拡張反応が有意に抑制されることを確認した。しかし、その後コロナウイルスパンデミックの影響で、記憶関連および臨床での研究が遂行できずに現在に至っている。パンデミック中には、今後の大掛かりな齧歯類での体血管研究の基礎的知見を得るために、大動脈および腸管膜動脈のフェニレフリン惹起収縮反応に、セボフルラン臨床濃度 2 %の適用が及ぼす作用の再確認を行なった。これは、今後のげっ歯類での血管内皮機能判定実験で拡張反応を調査する際の前収縮を引き起こすフェニレフリンの濃度を決定するのに重要な実験であり、また、これについて、これまで臨床濃度のセボフルランの影響は検討されていなかった背景がある。そこで、血管内皮温存血管ではセボフルラン 1 時間適用によりフェニレフリン収縮が有意に抑制されることを発見した。結論として、EC50-75 程度のラット腸管膜動脈収縮反応を内皮温存血管でフェニレフリンを用いて惹起する場合、セボフルランがその収縮反応を弱い有意に抑制することが明らかになった。一方、内皮非温存血管ではこの収縮反応抑制は認められなかった。しかし、インドメタシン処理では、セボフルランによるこれらの抑制反応は変化がなかった。そこで、これらの変化は血管内皮細胞の α_1 -アドレナリン受容体が関与していると推論し、その選択的アンタゴニスト BMY 7378 (10^{-8} - 3×10^{-6} M)を適用し、セボフルラン適用、非適用下でフェニレフリン惹起収縮反応を観察したが、満足行く抑制反応は証明できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaishi K, Kinoshita H, Feng G-G, Azma T, Kawahito S, Kitahata H	4. 巻 144
2. 論文標題 Cytoskeleton-disrupting agent cytochalasin B reduces oxidative stress caused by high glucose in the human arterial smooth muscle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 197-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 克哉 (TANAKA Katsuya) (30263841)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教授 (16101)	
研究分担者	北畑 洋 (KITAHATA Hiroshi) (60161486)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授 (16101)	
研究分担者	川人 伸次 (KAWAHITO Shinji) (60284296)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・特任教授 (16101)	
研究分担者	渡辺 員支 (WATANABE Kazushi) (80281187)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------