

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16490

研究課題名（和文）イソフルラン麻酔メカニズムにおけるアストロサイトCRACチャネルの重要性

研究課題名（英文）The importance of CRAC channels in astrocytes as the mechanism of isoflurane anesthesia

研究代表者

堀 耕太郎（Hori, Kotaro）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60735827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究で全身麻酔薬による短期記憶障害の作用機序として、海馬抑制性神経細胞に分布するCRAC（Calcium-release activated calcium）チャネルに重要な働きがある事が示唆された。海馬CA1領域の網状分子層と放射状層との境界に存在する抑制性神経細胞でのCRACチャネルがセボフルラン麻酔による活動電位の発生に関わっており、そこでのCRACチャネルの不活性化が活動電位の発生を抑制することで、セボフルラン麻酔による記憶障害からの早期回復を促している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔薬の作用機序は未だ不明な点も多いが、中でも全身麻酔後の短期記憶障害は術後せん妄や認知機能障害との関わりが示唆されているため、臨床上非常に重要なテーマである。今回、我々の研究からセボフルラン麻酔による短期記憶障害の作用機序として、海馬抑制性神経細胞におけるCRACチャネルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらなる詳細な作用機序等が解明されれば、現在米国で臨床試験がなされているCRACチャネル阻害薬の臨床応用等、今後の発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, CRAC channels in hippocampal inhibitory neurons were shown to play important roles in the mechanism of memory deficit immediately after general anesthesia. We found that CRAC channels in inhibitory neurons on the border between CA1 stratum lacunosum moleculare and stratum radiatum regulate action potential generation induced by sevoflurane anesthesia, which may result in less memory deficit in interneuron-specific knock out mice of Orai1, the pore of CRAC channels.

研究分野：麻酔

キーワード：麻酔 CRACチャネル パッチクランプ法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬の作用起点の一つとして中枢神経系アストロサイトが挙げられるが、その伝達物質の放出に CRAC (Calcium-release activated calcium) チャンネルによるカルシウムシグナルが関わっている可能性が考えられるため、研究開始当初、麻酔薬メカニズムに海馬アストロサイト CRAC チャンネルが重要な役割を果たすのではないかと仮説を立てていた。それを検討するため、アストロサイト特異的な promoter である glial fibrillary acidic protein (GFAP) の制御下で Cre を発現する、GFAP Cre マウスを用いて研究を行う予定にしていたが、遺伝的に導入した蛍光色素 (GCaMP6) により海馬スライス標本の GFAP Cre の発現を観察すると、GFAP Cre は海馬 CA1 領域の神経細胞にもたくさん発現している事が分かったため、アストロサイト特異的な検討は難しいと判断した。我々は以前の研究で海馬 CA1 アストロサイトの伝達物質が抑制性神経細胞の興奮性を増強し神経伝達を制御している事を発見したため、今回の研究計画の際に得られた予備的な実験結果が抑制性神経細胞を介したものである可能性が考えられた。そのため、研究計画を変更し抑制性神経細胞に特異的な promoter である Gad2 (Glutamate decarboxylase 2) の制御下で Cre を発現する Gad2 Cre マウスを用いて、抑制性神経細胞の Orai1 を特異的に KO したマウス (Gad2 Cre, Orai1 fl/fl) を作成し、海馬抑制神経細胞における CRAC チャンネルの役割を検討する事とした。

### 2. 研究の目的

海馬 CA1 領域に分布する抑制性神経細胞における CRAC チャンネルが全身麻酔薬による抑制性シナプス伝達を調節し麻酔メカニズムに貢献している可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抑制性神経細胞特異的 CRAC チャンネルノックアウト (KO) マウス作成

CRAC チャンネルのコンディショナルノックアウトマウスを作成するため、そのチャンネルのポア蛋白である Orai1 遺伝子の両端に LoxP 配列が組み込まれた、Orai1 Flox マウス (Orai1 fl/fl) を米国シカゴに所在の Prakriya lab (Department of Pharmacology, Northwestern University Feinberg School of Medicine) から譲り受け、それと Gad2 Cre マウスとを交配する事により、抑制性神経細胞の Orai1 を特異的に KO したマウス (Gad2 Cre, Orai1 fl/fl) を作成した。

#### (2) 麻酔作用に関する行動実験

3-6 週のマウスを用い、まずはイソフルラン麻酔の KO マウスにおける効果を検討するために、1MAC イソフルラン麻酔 30 分暴露からの覚醒時間を野生型 (WT) マウスと比較した。麻酔導入後、マウスを背中側に寝かせ、マウスが腹側に戻った時点を覚醒時間と定義した。またこれと同様の実験を近年汎用されるセボフルラン麻酔でも検討した。

次に、Y 迷路により麻酔回復時の短期記憶障害を比較検討した。最初にセボフルラン麻酔暴露前の Y 迷路での成功率を測定し、その後 1MAC セボフルラン麻酔 30 分暴露後、1 時間の回復時間を設け、その時点での Y 迷路の成功率を麻酔作用による短期記憶障害とし、それを WT と KO で比較検討した。

#### (3) 海馬急性スライス標本を用いた細胞外記録

海馬急性スライス標本は二酸化炭素により深麻酔下で素早く脳を取り出し、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> でバブリングした氷冷スクロース溶液 (85 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 25 glucose, 75 sucrose, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub> [mM]) 中で脳を厚さ 250 μm、水平断でスライスを行う。その後、スライス切片を 30 分に復温した後にバブリングした人工脳脊髄液 (125 NaCl, 2.4 KCl, 1.2 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 25 glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub> [mM]) 中でスライスを室温保存した。この海馬急性スライス標本を用いて、細胞外記録により fEPSP (field-excitatory postsynaptic potential) を測定した。

#### (4) 海馬急性スライス標本を用いたパッチクランプ記録

ホールセルパッチクランプ法を用い、電極内液組成は 95 CsF, 25 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 NaCl, 2 Mg-ATP, 10 QX-314, 5 TEA-Cl, 5 4-AP (mM)、外液は人工脳脊髄液を用い、細胞膜電位を -70mV に固定して電流の記録を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 抑制性神経細胞特異的 CRAC チャンネルノックアウトマウス作成

米国より Orai1 fl/fl マウス到着後、マウスに常在する Mouse Norovirus 等のため、当施設への

導入には人工授精によるクリーン化が必要であり、まずはそれを行った。抑制性神経細胞の *Orai1* を特異的に KO したマウス作成に当たっては計画通り交配により行ったが、その遺伝子型の確認に *Orai1* fl/fl に関しては Forward primer: 5' -GAAA TGGCTCGGGGACAAAACACTA-3'、Reverse primer: 5' -GCCATTTCTGGTCTTCTGG AGACTCTG-3' で、*Gad2* Cre に関しては 5' -CACTGCATTCTAGTTGTGGTTG-3'、5' -TCGTTGCACTGACGTGTCT-3'、5' -AACAGTTTGATGAGTGAGGTGA-3' の3つの primer により homo, hetero, WT を区別できるように PCR のセッティングを行った(図1)。

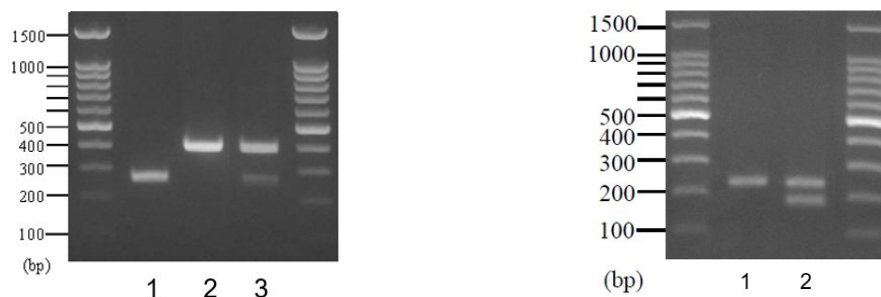


図1 マウス尻尾のPCR結果

(左) *Orai1* fl/fl のPCR結果 . 1: wild type, 2: homo, 3: hetero、(右) *Gad2* Cre のPCR結果 . 1: wild type, 2: hetero

#### (2) 麻酔作用に関する行動実験

まずはイソフルラン麻酔からの覚醒時間を KO マウス (*Gad2* Cre, *Orai1* fl/fl) と WT マウスで比較すると、KO マウスの方が WT マウスよりも有意に覚醒時間が短い事が分かった。これはより短時間作用で近年汎用されるセボフルラン麻酔でも同様の結果が得られたため、抑制神経細胞における CRAC チャンネルが全身麻酔メカニズムに寄与している可能性が考えられた。

次に、今回検討を予定した海馬により焦点を当てるため、Y 迷路により麻酔回復時の短期記憶障害を比較すると、WT、KO マウス共にセボフルラン暴露前は正常範囲内の結果であったが、セボフルラン麻酔暴露後は WT マウスが KO マウスよりも Y 迷路の正解率が低い結果であった。つまり、KO マウスの方が WT マウスよりもセボフルラン麻酔回復時の短期記憶力障害の程度が低い事が分かった。

#### (3) 海馬急性スライス標本を用いた細胞外記録

Y 迷路で得られた結果のメカニズムを検討していくため、記憶力の評価を海馬急性スライス標本の細胞外記録により測定する事とした。海馬スライス標本では Schaffer collateral という神経回路を頻回刺激する事により、LTP (long-term potentiation) という fEPSP が長時間増強される現象が見られ、これが記憶力と関係している事が知られている。WT・KO マウス共にセボフルランに暴露しない場合は Y 迷路の結果と同様に fEPSP の LTP が見られたが、セボフルラン麻酔からの回復時では LTP は WT マウスで大きく抑制されているのに対し、KO マウスではその抑制が小さい事が分かった(図2)。これにより行動実験の結果が海馬急性スライス標本でも再現されることが分かり、そのメカニズム検討も海馬スライス標本で行える可能性が示唆された。

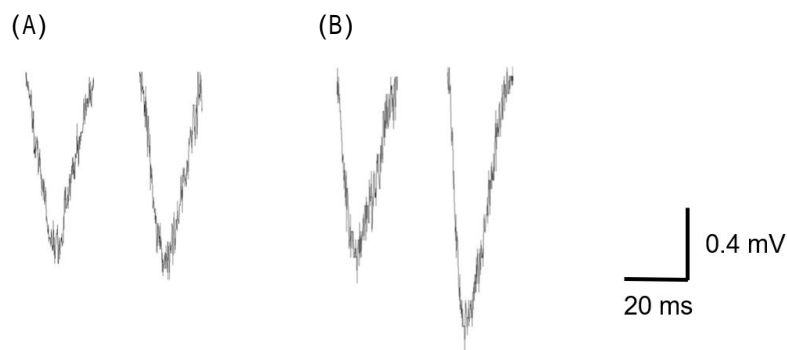


図2 WT・KO マウスにおけるセボフルラン暴露後の long-term potentiation

(A) WT; 左: 頻回刺激前 fEPSP, 右: 頻回刺激後 fEPSP, (B) KO; 左: 頻回刺激前 fEPSP, 右: 頻回刺激後 fEPSP

#### (4) 海馬急性スライス標本を用いたパッチクランプ記録

上記のように行動実験や細胞外記録で、抑制性神経細胞特異的 CRAC チャンネル KO マウスが全身麻酔回復時における記憶力障害が小さい事が分かったため、そのメカニズムを検討するためにスライスパッチクランプ記録を行った。吸入麻酔薬は海馬 CA1 領域の網状分子層 (stratum lacunosum moleculare) と放射状層 (stratum radiatum) との境界に存在する抑制性神経細胞に

作用し、抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current; IPSC)を制御する事が知られているため、それらの細胞からパッチクランプ記録を行い、まずは spontaneous IPSC (sIPSC)を比較した。WT・KO マウスでは baseline の sIPSC はその電流の頻度・振幅共に有意な差が見られなかったが、WT マウスではセボフルラン灌流により sIPSC の有意な頻度上昇が見られたのに対し、KO マウスではその頻度上昇が大きく抑制されている事が分かった (図 3)。

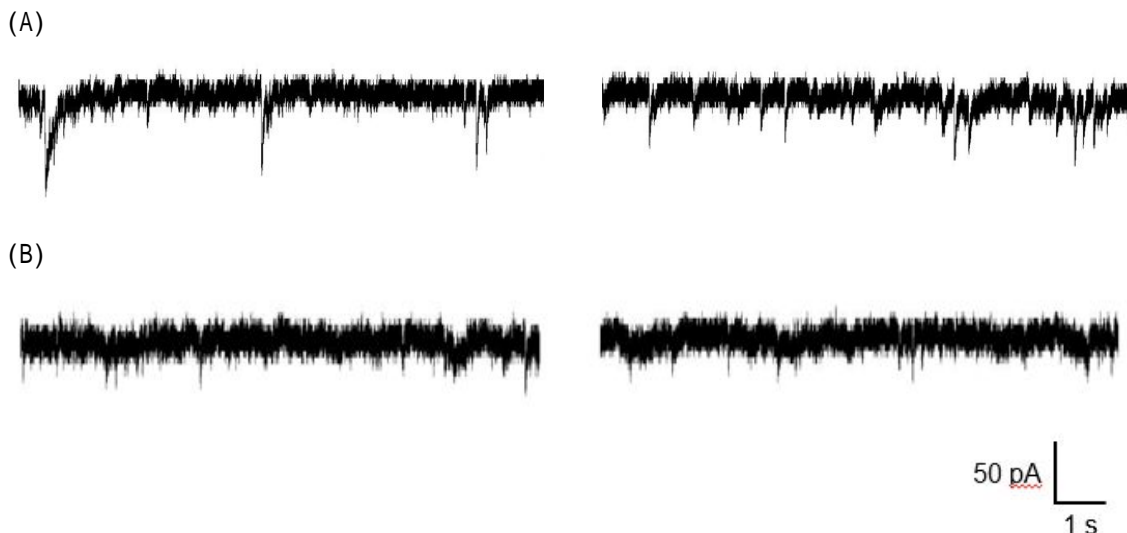


図 3 WT・KO マウスにおけるセボフルラン灌流前後の sIPSC  
(A) WT; 左: セボフルラン灌流前 sIPSCs, 右: セボフルラン灌流時 sIPSCs, (B) KO; 左: セボフルラン灌流前 sIPSCs, 右: セボフルラン灌流時 sIPSCs

WT マウスにおけるセボフルランに対する sIPSC の反応が活動電位に依存するか検討するために、テトロドトキシンを用いて活動電位非依存性の miniature IPSC (mIPSC)を記録すると、WT・KO マウス共に有意な反応は見られなかった (図 4)。このためセボフルラン灌流による sIPSC の頻度上昇は活動電位依存性のものである事が分かり、この活動電位発生に抑制性神経細胞における CRAC チャンネルが関わっている事が示唆された。



図 4 WT・KO マウスにおけるセボフルラン灌流前後の mIPSC  
(A) WT; 左: セボフルラン灌流前 mIPSCs, 右: セボフルラン灌流時 mIPSCs, (B) KO; 左: セボフルラン灌流前 mIPSCs, 右: セボフルラン灌流時 mIPSCs

つまり、セボフルランによる短期記憶障害に海馬抑制性神経細胞の CRAC チャンネルが関与している事が分かったが、中でも海馬 CA1 領域の網状分子層と放射状層との境界に存在する抑制性神

経細胞での CRAC チャンネルがセボフルランによる活動電位の発生に関わっており、そこでの CRAC チャンネルの不活性化が活動電位の発生を抑制することで、セボフルラン麻酔による記憶障害からの早期回復を促している可能性が考えられた。現在、その抑制性神経細胞における活動電位発生を直接、電気生理学的に記録する事によりそのさらなる詳細メカニズムを検討中であり、その結果と共に国際雑誌へ投稿予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maneshi Mohammad Mehdi, Toth Anna B., Ishii Toshiyuki, Hori Kotaro, Tsujikawa Shogo, Shum Andrew K., Shrestha Nisha, Yamashita Megumi, Miller Richard J., Radulovic Jelena, Swanson Geoffrey T., Prakriya Murali	4. 巻 33
2. 論文標題 Orai1 Channels Are Essential for Amplification of Glutamate-Evoked Ca <sup>2+</sup> Signals in Dendritic Spines to Regulate Working and Associative Memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108464 ~ 108464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108464	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 該当する
1. 著者名 Hori Kotaro, Tsujikawa Shogo, Novakovic Michaela M., Yamashita Megumi, Prakriya Murali	4. 巻 598
2. 論文標題 Regulation of chemoconvulsant induced seizures by store operated Orai1 channels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5391 ~ 5409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP280119	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 該当する
1. 著者名 Hino Hideki, Matsuura Tadashi, Kuno Miyuki, Hori Kotaro, Tsujikawa Shogo, Mori Takashi, Nishikawa Kiyonobu	4. 巻 133
2. 論文標題 Left Ventricular Hypertrophy Increases Susceptibility to Bupivacaine-induced Cardiotoxicity through Overexpression of Transient Receptor Potential Canonical Channels in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 1077 ~ 1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ALN.0000000000003554	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 Toth Anna B., Hori Kotaro, Novakovic Michaela M., Bernstein Natalie G., Lambot Laurie, Prakriya Murali	4. 巻 12
2. 論文標題 CRAC channels regulate astrocyte Ca <sup>2+</sup> signaling and gliotransmitter release to modulate hippocampal GABAergic transmission	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaaw5450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaw5450	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 該当する

1. 著者名 TsujiKawa Shogo, Matsuura Tadashi, Hori Kotaro, Mori Takashi, Kuno Miyuki, Nishikawa Kiyonobu	4. 巻 126
2. 論文標題 Superior Efficacy of Lipid Emulsion Infusion Over Serum Alkalinization in Reversing Amitriptyline-Induced Cardiotoxicity in Guinea Pig	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesia & Analgesia	6. 最初と最後の頁 1159 ~ 1169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/ANE.0000000000002707	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 山田 有季、穴田 夏樹、内藤 祐介、堀 耕太郎、堀江 里奈、水谷 光、山崎 広之	4. 巻 27
2. 論文標題 リアル症例カンファレンス in Osaka そのおばあちゃん, TAVI しますか?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 LiSA	6. 最初と最後の頁 467 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.3101201657	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 水谷 光、穴田 夏樹、内藤 祐介、堀 耕太郎、堀江 里奈、山崎 広之、山田 有季	4. 巻 27
2. 論文標題 リアル症例カンファレンス in Osaka 緊急のフルストマック	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 LiSA	6. 最初と最後の頁 75 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.3101201565	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 重里 尚、山田 徳洪、辻川 翔吾、日野 秀樹、堀 耕太郎、西川 精宣	4. 巻 23
2. 論文標題 経カテーテル大動脈弁置換術 (TAVR) における術後嘔気嘔吐 (PONV) の危険因子の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovascular Anesthesia	6. 最初と最後の頁 43 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11478/jscva.2019-2-001	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kotaro Horii, Andrew Shum, Anna Toth, Mehdi Mohammad Maneshi, Richard J. Miller, Murali Prakriya
2. 発表標題 Potential roles of Store-operated Orai1 channels in regulation of neuronal excitability and seizures
3. 学会等名 FASEB SRC Calcium and Cell Function (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀 耕太郎、松浦 正、辻川 翔吾、日野 秀樹、森 隆、西川 精宣
2. 発表標題 脂肪乳剤投与はセボフルラン麻酔に対する拮抗作用を有する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯上 駿、堀 耕太郎、黒木 円花、日野 秀樹、松浦 正、森 隆
2. 発表標題 心臓手術直後の心電図QT時間はICU滞在日数の延長を予測する: 後ろ向き観察研究
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021年

〔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

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
---------	---------