

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11763

研究課題名(和文) 全身麻酔薬による細胞死誘導解明のための生体内リアルタイムイメージング手法の開発

研究課題名(英文) Continuous monitoring of caspase-3 activation induced by propofol

研究代表者

西村 晶子(Nishimura, Akiko)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：00551227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経発達期にあたる乳幼児期の全身麻酔が認知機能の発達に影響を及ぼすことが懸念されている。本研究では全身麻酔薬であるプロポフォールが幼若脳の神経細胞に与える影響を生細胞で経時的に観察する手法を検討した。その結果、プロポフォール投与開始5時間後から細胞死を表すカスパーゼ3活性が有意に増大することを確認し、長時間のプロポフォール持続投与が認知機能の発達に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔の安全性が飛躍的に向上した現代においては、患者の予後にも貢献できる周術期全体を通じた麻酔管理が求められている。その中で、乳幼児期の全身麻酔が患児のその後の発達に影響を与えるのではないかと懸念は解決すべき喫緊の課題である。本研究はこれまで主に組織学的な検証が行われてきたこの課題について、生細胞でリアルタイムにカスパーゼ3活性の瞬間を捉えた初めての研究であり、乳幼児における安全な全身麻酔の指針を定める一助となる結果を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The neurotoxicity of anesthetics on the developing brain has drawn the attention of anesthesiologists. Therefore, apoptogenesis should be continuously monitored to elucidate when the apoptotic cascade is triggered by anesthesia. We describe the development of a continuous monitoring system to detect caspase-3 activation using an in vivo model. We observed a shift in the histogram toward the right over time, indicating caspase-3 activation. This right-ward shift dramatically changed at five hours in the propofol 1 μM and 10 μM groups and was obviously different from that in the control group. Thus, real-time fluorescence energy transfer (FRET) imaging was capable of identifying the onset of apoptosis triggered by propofol in neonatal brain slices. This model may be a useful tool for monitoring apoptogenesis in the developing brain.

研究分野：麻酔

キーワード：全身麻酔 脳神経 アポトーシス カスパーゼ3 FRET SCAT3 マウス 乳幼児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1999年にNMDA受容体遮断薬が幼若ラットの大脳皮質に細胞死を引き起こすことが報告されたから、NMDA受容体遮断薬でありGABA受容体作動薬である全身麻酔薬が脳神経発達に与える影響について、動物やヒトを対象にした数多くの研究が報告されてきた。齧歯類や霊長類を用いた研究では、胎児期-小児期の麻酔薬投与により脳の様々な領域で細胞死が引き起こされることが、数多くの免疫組織学的研究で報告されている。さらに霊長類を用いた近年の研究から、胎児期-乳児期の麻酔薬暴露は広範な大脳皮質領域に著しい細胞死を誘導するのに対し、小児期では成人期と同様に麻酔薬の影響をそれほど受けないことも示された。一方で脳神経発達期の麻酔薬暴露が明らかな学習障害を示した行動実験の報告は少ない。またヒトを対象とした大規模な認知機能の発達調査の結果でも結論は出ていない。免疫組織学的に示される麻酔薬投与後の明らかな神経細胞死が、成長後の学習障害を必ずしも引き起こさない理由として、発達に伴う生理的なアポトーシス変化が関係していると考えられている。麻酔薬暴露による細胞死誘導が最も強く発生する時期は、本来の生理学的なアポトーシスが起こる胎児期-乳児期と一致していることから、胎児期-乳児期の生理学的なアポトーシスに麻酔薬が影響を与え大量の細胞死が誘導される可能性が高い。このように組織学的報告と実際の発育過程に差異があるのは、生体内環境下で麻酔薬の影響を継時的に観察する手法が未だ確立されていないためである。

2. 研究の目的

本研究では生細胞において全身麻酔薬の投与量、投与時間、対象となる動物の日齢によるCaspase 3活性の変化を継時的に観察することで、認知機能への影響を抑える脳保護的な全身麻酔薬の投与量および投与方法を検討する。さらに、頭蓋骨を剥離して脳組織を顕微鏡下で直接観察できる実験系を応用し、より生体内に近い環境で麻酔薬に暴露した脳神経細胞の変化をリアルタイムに観察する手法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

麻酔薬投与による脳神経細胞のアポトーシス誘導機構を生体内環境下で明らかにするため、(1)~(4)の項目を4年にわたり実施する。

(1) Caspase3活性を蛍光変化で観察できるSCAT3遺伝子を導入した遺伝子改変マウスから脳スライス標本を作成し、麻酔薬投与による蛍光強度変化を経時的に測定し、麻酔薬の投与量と投与時間による変化を検証する。

(2) GABA受容体の成熟に伴い幼弱期特有の異常興奮が減弱するか検証する。

(3) 生体内での脳組織観察のためCranial windowを設置したSCAT3マウスを作成する。

(4) 共焦点顕微鏡下で蛍光強度変化を観察しCaspase3活性を検証する手法を確立する。

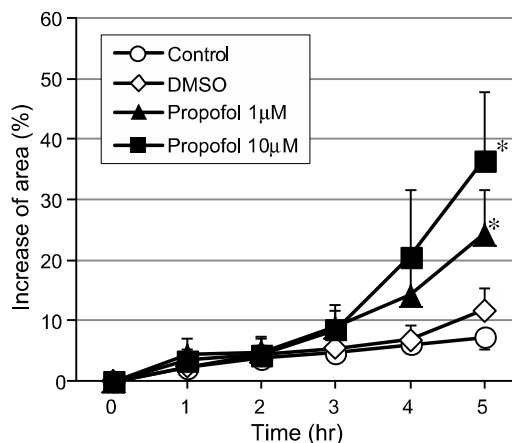
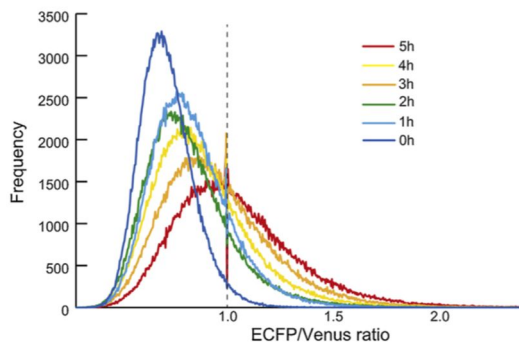
4. 研究成果

FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 現象を利用しカスパーゼ3活性を可視化できる SCAT3 遺伝子を導入した新生マウス (P0-4) を用いて脳スライス標本を作製した。SCAT3 とは蛍光タンパクである ECFP と Venus からなる融合タンパクでカスパーゼ3によって開裂されるペプチド、DEVD(アミノ酸配列)で連結されている。人工脳脊髄液 (ACSF) を対照群とし、プロポフォール (2.6-ジイソプロフェノール) $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、プロポフォールの有機溶媒である DMSO (ジメチルスルホキシド) を持続的に灌流投与した群と比較した。共焦点レーザー顕微鏡下に Z スタック-タイムラプス撮影によって海馬 CA1 領域の神経細胞の蛍光波長強度比を 5 時間にわたり継続的に観察した。疑似カラーによって Venus/ECFP ratio イメージを構築し、ピクセル分析は各々の比率ごとのピクセル数から作製したヒストグラムによって定量化した。

ヒストグラム中で比率が 1.0 以上を示す範囲はカスパーゼ3活性が起きた CA1 ニューロンのピクセル数に相当する。我々はヒストグラムが時間経過とともに右へシフトし、カスパーゼ3活性が起きた CA1 ニューロンのピクセル数が増加する様子を観察した。ヒストグラムの右方向へのシフトはプロポフォール $1\mu\text{M}$ と $10\mu\text{M}$ 群において 5 時間で劇的に変化し、対照群の継続的な変化のパターンとは明らかに異なっていた。

本研究では FRET によるリアルタイムイメージングの手法を用いて幼若期脳スライス標本におけるプロポフォール投与によるカスパーゼ3活性の始まりを観察することに成功した。このモデルは発達期の脳神経細胞におけるアポトーシス誘導を観察する手法となりえることを示唆した。

また生体内での直接的な脳組織観察とその後の長期にわたる認知学習機能の観察のため、Cranial window を設置した SCAT3 マウスの作成を試みた。SCAT3 マウスの遺伝子発現と継代維持に難航し、当初の計画通りに進行しなかった。



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 0件）

1. 著者名 Konno A, Nishimura A, Nakamura S, Mochizuki A, Yamada A, Kamijo R, Inoue T, Iijima T	4. 巻 51
2. 論文標題 Continuous monitoring of caspase-3 activation induced by propofol in developing mouse brain	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 International Journal of Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 42-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------------------------	-----------------------	----