

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04970

研究課題名(和文) 臨界期における全身麻酔薬の神経発達制御メカニズムへ及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of general anesthetics on the regulatory mechanisms of neuronal development in the critical period

研究代表者

佐藤 泰司 (SATO, YASUSHI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・薬理学・准教授)

研究者番号：10505267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：発達期のマウスに全身麻酔薬を投与すると成長後に自閉症様行動を示すことは以前から報告されているが、その原因はよく解っていなかった。本研究ではマウス神経発達の臨界期に含まれる生後6日目のマウスに細胞外情報制御キナーゼ(ERK)阻害剤を投与すると、脳に変性細胞が大きく増加するとともに、成長後に自閉症様行動を示すことを見出した。さらに生後6日目のマウスに全身麻酔薬を投与するとERKの活性化が大きく阻害されることを見出した。これらの結果より、発達期の吸入麻酔薬曝露が将来的に自閉症発症の原因となるメカニズムにERK経路の抑制が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In animal models, neonatal exposure to general anesthetics significantly increased neuronal apoptosis with subsequent behavioral deficits in adulthood. Here we investigated the causal relationship of decreased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) and anesthetic-induced toxicity in the developing brain. At postnatal day 6 (P6), mice were exposed to sevoflurane (2%) or the blood-brain barrier-penetrating MEK inhibitor, (SL327) (50 mg/kg). Sevoflurane induced the decrease of ERK phosphorylation. Transient suppression of ERK phosphorylation by an intraperitoneal injection of SL327 at P6 significantly increased apoptosis similar to sevoflurane-induced apoptosis. Conversely, SL327 administration at P14 or P21 did not induce apoptosis, even though ERK phosphorylation was inhibited. Together, our results strongly suggest that suppressed ERK phosphorylation is critically involved in the mechanism underlying anesthetic-induced toxicity in the developing brain.

研究分野：薬理学、生化学、麻酔学

キーワード：ERK general anesthetics apoptosis developing brain toxicity mouse sevoflurane

1. 研究開始当初の背景

麻酔技術は現代において飛躍的に進歩し、極めて安全なものとして信じられている。特に、脳機能への不可逆的な影響は無いという前提で臨床麻酔が行われている。しかしながら周術期の麻酔管理法の急速な発達と比較して、長期予後に関しては未だに不明な点が多い。また、麻酔薬の神経に対する作用の詳細な分子メカニズムは未だに解明されておらず、現代においても麻酔薬の安全性は、臨床使用における経験的な知識に大きく頼らざるを得ない。2003年に Jevtovic-Todorovic らはラットを用いた実験で、神経発達期における臨床濃度の麻酔が将来的に脳機能の異常につながる可能性を報告した。以来この問題に関して多くの動物実験が行われ、現在臨床で使用されているほとんど全ての全身麻酔薬が発達期の脳に悪影響を与えることが解ってきた。動物実験の結果を受け、ヒトでも同じ事が起きるのかが議論となり、2007年に米国食品医薬品局 (FDA) はこの問題の重要性を指摘し、官民合同の大型研究プロジェクト「SAFEKIDS (The Safety of Key Inhaled and Intravenous Drugs in Pediatrics)」が開始された。その後、いくつかの疫学研究が行われているが、ヒトへの影響については未だにコンセンサスが得られていない。しかしながら小児の外科手術において全身麻酔は不可欠であることから、小児麻酔の安全性を根幹から揺るがす問題となることが懸念される。

我々も 2009 年に、マウス新生児脳において小児麻酔で多用されているセボフルランを臨床濃度で 6 時間曝露すると、広範なアポトーシスを惹起することを見出し、小児の臨床麻酔に警鐘を与えた。一方、成獣に対して麻酔薬を曝露してもこのようなアポトーシスの増加は見られなかったことから、この現象は幼若マウス特異的なものであると考えられた。また、生後 6 日目にセボフルランを曝露したマウスが成長後、脳高次機能を詳細に解析したところ記憶・学習能力に大きな障害が見られた。さらにこれらのマウスは顕著な自閉症様行動や育児放棄を示した。このように発達過程における麻酔薬曝露が、記憶、学習といった部分だけではなく、情動、性格、人格、あるいは本能行動へも影響を及ぼす可能性が解ってきた。しかしながら、どのような分子メカニズムで全身麻酔薬が発達期の神経に悪影響を及ぼすかについては、詳細な全体像は依然として不明な点が多い。近年、発達期の神経系に対する麻酔薬の毒性の分子レベルでのメカニズムの解明が、この問題の解決に必要なということが認識されつつある。

2. 研究の目的

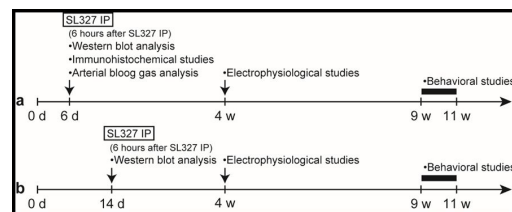
本研究では動物実験において神経の発達制御メカニズムとそれに対する麻酔薬の影響を解析し、将来的にヒトにおける副作用の可

能性を見当することによって小児麻酔の安全性の向上に資することを目的とした。特に本研究では細胞外情報制御キナーゼ (ERK) と、神経発達の関係及び麻酔薬の ERK 経路に及ぼす関係に注目した。

3. 研究の方法

(1) 本研究は、防衛医科大学校動物実験施設における倫理審査において承認を受けて実施した。

(2) 臨界期のピークと考えられる日齢 6 日 (P6) マウスと、臨界期が終了すると考えられる日齢 14 日 (P14) マウスに血液脳関門を通過する ERK 活性化を阻害する SL327 (ENZO, Farmingdale, NY) を腹腔内投与し、下図のようなタイムコースで実験を行った。



(3) (2)と同様に P6 と P14 マウスに吸入麻酔薬であるセボフルランを 2% で 6 時間投与し、その効果を (2)と同様なタイムコースで解析した。

(4) 阻害剤投与 6 時間後、またはセボフルラン麻酔終了後の中枢神経のアポトーシスを、抗開裂 PARP (Poly(ADP-ribose) polymerase) 抗体を用いたウェスタンブロット法及び抗活性化 caspase-3 抗体を用いた免疫染色法により評価した。

(5) SL327 投与による神経可塑性への影響を調べるため、細胞外記録法によって海馬の長期増強 (LTP: Long-Term Potentiation) を測定した。

(6) SL327 投与による学習行動異常に与える影響を調べるため、各種行動実験を行った。

4. 研究成果

発達期のマウスに全身麻酔薬を投与すると成長後に自閉症様行動を示すことは以前から報告されているが、その原因はよく解っていなかった。本研究では「臨界期」と呼ばれる時期における全身麻酔薬曝露と ERK の関係について解析した。臨界期とはヒトを含めた脳の発達過程において、環境からの刺激や経験、学習に対して神経システムが敏感で変化し易い時期のことであり、例えばヒトの言語の臨界期においては言語を覚える力が強く、一度覚えると一生に渡って忘れることは無い。本研究では臨界期のマウスにおいて ERK を中心とした細胞内情報伝達経路が乱れると、将来的に自閉症様行動を始めとする脳機能異常が発症するという事を見出した。つ

まり、生後6日目のマウスにERK阻害剤を投与すると脳に変性細胞が大きく増加するとともに、成長後に自閉症様行動を示すことを見出した。注目すべきことに、臨界期がほぼ終わったと考えられる生後14日にSL327を投与しても、変性細胞の増加は起こらなかった。これらの結果は神経系が臨界期特異的に、ERK阻害に対して敏感になっていることを示している。さらに臨界期のマウスに全身麻酔薬を投与するとERKの活性化が大きく阻害されることを見出した。これらの結果より、発達期の吸入麻酔薬曝露が将来的に自閉症発症の原因となるメカニズムにERK経路の抑制が関与していることを明らかにした。以下に詳細を示す。

(1) 臨界期の野生型マウスにセボフルランとERK活性化の関係を解析した。我々はこれまでの麻酔薬の新生仔マウスへの神経毒性を解析した研究結果から、マウスにおける臨界期は生後5-7日目ごろだと推測した。そこで生後6日目のマウスを用いてセボフルラン、またはSL327を投与し、アポトーシスの程度を計測した。麻酔薬曝露またはSL327投与によってERKリン酸化が阻害され、さらに脳においてアポトーシスが増加することが分かった。さらに、セボフルランとSL327を同時に投与しても、セボフルラン単独投与と比較してアポトーシスの程度は大きく変わらなかったことから、セボフルラン投与によるアポトーシス増加メカニズムにはERK活性化抑制が含まれていることが示唆された。

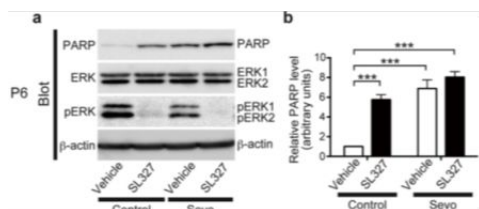


図1) セボフルラン投与によるアポトーシス増加メカニズムにはERK活性化抑制が含まれている。

(a) ウェスタンブロット法により、P6でSL327単独、セボフルラン単独、SL327とセボフルラン両方の投与による脳アポトーシスの程度を比較した。(b) 統計解析結果。セボフルラン曝露した群は、セボフルラン+SL327投与群と有意差が無い。

(2) 臨界期の野生型マウスにSL327を投与することによって一時的にERKの活性化を阻害し、その影響を解析した。生後6日目のマウスにSL327を腹腔内投与し、その影響を解析したところ、ERK阻害剤を単回投与するだけで、脳におけるアポトーシスが大きく増加することを確認した(図2)。注目すべきことに、臨界期がほぼ終わったと考えられる生後14日にERK活性化阻害剤を投与しても、変性細胞の増加は起こらなかった。これらの結果

は神経系が臨界期特異的に、ERK阻害に対して敏感になっていることを示している。

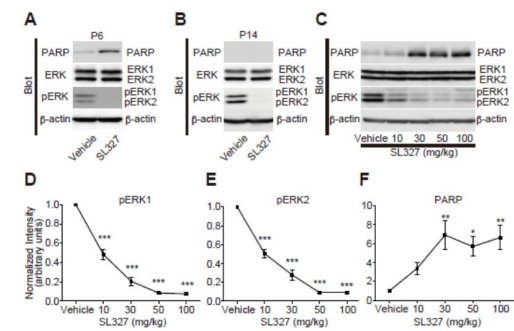


図2) SL327投与によるアポトーシスと日齢の関係及びSL327投与量の検討。

(a) ウェスタンブロット法による、P6におけるSL327 i.p. 群と対照(DMSO投与)群との比較(n=10 for each)。SL327投与群においてアポトーシスを認めるが、対照群では認めない。(b) P14におけるSL327 i.p. 群と対照(DMSO投与)群との比較(各群n=6)。P6とは対称的に、SL327投与群でもアポトーシスの増加を認めない。(c) P6におけるSL327投与量(0、10、30、50、100 mg/kg)の検討。(d) ERK1のリン酸化は投与量と比例して減少し、50 mg/kg以上のSL327投与で下げ止まる。(e) ERK2のリン酸化は投与量と比例して減少し、50 mg/kg以上のSL327投与で下げ止まる。(f) 30 mg/kg以上のSL327投与で有意なアポトーシスの増加を認めた。(各濃度に対してn=7)。データはmean ± SEMで表示。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

(3) 幼若期におけるERKの活性阻害と自閉症との関連を調べるため、生後6日目のマウスにSL327投与した後通常の飼育を続け、成熟した後(10週齢以降)に行動学的解析を行った。その結果、SL327を生後6日目に投与した群では自閉症様行動が観察された(図3)。一方、SL327を生後14日目に投与した群では自閉症様行動が観察されなかった(図3)。

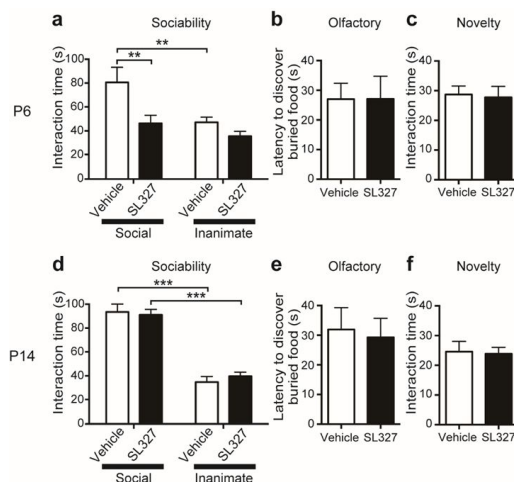


図3) 社会性行動の評価 P14でSL327を投与されたマウスは、成長後

の社会性行動に異常を来さないが、P6 で投与されたマウスは社交性テストにより社会性行動の異常を認めた。(a-c) P6 で SL327 を投与されたマウスは社交性に異常が生じた (control: n = 13, SL327: n = 14)。(a) 社交性テスト。通常はダミーのぬいぐるみマウスより生きている本物のマウスと長い時間接触する傾向にあるが、P6 で SL327 を投与されたマウスでは生きたマウスと過ごす時間が短い傾向にあった。(b) オルファクトリーテストの結果より、嗅覚に変化はなかった。(c) ノベルティーテストの結果より、一般的な興味に変化はなかった。(d-f) P14 で SL327 を投与されたマウスは対照群と比較して社交性に変化はなかった (control: n = 12, SL327: n = 14)。データは mean \pm SEM で表示。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

(4) 生後 6 日目に SL327 投与した後通常の飼育を続け、5 週齢に達したら海馬を取り出しスライスを作製、電気生理学的手法で LTP (長期増強) を解析したところ、SL327 を生後 6 日目に投与した群では LTP に異常が見られた (図 4)。一方、SL327 を生後 14 日目に投与した群では LTP に異常が見られなかった (図 4)。

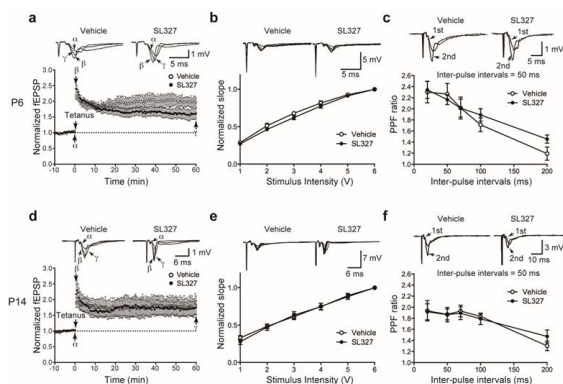


図 4) SL327 投与の LTP に与える影響

4 週齢マウスにおいて、P6 で SL327 を投与されたマウスは対照群と比較して LTP の抑制が見られたが、P14 で投与したマウスでは見られなかった。(a-c) P6 で SL327 を投与すると対照群と比較して LTP が抑制される (各群 n = 6)。(a) fEPSP の傾きの経時的变化 () テタヌス刺激の直前、() テタヌス刺激の直後、() テタヌス刺激の 60 分後。(b) 両群間で入出力関係に差はない。(c) 両群間で PPF に差はない。(d-f) P14 で SL327 を投与すると対照群と比較しても LTP に差はない (各群 n = 6)。(d) fEPSP の傾きの経時的变化 () テタヌス刺激の直前、() テタヌス刺激の直後、() テタヌス刺激の 60 分後。(e) 両群間で入出力関係に差はない。(f) 両群間で paired pulse facilitation (PPF) に差はない。データは mean \pm SEM で表示。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

(5) 免疫染色法によりアポトーシスの分布パターンを比較した (図 5)。その結果、麻酔薬及び SL327 投与による惹起されるアポトーシスの分布パターンは非常に似ていることが判明した。

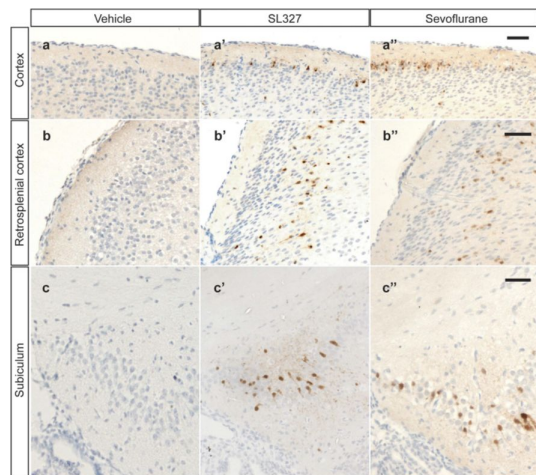


図 5) 麻酔薬曝露又は SL327 投与によって惹起されるアポトーシスのパターンは類似している。(a - a'')皮質第二層、(b-b'') 脳梁膨大後部皮質、(c-c'') 海馬台。免疫染色法における抗活性化 caspase-3 抗体陽性細胞の分布パターン。スケールバー: 250 μ m。

(6) さらに、どのタイプの細胞でアポトーシスが増加しているのかを免疫染色法で解析した。麻酔薬曝露、SL327 投与の両者とも神経細胞又はオリゴデンドロサイトでアポトーシスが増加しているがアストロサイトでは増加していないことが分かった (図 6)。

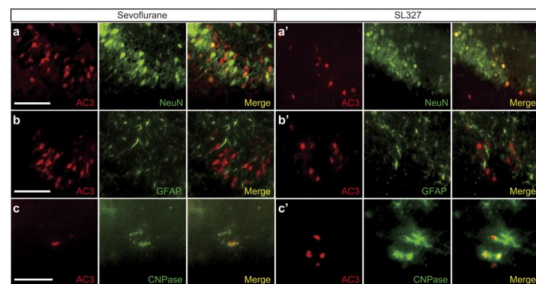


図 6) 麻酔薬曝露又は SL327 投与によって神経細胞又はオリゴデンドロサイトでアポトーシスが惹起されるがアストロサイトでは起こらない。(a-c) 二重染色法による抗活性化 caspase-3 抗体陽性細胞の同定。(a, a') 抗 NeuN (神経細胞マーカー) 抗体との二重染色画像。(b, b') 抗 GFAP (アストロサイトマーカー) 抗体との二重染色画像。(c, c') 抗 CNPase (オリゴデンドロサイトマーカー) 抗体との二重染色画像。Merge 画像において黄色部分が赤と緑が重なっている部分を示す。スケールバー: 50 μ m。

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 12 件)

Satoh Y., Araki Y., Kashitani M., Nishii K., Kobayashi Y., Fujita M., Suzuki S., Morimoto Y., Tokuno S., Tsumatori G., Yamamoto T., Saitoh D., Ishizuka T. (in press) Molecular hydrogen prevents social deficits and depression-like behaviors induced by low-intensity blast in mice. *J. Neuropathol Exp Neurol*. doi:10.1093/jnen/nly060. 査読有

Yufune S., Satoh Y., Akai R., Yoshinaga Y., Kobayashi Y., Endo S., Kazama T., (2016) Suppression of ERK phosphorylation through oxidative stress is involved in the mechanism underlying sevoflurane-induced toxicity in the developing brain. *Scientific Reports*. 6:21859. doi:10.1038/srep21859. 査読有

Niwa K., Mizutari K., Matsui T., Kurioka T., Matsunobu T., Kawauchi S., Satoh Y., Sato S., Shiotani A., Kobayashi Y. (2016) Pathophysiology of the inner ear after blast injury caused by laser-induced shock wave. *Scientific Reports*. 6:31754. doi:10.1038/srep31754. 査読有

Hayashi Y., Morinaga S., Zhang J., Satoh Y., Meredith AL, Nakata T., Wu Z., Kohsaka S., Inoue K., Nakanishi H. (2016) BK channels in microglia are required for morphine-induced hyperalgesia. *Nat. Commun*. 7:11697. doi: 10.1038/ncomms11697. 査読有

Niwa K., Matsunobu T., Kurioka T., Kamide D., Tamura A., Tadokoro S., Satoh Y., Shiotani A. (2016) The beneficial effect of Hangesha-shin-to (TJ-014) in gentamicin-induced hair cell loss in the rat cochlea. *Auris Nasus Larynx*. 43(5):507-13. doi:10.1016/j.anl.2015.12.012. 査読有

Tamura R., Ohta H., Satoh Y., Nonoyama S., Nishida Y., Nibuya M. (2016) Neuroprotective effects of adenosine deaminase in the striatum. *J Cereb Blood Flow Metab*. 36(4):709-20. doi:10.1177/0271678X15625077. 査読有

Yufune S., Satoh Y., Takamatsu I., Ohta H., Kobayashi Y., Takaenoki Y., Pagès G., Pouysségur J., Endo S., Kazama T. (2015) Transient Blockade of ERK Phosphorylation in the Critical Period Causes Autistic Phenotypes as an Adult in Mice. *Scientific Reports*.

20;5:10252. doi:10.1038/srep10252 査読有

Tamura A., Matsunobu T., Mizutari K., Niwa K., Kurioka T., Kawauchi S., Satoh S., Hiroi S., Satoh Y., Nibuya M., Tamura R., Shiotani A. (2015) Low-level laser therapy for prevention of noise-induced hearing loss in rats. *Neurosci Lett*. 595:81-6. doi:10.1016/j.neulet.2015.03.031. 査読有

Zulaziz N., Azhim A., Himeno N., Tanaka M., Satoh Y., Kinoshita M., Miyazaki H., Saitoh D., Shinomiya N., Morimoto Y. (2015) Photodynamic therapy mediates innate immune responses via fibroblast-macrophage interactions. *Hum Cell*. 28(4).159-66. doi:10.1007/s13577-015-0118-2. 査読有

Kurioka T., Matsunobu T., Satoh Y., Niwa K., Endo S., Fujioka M., Shiotani A. (2015): ERK2 mediates inner hair cell survival and decreases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Scientific Reports*. (2015) Nov 18; 5:16839. doi:10.1038/srep16839. 査読有

Miyazaki H., Miyawaki H., Satoh Y., Saiki T., Kawauchi S., Sato S., Saitoh D. (2015) Thoracic shock wave injury causes behavioral abnormalities in mice. *Acta Neurochir(Wien)*. 157(12):2111-20; discussion 2120. doi:10.1007/s00701-015-2613-3. 査読有

Miyawaki H., Saitoh D., Hagsisawa K., Noguchi M., Sato S., Kinoshita M., Miyazaki H., Satoh Y., Harada N., Sakamoto T. (2015) Noradrenalin effectively rescues mice from blast lung injury caused by laser-induced shock waves. *Intensive Care Med* Exp. 3(1):32. doi:10.1186/s40635-015-0069-7. 査読有

[学会発表](計 10 件)

Satoh Y., Neurotoxicity and general anesthetics in the critical period and strategy for the prevention、21th Annual meeting of Korean Society of Obstetric Anesthesiologists、21th Annual meeting of Korean Society of Obstetric Anesthesiologists (招待講演)、2017年6月17日、ソウル(大韓民国)

Satoh Y., Neurotoxicity and general anesthetics in the critical period and strategy for the prevention、21th Annual meeting of Korean Society of Obstetric Anesthesiologists、the First

Jinling International Anesthesia and Brain Function Forum (招待講演)、2017年5月21日、南京(中華人民共和国)
佐藤泰司、麻酔薬の発達段階の脳に対する神経毒性メカニズムと脳保護戦略、第64回日本麻酔科学会学術集会(招待講演)、2017年6月8日、国際会議場(神戸)
湯舟晋也、マウス幼若脳における全身麻酔薬の神経毒性に対する高濃度水素ガスの抑制効果、第64回日本麻酔科学会学術集会、2017年6月8日、国際会議場(神戸)
嶋田哲也、小児への麻酔暴露が自閉症発症リスクへ与える影響、第90回日本薬理学会年会、2017年3月15日、長崎ブリックホール(長崎)
佐藤泰司、臨界期における全身麻酔薬の神経発達制御メカニズムへ及ぼす影響、第4回新胎児学研究会(招待講演)、2016年11月12日、ピアザ淡海(大津)
佐藤泰司、脳と水素、第20回日本医療ガス学会学術大会、2016年10月15日、秋田市にぎわい交流館AU(秋田)
佐藤泰司、分子状水素は生後発達期の薬物による神経回路形成障害を抑制する、2015年3月21日、第15回分子状水素シンポジウム(招待講演)ウインク愛知(名古屋)
佐藤泰司、神経発達とセボフルラン、第62回日本麻酔科学会学術集会(招待講演)、2015年5月29日、神戸ポートピアホテル(神戸)
佐藤泰司、小児麻酔の神経毒性に関する研究-小児麻酔の安全性向上のために-、第62回日本麻酔科学会学術集会(招待講演)、2015年5月28日、神戸ポートピアホテル(神戸)

〔図書〕(計3件)

佐藤泰司 住友精化株式会社、医療ガス情報ファイル、2017、4-12
佐藤泰司 克誠堂出版、麻酔薬の神経毒性、2016、191-200
佐藤泰司 Springer Japan、Clinical findings including prevention and treatment、2017、17-31

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 泰司(SATOH, Yasushi)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号：10505267

(2) 研究分担者

遠藤 昌吾(ENDO, Shogo)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号：60192514

後藤 典子(Noriko, Gotoh)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号：10251448

福田 敦夫(Atsuo, Fukuda)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50254272

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし