

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20390412

研究課題名(和文) 蛍光蛋白導入マウスを用いた麻酔薬による抑制シナプス伝達分子調節機構の統合解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular and cellular actions of general anesthetics on inhibitory synaptic transmission using genetically altered animals.

研究代表者

西川 光一 (NISHIKAWA KOICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00334110

研究成果の概要(和文): GFP(緑色蛍光蛋白質)導入遺伝子改変動物を用いた神経細胞イメージングは、生きたマウスやラットで分子の動きを画像化できるため、麻酔薬や疼痛による脳の生理機能変化を系統的に理解する上で有用である。我々は GFP 導入マウスを使って、生後間もない時期のセボフルランの暴露が GABA ニューロンにどのような影響を与えるかなどの検討を行った。最終年度は、小胞型 GABA/glycine トランスポーターヘテロマウス(VGAT+/- mice)を用いて、脊髄における GABA と glycine の神経細胞小胞内への取り込みを担うトランスポーターの低下が炎症性疼痛に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文): Genetically altered mice are very useful to analyze the molecular and cellular mechanisms of actions of general anesthetics and analgesics. Using GFP knock-in mice, we examined the effects of sevoflurane exposure to the developing brain, focusing on GABAergic neurons. In addition, we also investigated the possible influence of downregulation of vesicular GABA transporter (VGAT) on pain threshold and behavioral responses in mice. Our results provide genetic, behavioral and electrophysiological evidence that reduction of VGAT-mediated inhibitory drive in the spinal cord alters very specific forms of sensory processing: those related to pain processing.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

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：GABA、抑制シナプス、鎮静、疼痛、遺伝子改変マウス、イオンチャネル、神経毒性、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能は、神経細胞間のシナプス伝達を基盤としており、興奮性および抑制性シナプスを基本とする。それぞれ、グルタミン酸およびGABAなど神経伝達物質による化学伝達のプロセスによって情報処理される。

GABA受容体チャネルは、中枢神経系クロライドチャネルの1種で抑制系神経伝達の中心を担っている。分子生物学的研究から、GABA受容体は5つのサブユニットから構成され、それぞれのサブユニットが4つの疎水性膜貫通領域を持つと予想される。少なくとも16

のサブユニットをコードする遺伝子がクローニングされている(α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ , ϵ , and π)。我々のグループはこれまでに、GABA受容体は様々な麻酔薬によって修飾されることを報告した。今回の研究はこれを発展させ、GABAニューロン可視化できる遺伝子改変動物を使って、抑制ニューロン特異的に観察される麻酔薬の修飾作用を調べ、麻酔や疼痛に対する中枢神経系の生理反応を解析する。

GFP(Green Fluorescent Protein)は238のアミノ酸からなり、分子量27kDa、等電点4.6-5.1の酸性蛋白質である。GFP分子の特徴はその物理化学的安定性であり、細胞および個体内での分子の局在・動態を可視化するバイオイメージングに広く用いられている。我々は、GFPをGABA合成酵素であるGAD67に発現させたGAD-GFPノックインマウス(研究協力者 群馬大学 柳川右千夫教授より提供)を使って、マウス・ラットに長時間、あるいは繰り返しの麻酔薬投与によって、麻酔薬の主なターゲットであるGABAニューロンにどのような形態学的・機能的変化が起こり、シナプス前終末からの分泌調節機構がどう修飾されるかを調べる。GFPで可視化することで、抑制ニューロン容易に識別することが可能であり、スライス標本パッチクランプでの抑制細胞の認識に特に有用である。さらに、同GAD-GFPラット神経因性疼痛モデルにて、脊髄、大脳皮質のGABAニューロンについて解析する。

2. 研究の目的

1) 最初に、発生初期の麻酔薬の投与によってGABAニューロンの形態・機能・シナプス可塑性に不可逆的な変化は起こりうるのかを解析する。臨床濃度の麻酔薬は可逆的であるという定説は、虚血に弱いCA1領域のGFP導入された介在神経細胞では本当か?を検討する。

2) GABA合成能が下がると、痛みなどの急性侵害受容反応(hot plate test, water immersion test)がどう変化するか? GABA合成酵素ノックアウトマウスで、GABAの役割を研究する。

3) 神経障害性疼痛のメカニズムについては、末梢受容器、脊髄後根神経節、脊髄後角ニューロンの変化、さらに脊髄後角でのシナプス発芽、情報伝達系の動きなどが重要と考えられている。今回の研究では、GABAニューロンの枯渇した結果として起こる脱抑制の役割について検討する。

3. 研究の方法

今回の研究計画は、研究手法により3つの分野に分かれている。いずれもその分野を専

門とする研究協力者(役割分担と年次計画は下表)との密接な連携をとりながら、同時進行で研究を行う。

<分子生物学的研究>

GFPの発現解析: GFP導入によりGABAニューロンを可視化し、GABA神経細胞数と形態を観察する。発生初期における麻酔薬長期投与、繰り返し投与、疼痛関連モデル動物において実験し、脊髄、大脳皮質のGABAニューロンの変化に焦点を当てる。

<行動薬理学的研究>

GAD65 mouseの抗不安作用と急性侵害受容反応を解析する。Tail flick Test、Water immersion test、Open field testなどで、GABA放出の分子調節機構の役割を調べる。

<電気生理学的研究>

1) マウス海馬CA1領域スライス標本におけるGABAニューロン可視化法により、GABA作動性の抑制シナプス電流、GABA神経細胞の膜の性質を電圧応答で解析する。

2) 脊髄後根付きスライス(厚さ500 μ m)を作成して、GABA、Glycine電流の解析。

3) In vivo標本を用いた脊髄での電気生理実験: 侵害刺激を与え、刺激により誘発される興奮性シナプス後電流や、活動電位を記録する。

4. 研究成果

研究目的1のプロジェクトとして以下の研究を行った。発達期の脳に対する全身麻酔薬の長期的影響は、麻酔科医のみならず社会的にも注目を集める重要なテーマである。1990年代後半から、新生げっ歯類への麻酔薬投与が神経毒性と学習障害を起こすことが報告され、最近では新生霊長類でも麻酔薬が予定細胞死(アポトーシス)を増加させることが明らかとなった。麻酔投与後に観察されるアポトーシスの増加が、はたして学習障害や異常行動と直接的に関連するのか、

我々は初年度研究実施計画に沿って、次の研究を行った。発達期の脳への麻酔薬の影響: 出生後1-7日目の蛍光蛋白導入マウスに麻酔薬(セボフルラン1.5%、自発呼吸下に6時間)を投与して、長期的な学習能力や行動異常に関する実験を行った。生後3ヶ月までの成長と発達過程で、体重増加に有意な群間差はなく、またモリス水迷路試験での空間認知能力(2週にわたって10回以上施行)においても、セボフルラン投与群はcontrol群と有意差がなかった。一方、非学習系不安を評価できる高架式十時迷路テストでは、セボフルラン投与マウス群で、closed armに存在する時間が有意に延長していた。この結果から、僅かではあるがセボフルランが脳内神経伝達物質のバランスなどに長期的な影響を及ぼす可能性が示唆された。一方、GFP神経細

胞の可視化による抑制系神経細胞 (GABA neuron) への影響に関しては、セボフルラン (1.5%、6 時間) 投与による有意な変化が観察されなかった。しかしこれは、神経細胞数の比較であるため、抑制シナプスへの(の強さ)の影響がなかったとは結論できない。さらに研究の問題点として、使用した麻酔薬の濃度・時間は適切であったか疑問が残る。マウスにおける臨床麻酔濃度は 3% 近くであるが、この濃度では呼吸抑制が顕著になる。呼吸や循環動態は問題なく保たれていたのかなど、今後詳細な検討が必要である。

研究目的 2 のプロジェクトとして以下の研究を行った。脳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、麻酔薬の研究分野でもシナプス伝達への解析を中心に行われてきた。ところが最近、シナプス領域外に存在する受容体の機能と特性が注目され始め、それまで脇役だったはずのシナプス外受容体が脳機能調節の“主役”の扱いとなり始めた。GABA に限定すると、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) を提供する。“麻酔薬による中枢神経抑制”に関する研究分野でもこの流れに沿って、2001 年プロポフォールがシナプス外 GABA 受容体を介する抑制を強く増強することが報告されてからは、“シナプスを超えるか? シナプス外受容体の役割”が強調されるようになった。今年度大別すると、次の二つの研究論文成果を得た。一つは、全ての麻酔薬がこのシナプス外 GABA 受容体をメインに作用する訳ではない、という行動薬理学研究である。セボフルラン、ハロタンなどの揮発性麻酔薬は、確かにこの電流を増強するが、その程度は僅かで、個体レベルでの麻酔感受性変化にあまり貢献しない。これは、プロポフォールやミダゾラムによる鎮静とかなり状況が異なっている。次に、不安、痛み、ストレスなどが持続すると細胞外 GABA 濃度が低下し、シナプス外受容体を介する持続的抑制が減少する。GABA 濃度が低下した遺伝子改変マウスでの解析から、GABA 濃度の低下は熱刺激への痛覚過敏に関与するが、化学刺激への疼痛閾値には貢献しないことが判明し、これを論文発表した。また、以上の成果を公表した学会 (第 56 回日本麻酔科学会) では、最優秀演題賞も受賞した。

研究目的 3 のプロジェクトとして、神経障害性疼痛のメカニズムに関する研究を行った。末梢受容器、脊髄後根神経節、脊髄後角ニューロンの変化、さらに脊髄後角でのシナプス発芽、情報伝達系の動きなどが重要と考えら

れている。今回の研究では、GABA ニューロンの枯渇した結果として起こる脱抑制の役割を知るために、小胞型 GABA/glycine トランスポーターヘテロマウス (VGAT^{+/-} mice) を用いて、脊髄における GABA と glycine の神経細胞小胞内への取り込みを担うトランスポーター低下が、侵害受容、抑制シナプス伝達にどう影響するかを調べた。

12-16 週の WT と VGAT^{-/-} を使って、全脳・全脊髄から、GABA, glycine, glutamate の濃度を測定した。次に、急性侵害受容刺激と炎症疼痛刺激に対する反応の違いを両群で比較した。脊髄スライスを作製し、細胞直視下 (IR-DIC) に脊髄の後角神経細胞からパッチクランプ法を使って、抑制シナプス電流 (GABA-sIPSCs) を解析した。

VGAT^{+/-} マウスでは、VGAT 量が WT の約半分まで減少していたが、VGAT の低下に伴うアミノ酸量の代償性変化はなかった。GABA 作動性麻酔薬プロポフォールや NMDA 受容体拮抗作用のあるケタミンへの感受性には変化がなかったが、ホルマリントストで、VGAT^{+/-} において 2 相後期の反応時間の増加が見られた。脊髄シナプスレベルでは、自発性グリシン電流の低下が見られた。

VGAT^{+/-} マウスでは、VGAT トランスポーターの低下に伴い GABA/glycine の取り込み量が減少するため、持続的炎症性疼痛が増大する可能性が示唆された。この事実から、VGAT 蛋白が、炎症性疼痛治療の分子標的になるかもしれないことを示す貴重な結果である。

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 9 件)

1. Yamada MH, Nishikawa K, Kubo K, Yanagawa Y, Saito S. Impaired Glycinergic Synaptic Transmission and Enhanced Inflammatory Pain in Mice with Reduced Expression of Vesicular GABA Transporter (VGAT). *Molecular Pharmacology* 81:610-9, 2012 (査読あり)

2. Nishikawa K, Kubo K, Obata H, Yanagawa Y, Saito S. The influence of manipulations to alter ambient GABA concentrations on the hypnotic and immobilizing actions produced by sevoflurane, propofol, and midazolam. *Neuropharmacology* 61:172-80, 2011 (査読有り)

3. Obata H, Kimura M, Nakajima K, Tobe M, Nishikawa K, Saito S: Monoamine-dependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative pain model in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 334:1059-1065, 2010 (査読有り)
4. Takazawa T, Furue H, Nishikawa K, Uta D, Takeshima K, Goto F, Yoshimura M: Actions of propofol on substantia gelatinosa neurons in rat spinal cord revealed by in vitro and in vivo patch-clamp recordings. *European Journal of Neuroscience* 29:518-28, 2009 (査読有り)
5. Kubo K, Nishikawa K, Hardy-Yamada M, Ishizeki J, Yanagawa Y, Saito S: Altered responses to propofol, but not ketamine, in mice deficient in the 65-kilodalton isoform of glutamate decarboxylase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 329:592-599, 2009 (査読有り)
6. Nishikawa K, Matsuoka H, Saito S: Tracheal intubation with the PENTAX-AWS (Airway scope) reduces changes of hemodynamic responses and bispectral index scores compared to the Macintosh laryngoscope. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 21:292-6, 2009 (査読有り)
7. Kubo K, Nishikawa K, Ishizeki J, Hardy-Yamada M, Yanagawa Y, Saito S: Thermal hyperalgesia via supraspinal mechanisms in mice lacking glutamate decarboxylase (GAD) 65. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331:162-169, 2009 (査読有り)
8. Ishizeki J, Nishikawa K, Kubo K, Saito S, Goto F: Amnestic concentrations of sevoflurane inhibit synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons through GABAergic mechanisms. *Anesthesiology* 108: 447-56, 2008 (査読有り)
9. Kuroda M, Yoshikawa D, Koizuka S, Nishikawa K, Saito S, Goto F: The effects of isoflurane on adrenomedullin-induced hemodynamic responses in pithed rats. *European Journal of Anesthesiology* 13:1-6, 2008 (査読有り)

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 中田亮子、瀬藤容子、小川幸志、水本一弘、西川光一: 難知性の手指痛が血流障害に起因する神経障害性疼痛と考えられた一例
第 42 回日本ペインクリニック学会関西支部学術集会、2012、大阪国際交流センター
2. 徳江彩、西川光一、門井雄司、齋藤繁: 余剰麻酔ガス処理システムから吸着・回収されたセボフルラン、リセボフルPの薬理作用: マウスを使った鎮静と鎮痛に関する行動解析
日本麻酔科学会第 58 回学術集会 P1-34-6、May 19, 2011、神戸
3. 石関 淳子、西川 光一、久保 和宏、山田 真紀子、齋藤 繁: 細胞外GABA濃度がプロポフォルのシナプス可塑性抑制に影響する
日本麻酔科学会第 57 回学術集会、June 4, 2010、福岡
4. 天田 早香、田口 雅基、久保 和宏、西川 光一、齋藤 繁: セボフルラン麻酔からの覚醒への低用量レミフェンタニル持続併用の影響
日本麻酔科学会第 57 回学術集会、June 3, 2010、福岡
5. 徳江彩、西川光一、堀内辰男、荻野祐一、齋藤繁: 麻酔導入と維持に高濃度プロポフォルが必要だった術中覚醒の既往がある患者の麻酔経験
日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部第 50 回合同学術集会、Sep 11, 2010、東京
6. 齋藤博之、伊藤奈穂美、三枝里江、西川光一、齋藤繁: Issacs症候群患者の麻酔経験
日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部第 50 回合同学術集会、Sep 11, 2010、東京
7. 太田浄、西川光一、星浩子、神山治郎、齋藤繁: 食道癌術後患者のICUでの鎮静管理にエントロピーモニターを使用した一例
日本臨床麻酔学会第 30 回大会学術集会、Nov 05, 2010、徳島
8. 伊藤奈穂美、戸部賢、小幡英章、西川光一、齋藤繁、田畑泰彦: bFGFゼラチンハイドロゲルと高気圧酸素治療併用による慢性動脈閉塞症治療
第 9 回日本高気圧環境・潜水医学会関東地方会、2009、前橋
9. 西川光一、久保和宏、山田真紀子、石関淳子、齋藤繁: 上位脳における疼痛閾値の制御: GABA合成酵素(GAD65)ノックアウトマウスを用いた電気生理学・行動学的解析

日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2009、神戸

10. 石関 淳子、久保和宏、山田真紀子、西川光一、齋藤繁: 麻酔薬と海馬CA1 シナプ可塑性: Sevoflurane と Propofol の長期増強現象 (LTP) 抑制作用の比較
日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2009、神戸

11. 西川光一、久保和宏、齋藤繁: 上位脳 GABA による疼痛閾値の制御: 炎症性疼痛における GAD65 由来 GABA の役割
第 31 回日本疼痛学会、2009、名古屋

12. 竹前彰人、西川光一、齋藤繁: 高血圧患者におけるエアウエイスコープとマッキントッシュ喉頭鏡による気管挿管後のバイタルサイン変化の比較検討
日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部第 49 回合同学術集会、Sep 26, 2009、松本

13. 徳江彩、西川光一、山内聡子、門井雄司、齋藤繁: 余剰麻酔ガス処理システム 2 年間の運用実績: セボフルランはどれくらい回収できるのか?
日本臨床麻酔学会第 29 回大会学術集会、Oct 31, 2009、浜松

14. 上林功樹、徳江彩、西川光一、齋藤繁: 気管挿管操作と会話を覚えている! 術中覚醒記憶の 2 症例
日本臨床麻酔学会第 29 回大会学術集会、Oct 31, 2009、浜松

15. 山田真紀子、西川光一、久保和宏、石関淳子、齋藤繁: 小胞型 GABA トランスポーター - 遺伝子ヘテロ接合型マウスにおける麻酔感受性と疼痛閾値の解析
日本麻酔科学会第 55 回学術集会、2008、横浜

16. 門井雄司、黒田昌孝、富岡昭裕、小幡英章、西川光一、齋藤繁: 麻酔科医学生実習に対するアンケート結果報告
日本麻酔科学会第 55 回学術集会、2008、横浜

17. 内田慎也、荻野祐一、富岡昭裕、西川光一、齋藤繁: エアウエイスコープは挿管困難アルゴリズムを変えうるか - その有用性と合併症 -
日本麻酔科学会第 55 回学術集会、Q11-03、2008、横浜

18. 西川光一、久保和宏、齋藤繁: 侵害受容反応における持続抑制 (GABAergic tonic

inhibition) の影響
第 30 回日本疼痛学会、2008、福岡

19. 松岡宏晃、関本研一、麻生知寿、西川光一、齋藤繁: 声門部直上狭窄を合併する小児の気道確保
日本臨床麻酔学会第 28 回大会学術集会、2008、京都

〔図書〕(計 5 件)

1. 黒田昌孝、西川光一
上腕動脈カテーテル: 合併症への対策を万全にしたうえで行うなら可
LiSA コレクション 中心静脈・動脈穿刺 (分担執筆、編集 中馬理一郎、鈴木 利保) (株) メディカル・サイエンス・インターナショナル、p177-180、2011

2. 西川光一
肝疾患患者での特別な注意
MGH 麻酔の手引き第 6 版 (監訳 稲田英一) 分担翻訳
(株) メディカル・サイエンス・インターナショナル、p67-78、2010

3. 西川光一
帝王切開術
麻酔科研修ノート (分担執筆、総監修 永井良三) 診断と治療社、p519-520、2010

4. 西川光一
術中の覚醒記憶が疑われる
麻酔科トラブルシューティング A to Z (編集 高崎真弓) 文光堂、p576-577、2010

5. 西川光一
麻酔薬の中樞抑制作用における持続性抑制 (GABAergic tonic inhibition) の役割
医学の歩み、225 巻 995-998、医歯薬出版株式会社、2008

〔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

西川 光一 (NISHIKAWA KOICHI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00334110

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：