

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11061

研究課題名(和文) 大脳基底核神経回路動態に与える吸入麻酔薬の影響とその作用機序解析

研究課題名(英文) Analysis of Pharmacological Mechanism and effects of the volatile anesthetics Sevoflurane on Neurotransmission in the basal ganglion.

研究代表者

西村 欣也(Nishimura, Kinya)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80164581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳児と小児への影響について様々な報告がされている吸入麻酔薬セボフルラン研究において、今回、線条体コリン作動性介在ニューロンにおけるIh電流(同期した振動神経リズムの生成に寄与する過分極活性化カチオン電流)のセボフルラン誘発阻害が、出生後初期の神経回路におけるアセチルコリン-ドーパミンバランスの変化につながる可能性があることを見いだした。また、線条体における虚血耐性獲得効果を検討し、セボフルランが線条体ニューロンを低酸素障害から保護し、病理学的増強を軽減することを明らかにすることが出来た。このことはセボフルランは手術を受ける患者にとって効果的な介入にな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

我々麻酔科医が日常的に使用している吸入麻酔薬、幼児期の吸入麻酔薬曝露が学習障害や行動異常を誘発する可能性が指摘され、その作用機序の中心に大脳皮質および海馬、線状体を取りあげられている。その上で近年、加齢に伴う脳機能障害に髄液クリアランスの低下が関与している可能性が示唆されており、これにより脳におけるベータアミロイドなどの有害物質排泄が障害され、認知機能障害の一因になりうると考えられている。多くの脳機能分子が明らかにされつつあるが、今回、主に虚血耐性獲得現象を中心とした研究により麻酔科学研究の中心の課題である麻酔薬の神経回路内伝達制御解明に寄与出来るものと強く考えている。

研究成果の概要(英文)：The volatile anesthetic agents, Sevoflurane, has an excellent safety record, but is under review for potential neurotoxicity, especially relevant to administration in infants.

And, Volatile anesthetics have been reported to inhibit hyperpolarization activated cyclic-nucleotide gated channels underlying the hyperpolarization-activated cation current (Ih) that contributes to generation of synchronized oscillatory neural rhythms. In our study, the sevoflurane-induced inhibition of Ih in striatal cholinergic interneurons may lead to alterations of the acetylcholine-dopamine balance in the neural circuits during the early postnatal period. As a next step, to investigate the preconditioning effects in the striatum, a common site for ischemic stroke, we collected whole-cell current-clamp recordings from striatal medium spiny neurons. These results indicate that sevoflurane protects striatal neurons from hypoxic damage and alleviates the pathological potentiation.

研究分野：麻酔学

キーワード：吸入麻酔薬 線条体 プレコンディショニング現象 過分極活性化型陽イオン電流(Ih電流) 虚血作用 電気生理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 吸入麻酔薬は今まで広く全身麻酔に使用されてきたが、昨今、『麻酔・沈静は脳に対して安全！？』という極めて基本的な問題に対して疑問詞がつけられている。高齢者における全身麻酔後の認知機能障害をはじめ、小児期の麻酔曝露が脳の発達に影響を与え、学習能力低下や行動異常を引き起こす可能性が示唆されたため、今や公衆衛生学的にも看過出来ない問題として関心が高まっている。本研究計画では神経ネットワーク解析を主軸として、遺伝子工学的研究仕法に加え、細胞内シグナル伝達物質の定量化という生化学的仕法と、Whole-cell Patch-clamp 法を中心とした電気生理学的仕法を導入し、発達期および老化モデルマウスの脳に対して、吸入麻酔薬曝露が神経伝達物質放出機構に与える影響について検討した。1990年代より NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) 受容体遮断薬と GABA (gamma-aminobutyric acid) 受容体作動薬がシナプス形成期の脳に対してアポトーシスを伴う神経変性を来し、その後の学習能力低下や行動異常を引き起こすという研究結果が数多く報告されている。これは麻酔科領域のみならず、子をもつ両親にとっても極めて重大な問題であり、今や国家レベルの公衆衛生学的コホート調査を用いて比較検討が行われるに至った。その上で脳神経細胞障害に全身麻酔という医療行為のみかどうかに統一見解はないものの、いずれにしても全身麻酔薬が与える影響は無視できないものとなっている。そして未だ作用機序が解明されていない吸入麻酔薬であるが、このほど私たちの研究室はこの吸入麻酔薬は大脳皮質・線条体を中心とした大脳皮質 基底核 視床ループにおける情報伝達回路に“乱れと興奮”が生じることが報告した。そこでこの“乱れと興奮”の解析をもとに、新生児期の吸入麻酔薬曝露が脳内神経ネットワーク活動に与える影響を評価することを目的とした。

(2) 脳神経系では多数の神経細胞がネットワークを形成しており、我々麻酔科医が日常的に使用している吸入麻酔薬もこの神経ネットワーク活動に影響を与える可能性が高い。幼児期の吸入麻酔薬曝露が学習障害や行動異常を誘発する可能性が指摘され、その作用機序の中心に大脳皮質および海馬が取りあげられている。その上で近年、加齢に伴う脳機能障害に髄液クリアランスの低下が関与している可能性が示唆されており、これにより脳におけるベータアミロイドなどの有害物質排泄が障害され、認知機能障害の一因になりうると考えられている。この髄液クリアランス低下には、加齢によるアストロサイトの LRG1 発現の増加が関与している可能性があり、吸入麻酔薬が老化モデルマウスの脳において電気生理学的にどのような影響を与え、また髄液クリアランスについても変化をもたらすかを検討することは意義深いと考えた。元来、LRG1 過剰発現トランスジェニックマウスは重度の運動失調を呈し、形態学的には海馬及び小脳の形成異常を認める。このことは LRG1 が脳の老化のみならず、脳の発達にも重要な役割を演じている可能性を示している。

2. 研究の目的

内神経ネットワーク解析を目的とし、吸入麻酔薬を曝露した発達期および老化モデルマウスの脳を用いて、脳スライス標本での集合電位記録や Patch-clamp 法による Whole-cell 記録を組み合わせることで、シナプス伝達制御機構を解析した。加えて遺伝子工学、電気生理学および生化学的仕法を併用し、吸入麻酔薬が脳内神経ネットワーク回路に及ぼす影響を解析し、発達期の脳および老化モデルの脳への影響とその関連性を解析することを目標とした。また、線条体 cholinergic interneuron の過分極活性化型陽イオン電流 (Ih) は生体において様々な役割を担い、心臓組織や中枢・末梢神経で確認され、不整脈やてんかん、神経障害性疼痛との関連も指摘されており、近年注目を集めている。本研究においてはマウス線条体 cholinergic interneuron における Ih を検出し、その日齢による絶対値の変化や sevoflurane 投与によりどのような変化をきたすかを観察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Tonic GABA 電流と GABA 受容体に与える吸入麻酔薬の影響：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ていたが、シナプス領域外に存在する受容体の機能と特性が明らかとなり、この領域外受容体が脳機能調節に重要な役割を担うことが理解されてきた。なかでもシナプス領域外 GABA 受容体は GABA に対する高い親和性と緩慢な脱感作特性を有し、持続的な電流 (Tonic current) を提供している。エーテル麻酔下にマウスの脳を取り出し、スライサーにより 250 ~ 300 μm 厚さの脳スライスを作製し、Whole cell patch clamp 法を行う。各細胞の電気生理的発火パターンを確認して細胞の同定を行う。その後吸入麻酔薬セボフルランを添付し、Tonic GABA 電流への影響を観察する。脳の成長発達課程における GABA 受容体サブユニットの変化を含め解析を進め、さらに老化モデルマウスを使用して実験を行い、老化現象とこの領域外 GABA 受容体との関連性を検討する。

(2) アセチルコリン (ACh) は、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7\text{nAChR}$) を介して GABA 作動性介在ニューロンの作用に関して、線状体における Striosome と Matrix での作用様式の違いを検討し、サブユニット $\alpha 4\beta 2$ の役割などを検討することによりコリナージックニューロンを中心とした神経伝達経路の解明を行う。

(3) マウス線条体 cholinergic interneuron における Ih の日齢による絶対値の変化と sevoflurane 投与による影響：日齢 (P) 7 ~ 35 日のマウス脳スライスを作成し、大脳基底核線条体：cholinergic interneuron から whole-cell patch clamp 法を用いて細胞内電流を測定する。

その後電圧は 0mV 固定の上，人工脳脊髄液に灌流し，sevoflurane は灌流液中に添加する．さらに各種拮抗薬を添加し，その変化を観察・分析して検討する．

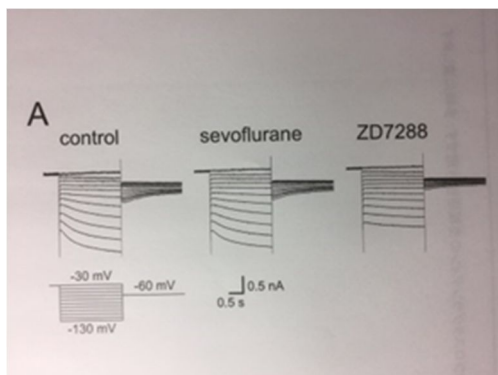
(4) 中枢神経系には活動電位の伝達を行う神経細胞 (Neuron) が存在しているが，この中枢神経を構成する細胞の約 90% はグリア細胞である．当初，グリア細胞は不活性で周辺組織の恒常性を維持するような比較的静的な役割を演じることでシグナル伝達に貢献すると考えられてきたが，近年になって多種多様な神経伝達物質の受容体が発現していることなどから，これまで神経細胞のみが担うとされてきたシグナル伝達などの動的な役割も果たしていることが，次々に示されてきている．

そこで，今回は吸入麻酔薬や乳酸の障害や中枢神経系への影響を検討した．

4. 研究成果

(1) 2MAC (MAC; 最小肺泡濃度) の吸入麻酔薬投与によりいずれの日齢 (P7, P14, P21, P28) でも Tonic GABA 電流は増大をみとめ，また GABA transporter blocker の添加でセボフルランの効果が増強されたことから，中因性 GABA に反応して Tonic GABA 電流を増大させていると考えられた．即ち線条体細胞ではセボフルランが Tonic GABA 電流を増大させた．さらにその大きさは生後 7 日 (P7) から 28 日 (P28) までは日齢とともに増加した．また細胞膜容量 (τ) で補正すると，日齢との間に強い相関関係がみられ，この時期の Tonic GABA 電流の増大が，吸入麻酔薬の興奮作用と関連してその後の脳発達に影響を与える可能性が示唆された．

(2) 日齢 7~28 のマウス線条体 Cholinergic interneuron において，日齢増加に伴う神経細胞膜の状態変化と I_h の絶対値増加を認めた．セボフルランは濃度依存性に I_h を抑制し， I_h 活性化抑制による activation curve の偏位を認めたが，日齢間ではセボフルランの効果に差を認めなかった．内向き整流性カリウムチャネル電流 (K_{ir}) は中枢神経系の調律形成に I_h と同様に重要とされるが， K_{ir} 遮断薬であるバリウムを用いた実験結果から，セボフルランの K_{ir} への直接作用は小さく，またセボフルランの I_h に対する作用への K_{ir} の影響は小さいことが示された．更にセボフルランは，感覚応答に重要とされる Cholinergic interneuron の rebound activation を抑制し，cell-attached recordings の解析では， I_h が関与する生理的条件下での発火頻度を変化させることが判明した．セボフルランによる I_h 抑制は，出生後早期の線条体における神経ネットワークに影響を及ぼす可能性がある．



図：吸入麻酔薬による I_h 電流の変化．
阻害薬：ZD728

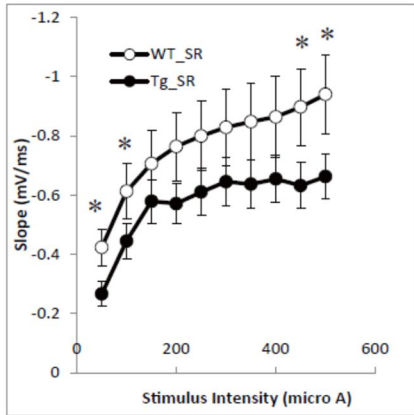
(3) 線条体 cholinergic interneuron は自発的な発火をみとめ， I_h の他にも，電位依存性カルシウムチャネルおよび ATP 感受性カリウムチャネルによって制御される電流は中枢神経系の pacemaking において重要な役割を担っている．現在は発達期における電位依存性カルシウムチャネルおよび ATP 感受性カリウムチャネルに対する sevoflurane の影響に着目し実験を進めている．

(4) 線条体におけるコリナージックニューロンはテタヌス刺激に応じて acetylcholine を放出し，M1 受容体の活性を介して NMDA 成分を増強し，LTP 誘発に必要とされている．また，可塑性を生ずることも証明され，その活性の重要性が認識されている．また GABA を介した神経伝達でも線条体を大きな役割を呈しているが，今回，striosome より Matrix の方がよりその頻度が高いことを明らかにすることが出来た．

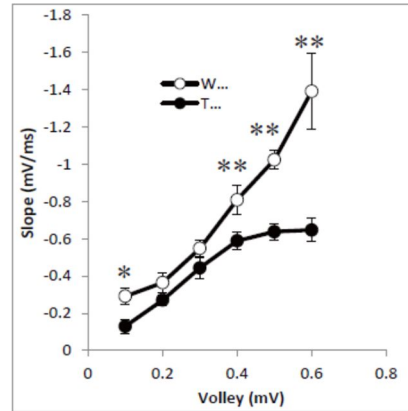
(5) これまで我々は，神経情報の入力と出力が定量的に発現している大脳皮質→基底核の神経回路を対象として，吸入麻酔薬が神経伝達機能に与える影響について検討してきたが，今回，老化に伴いアストロサイト等で発現の増加が認められている leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1) に着目し，Cre-loxP システムを用いたアストロサイトへの特異的 LRG1 遺伝子導入を行なった LRG1 トランスジェニックマウスを老化モデルとして用い，老化に伴う認知機能障害にあたる吸入麻酔薬の影響を認知・記憶に重要な海馬における電気生理学および組織学的検索を行なったことである．下图 1.2 に示すように，刺激電流の大きさや fEPSP での傾きを低下を，また，Paired Pulse Ratio の上昇などを観察し，LRG1 トランスジェニックマウスの認知機能障害を明らかにすることが出来た．

図：各マウスにおける脳海馬スライスを作成し，海馬 CA1-CA3 シーファー側枝より LTP を含めて集合電位法による検証を行なう．今現在，8 週のトランスジェニックマウス (Tg マウス) に対する海馬で結果を手いするが，さらに 30 週，50 週などの経時変化を観察する．

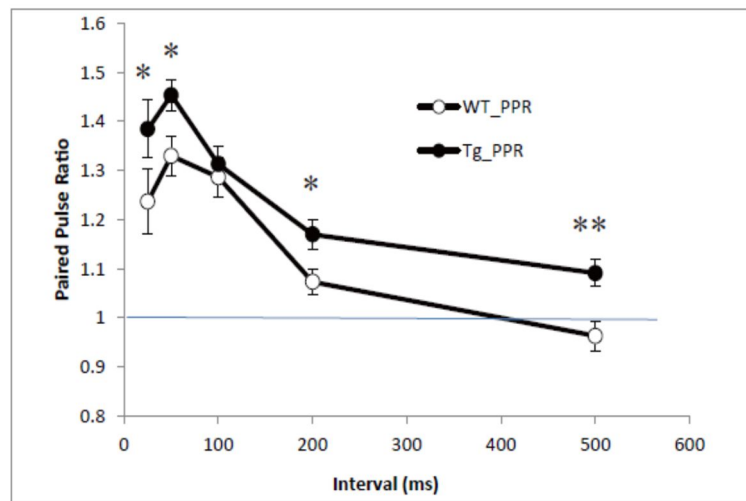
図 1：8週 Tg マウスにおける電気生理学的検証



刺激電流の大きさと fEPSP の傾きのグラフ



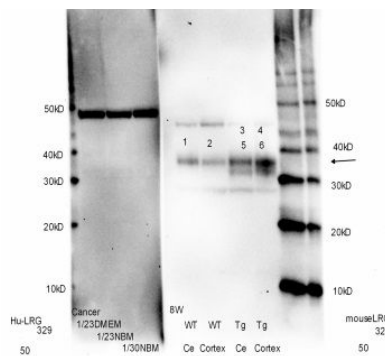
fiber volley 活動電位



paired pulse

図 2：トランスジェニックマウス作成と形態学的観察結果

左脳 = Wild type, 右脳 = トランスジェニック と Western blot 法による LRG 出現



- 1) Cre-loxP システムを用いたアストロサイトへの特異的 LRG1 遺伝子導入を行い, LRG1 トランスジェニックマウスを作製した .
- 2) 導入遺伝子の確認と形態学的観察であるが, RT-PCR 法とマウス LRG1 抗体を用いた Western blot 法で脳組織での, LRG1 の発現を確認したところ, 脳の萎縮がはっきりと見られた .

(6) 虚血状態を実験的に発生させた低酸素状態では、膜電位は急激に上昇し、発火閾値(-50mV)に達す時間を観察した。その結果、セボフルラン投与群では有意に長くすることが解った。さらに KATP チャンネル開口阻害薬である glibenclamide を投与したところ、その延長は阻害されたことから、セボフルランは KATP チャンネルを介して虚血耐性現象を発現していることが明らかに出来た。

また、乳酸の影響であるが、低酸素環境下では膜電位保持に寄与していることを明らかにすることが出来た。また、MCT 阻害薬投与によって EPSP の増大が観察された。加えて、虚血誘導性 EPSP の過剰入力に対してセボフルランは効果が観られた。しかし、乳酸代謝遮断によって生じる EPSP 増大を抑制することはなかった。

このようにグリア関わりのある実験を行うことが出来き、併せて EPSP という神経伝達に関与することを明らかにすることが出来た。このように虚血時には、酸素およびグルコースから ATP を産生するのであるが、ATP 枯渇、すなわちニューロンが低酸素状態などでエネルギー産生が困難になった場合、血液由来のグルコースから ATP を産生しようとするが、これ以外に最近、グリア由来の乳酸を用いてエネルギー活動に利用する経路が明らかになってきた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Sugasawa Yusuke, Fukuda Masataka, Ando Nozomi, Inoue Ritsuko, Nakauchi Sakura, Miura Masami, Nishimura Kinya	4. 巻 132
2. 論文標題 Modulation of hyperpolarization-activated cation current I_h by volatile anesthetic sevoflurane in the mouse striatum during postnatal development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 8~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.009	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Koga Hiroyuki, Nakamura Hiroki, Murakami Hiroshi, Hirayama Shunki, Imashimizu Kota, Nishimura Kinya, Suzuki Kazuhiro, Kuwatsuru Ryohei, Inada Eiichi, Suzuki Kenji, Yamataka Atsuyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Thoracoscopic Pulmonary Lobectomy for Densely Fused Pulmonary Lobes in Children with Congenital Pulmonary Airway Malformation: Technical Tips	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques	6. 最初と最後の頁 415~419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/lap.2018.0168	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Akiba C, Nakajima M, Miyajima M, Ogino I, Miura M, Inoue R, Nakamura E, Kanai F, Tada N, Kunichika M, Yoshida M, Nishimura K, Kondo A, Sugano H, Arai H.	4. 巻 60
2. 論文標題 Leucine-rich 2-glycoprotein overexpression in the brain contributes to memory impairment.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurobiol Aging	6. 最初と最後の頁 11-19
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 -
1. 著者名 Sugasawa Y, Fukuda M, Ando N, Inoue R, Nakauchi S, Miura M, Nishimura K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Modulation of hyperpolarization-activated cation current I_h by volatile anesthetic sevoflurane in the mouse striatum during postnatal development.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosci Re	6. 最初と最後の頁 30402-9
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
研究 分 担 者	宮嶋 雅一 (Miyajima Masakazu) (60200177)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	