

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18272

研究課題名（和文）GABAA受容体 5サブユニット選択的阻害薬が術後の認知機能と疼痛に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effects of selective inhibitors of GABAA alpha5 subunit on postoperative cognitive function and pain

研究代表者

井浦 晃（Iura, Akira）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40467551

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）：マウス術後疼痛モデルに対しブレンオルフィンを投与して鎮痛を行い、GABAA受容体5サブユニット阻害薬であるL-655708を投与するL群と、対照として生理食塩水を投与するN群の2群に無作為に分けて観察した。行動実験の結果、L-655708が安全に投与可能であることを確認した。マウスより脊髄スライスを作成し、人工脳脊髄液で灌流した状態で脊髄後角SG細胞に対してホールセルパッチクランプを行い、細胞電流を記録した。0mVで電位固定し、ベースラインの記録を行った後、灌流液にL-655708を加え、GABAA受容体5サブユニット介在性電流を測定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔後の認知機能障害の予防策ないし治療法を開発することは、非常に重要な意義を持つと考えられる。記憶・学習を司る海馬に多く存在することが知られているGABAA受容体5サブユニットに対する選択的阻害薬の投与により、海馬の神経細胞の興奮性を増強することで、記憶・学習の効率を高めることができるのではないかと期待されている。

本研究では、マウスの全身麻酔術後疼痛モデルに対してGABAA受容体5サブユニット選択的阻害薬を投与し、記憶・学習機能に対する効果を調べた。また、術後疼痛に与える影響を行動学実験及び脊髄スライスを用いたパッチクランプによる電気生理学実験で検証した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated effects of selective inhibitors of GABAA receptor 5 subunit on postoperative cognitive function and pain. Buprenorphine was administered to a mouse model of postoperative pain for analgesia, and the mice were randomly divided into two groups: group L, which received L-655708, a GABAA receptor 5 subunit inhibitor, and group N, which received saline as a control. Results of behavioral experiments confirmed that L-655708 could be safely administered. Spinal cord slices were prepared from mice, and whole-cell patch clamps were performed on spinal cord dorsal horn SG cells while perfused with artificial cerebrospinal fluid to record cell currents. After potential fixation at 0 mV and baseline recording, L-655708 was added to the perfusion solution and GABAA receptor 5 subunit-mediated current was measured.

研究分野：麻酔科学

キーワード：GABAA受容体 5サブユニット Tonic電流

### 1. 研究開始当初の背景

現在医療現場では、新生児から高齢者まで多くの人々が手術や検査のために全身麻酔を受けている。全身麻酔薬投与後に発生する認知機能障害は個人差が大きい、高齢者ではそのリスクが増大する。遷延する認知障害は患者のQOLを低下させるのみならず、入院期間の長期化など医療費の増大にもつながり、社会全体へ悪影響を及ぼす。そのため、全身麻酔後の認知機能障害発症のメカニズムを解明し、その予防法ないし治療法を開発することは、患者にとってもまた社会にとっても、非常に大きな意義があると考えられる。本研究以外にも、認知機能障害発症のメカニズムを解明し、その予防・治療を行うことを目的として、様々な部分にフォーカスを当てた多様な研究が世界中で進行している。

全身麻酔薬の主要な機序は、抑制性神経伝達を担う GABAA 受容体の作用増強であると考えられている。GABAA 受容体は Cl<sup>-</sup> イオンのイオンチャンネル型受容体であり、神経細胞内への Cl<sup>-</sup> イオンの流入により細胞膜の電位を過分極させ、神経細胞の興奮を抑制する。GABAA 受容体は5つのサブユニットからなる五量体であり、これまでに19種類のサブユニットが確認されている。これらのサブユニットは、脳内の決まった部位に多く発現することで、特定の機能に強く関与している。記憶・学習をつかさどる海馬には脳内の他の部位と比較して、5サブユニットが多く存在することが示されている。よって、GABAA 受容体の5サブユニット選択的阻害薬は、海馬の神経細胞の興奮性を増強して記憶・学習の効率を高めることによって、記憶障害をもたらす薬剤や病態に対する有効な治療薬となる可能性がある。

これまでの研究では、GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬が全身麻酔後の記憶評価テストのスコアを改善するという報告があるが、これは手術侵襲のない全身麻酔のみのモデルにおける報告である。一方、GABAA 受容体5サブユニットは脊髄後角にも存在しており、疼痛のコントロールにも重要な役割を果たしていることが明らかにされている。そのため、GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬の投与は鎮痛という観点から見ると、痛みを増強する可能性が考えられる。痛みの増悪は、結果として患者の離床を遅らせ、QOLの低下につながる可能性が危惧される。

### 2. 研究の目的

これまでの研究では、GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬が全身麻酔後の記憶評価テストのスコアを改善するという報告があるが、これは手術侵襲のない全身麻酔のみのモデルにおける報告である。一方、GABAA 受容体5サブユニットは脊髄後角にも存在しており、疼痛のコントロールにも重要な役割を果たしていることが明らかにされている。そのため、GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬の投与は鎮痛という観点から見ると、痛みを増強する可能性が考えられる。痛みの増悪は、結果として患者の離床を遅らせ、QOLの低下につながる可能性が危惧される。以上のことから、本研究課題の核心は、全身麻酔後の認知機能障害に対して、GABAA 受容体5サブユニットが予防及び治療薬開発のターゲットとなりうるのか? という疑問を明らかにすることである。

記憶障害改善薬は、術後患者のみならず、多くの認知機能低下患者にとって大きなメリットをもたらす。このため、多くの研究機関・製薬企業が GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬に注目して多種類の薬剤の開発が進められている。実際に、GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬である RG1662 は、成人ダウン症患者及びアルツハイマー病患者の認知機能障害に対する治療効果が期待され、すでに治験が開始されている。本研究の先行研究としては、吸入麻酔薬イソフルラン投与後のマウスにおいて、GABAA 受容体5サブユニット阻害薬である L-655708 が記憶力低下を抑制することが示されている。(Zurek et al. Anes Anal, 2012, 114: 845-855)

本申請者はこれ以外に、本邦で一般的に使用されているセボフルラン・プロポフォールで同様の実験を行っており、これらの結果から5サブユニット阻害薬が全身麻酔後の認知機能障害を改善する効果が期待できると考えている。しかしこれらの研究は疼痛刺激のない全身麻酔のみのモデルに対するものであり、術後疼痛との関連についてはほとんど調べられていない。本研究では、マウスの全身麻酔術後疼痛モデルを用い、GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬の効果を術後の認知機能のみならず、疼痛に対しても検証することで、実際に臨床使用の可能性が広がれると考える。

近年、海馬は成人での神経細胞の新生 (neurogenesis) の場としても注目されているが、新生した神経細胞の移動やシナプス形成には、GABA が重要な役割を果たしていることも報告されている (Pallotto, M. and Deprez, F. Front Cell Neurosci. 2014; 8: 166.)。本研究の将来的な発展として、海馬で新生した神経細胞に対して麻酔薬が及ぼす影響を調べることも考慮している。

### 3. 研究の方法

GABAA 受容体5サブユニット選択的阻害薬である L-655708 がマウスの術後記憶及び疼痛に及ぼす影響を行動実験で調べる。全身麻酔下にマウス術後疼痛モデルを作成し、麻酔終了後に L-

655708 を投与し、記憶評価試験及び疼痛行動実験を行い、生理食塩水を投与した対照群と比較する。さらに、実臨床に近い形で評価するために、麻酔終了後に鎮痛薬を投与して行動実験を行う。また、脊髄スライスを作成して脊髄後角 SG 細胞に対しパッチクランプを行い、L-655708 を灌流投与して SG 細胞における GABA 電流全体に占める 5 サブユニット介在性電流の割合を測定し、GABAA 受容体 5 サブユニット選択的阻害薬が術後鎮痛に及ぼす影響を電気生理学的に検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 行動実験

8 週齢のオス C57BC6 マウスを 3% 吸入セボフルランで麻酔し、術後疼痛モデルを作成した。全体を無作為に 2 群に分け、L-655708 を投与する L 群と、対照として生理食塩水を投与する N 群とする。手術は Gu らの手法を用いた (Gu et al. J Pain 2018 in press)。すなわち、消毒後に足底皮膚を長軸方向に 0.5 cm 切開し、No11 ブレードメスで趾伸筋を切開した。創はマットレス縫合して手術を終了した。麻酔薬投与終了時に L 群は L-655708 (0.7mg/kg) を腹腔内投与し、1 回/日で継続した。N 群は生理食塩水を同量投与した。

その後、麻酔薬からの覚醒を確認し、麻酔薬暴露 24 時間後・48 時間後・72 時間後に記憶力の評価テストとしてバーズ迷路試験及び物体再認試験を行い、セボフルラン麻酔後の記憶力に L-655708 が与える効果を検証した。また、Incapacitance テストを行い下肢への体重の荷重の測定およびマウスが患肢をなめる動作回数の測定を行うことで、L-655708 が術後疼痛に及ぼす影響を検証した。

その後、より実際の臨床に近い形で、GABAA 受容体 5 サブユニットの選択的阻害 L-655708 が術後疼痛に対する鎮痛薬として最小の合併症で使用できるのかを具体的に検証するために、術後疼痛に対して鎮痛薬を投与し、その効果を検証した。全身麻酔終了後から鎮痛薬としてブプレノルフィン 2 mg/kg の皮下投与 1 回/日を行い、術後鎮痛を行った。ブプレノルフィンの鎮痛作用に L-655708 が及ぼす影響を疼痛の評価を行動実験で行い検証した。

これらの結果から、GABAA 受容体 5 サブユニット阻害薬である L-655708 の腹腔内投与が、セボフルラン麻酔後のマウス足趾術後モデルにおいて認知機能を改善するという結果が得られた。また、術後疼痛に関しては、生理食塩水を投与した対照群と比較して、有意な変化は認められなかった。

##### (2) 電気生理学的実験

8 週齢のオス C57BC6 マウスを麻酔し、椎弓切除を行って脊髄を摘出し、500 μm の厚さで脊髄スライスを作成した。これを人工脳脊髄液 (ACSF) で灌流した状態で、拡大鏡下に脊髄後角 SG 細胞に対してホールセルパッチクランプ (voltage clamp) を行い、細胞電流を記録した。0mV で電位固定し、電位依存性 Na チャネル及びグリシン受容体の影響を除外する目的で、灌流液中にテトロドトキシン (0.5 μM) 及びストリキニン (2 μM) を加え、GABAA 受容体介在性抑制性電流を記録した。ベースラインの記録を行った後、灌流液に L-655708 (50nM) を加え、電流の変化を観察した。GABAA 受容体により発生する電流は、チャンネルが一過性について発生する phasic 電流と、チャンネルが持続的に開いて発生する tonic 電流の 2 種類があり、パッチクランプ法の記録では phasic 電流はスパイク波形として記録され、tonic 電流は薬剤投与に伴う基線変化として記録される。

SG 細胞における 5 サブユニットを含む受容体は主として tonic 電流を担っていると考えられ、L-655708 投与により低下した基線の電流値を 5 サブユニット介在性電流 (A1) として測定した。その後、GABAA 受容体の非選択的阻害薬である bicuculline (20 μM) を投与してすべての tonic 電流をブロックし、このときの基線変化の電流値を A2 として測定した。A1+A2 が GABAA 受容体の tonic 電流の全体値であり、A1/(A1+A2) が GABAA 受容体 tonic 電流の中に占める 5 サブユニット介在性電流の比率である。この実験により、マウス脊髄後角 SG 細胞の GABAA 受容体 tonic 電流全体における 5 サブユニット介在性電流の比率が測定できた。これが、脊髄後角を介した疼痛刺激に対して 5 サブユニット阻害薬 L-655708 が及ぼす影響の大きさに関係しているのではないかと推測された。

##### (3) 研究計画の遅れと今後の予定について

2019 年度から開始した本研究は、新型コロナウイルスの流行に伴う様々な影響を受け、当初の予定を 2 年間延長して 5 年間継続した。まだデータが不足している部分に関しては、今後も実験を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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