

機関番号：32666

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591820

研究課題名 (和文) 麻酔薬・麻酔法による体内遺伝子、蛋白、代謝物変動の総括的検討

研究課題名 (英文) Integrated examination of the effects of general anesthetics on genomics, proteomics and metabolomics

研究代表者

坂本 篤裕 (SAKAMOTO ATSUHIRO)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30196084

研究成果の概要 (和文)：

全身麻酔による遺伝子、蛋白、代謝物の変化をゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスにより検討し、以下の結果を得た。①全身麻酔は脳内時計遺伝子発現を抑制し、概日行動リズムにも影響する。②吸入麻酔薬は静脈麻酔薬に比して、脳内蛋白発現変化の程度が大きい。③吸入麻酔薬に比して静脈麻酔薬が、時間経過とともに脳代謝に大きな影響を及ぼす。これらの結果は、系統別のさらなる分子生物学的検討の必要性を示唆した。

研究成果の概要 (英文)：

The effects of general anesthetics on the changes of internal gene expression, protein expression and metabolites were evaluated by genomics, proteomics, and metabolomics. The main results are as follows. ① The general anesthetics affects the clock gene expression in the brain and influences circadian rhythm. ② The inhalational anesthetic influences the change of protein expression in the brain more than intravenous anesthetic. ③ The intravenous anesthetic influences the brain metabolism more than inhalational anesthetic. These results suggested the need of the further molecular biologic examination according to the each biological system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔薬、遺伝子発現、蛋白変動、代謝物変動

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔は外科手技に必要な不可欠なものとして150年以上使用されてきたものの、その安全性については、実際の臨床における予後などにより裏付けされるだけである。通常の臨床指標にあらわれてこない麻酔薬による細

胞・組織への影響を包括的かつ詳細に検討することは、麻酔作用の機序解明のみならず、実際に気付かれていない麻酔作用の解明により、麻酔薬および麻酔法の選択から患者管理をより安全に行うための指針となりうる。さらにこれらの検討が新たな副作用の少ない麻

酔薬開発の一助となりうると考えた。

2. 研究の目的

全身麻酔薬である吸入麻酔薬（セボフルラン、イソフルラン）と静脈麻酔薬（プロポフォール、デクスメドミジン）自身が分子レベルで生体に如何に影響するか、特に全身重要臓器中の既知の遺伝子発現、蛋白発現、ならびに代謝物変動に如何に影響するかを総括的多変量的に明らかにし、麻酔による変化物質を捉え、また、麻酔薬による異同を明らかにする。さらに、過去の研究で明らかにした遺伝子発現変動と、蛋白発現変動および代謝物変動を相互的に解析し、個々の変動物質の関係と、麻酔・麻酔薬がどのレベルにおいて如何に作用するかを明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 全身麻酔による遺伝子発現変動測定

①静脈麻酔薬による脳内日内変動遺伝子発現への影響：ラットを対象にプロポフォール麻酔群、デクスメドミジン麻酔群、対照としての脂肪製剤投与群、生理食塩水投与群の4群に分類し、各薬物投与6時間後、および麻酔群では覚醒24時間後に断頭し、全脳を用いて **realtime RT-PCR** を行い、代表的脳内サーカディアン遺伝子 (**Arc, Dbp, Egr1, Egr2, NGFI-B, Per2, Tef**) 発現を測定した。

②薬物代謝関連肝内遺伝子発現への影響：ラットを対象に、セボフルラン、イソフルラン、プロポフォール、デクスメドミジンによる麻酔を6時間行い、また、6時間の麻酔から覚醒後24時間において、肝臓を摘出した。麻酔薬の代謝自身には直接関係のない8つの遺伝子 (**Cyp7a1, Cyp2b15, Por, Nr1i2, Ces2, Ugt1a7, Abcb1a, Abcc2**) の mRNA 発現量を **realtime RT-PCR** 法により測定した。

③視交叉上核における時計遺伝子発現変動と概日行動リズムへの影響：マウスを対象に臨床使用量のセボフルランによる麻酔を施行し、**in situ hybridization** を用いて SCN における **mouse Per2 (mPer2)** 発現量を測定し、さらに、麻酔後の行動変化の解析、ならびに **Per2** 発現調節因子である **nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)** 濃度への麻酔薬の影響、さらに、麻酔覚醒後の概日活動リズムを検討した。

(2) 全身麻酔薬による脳内蛋白発現変動測定

ラットを対象に、プロポフォールおよびセボフルランの臨床使用濃度における麻酔をそれぞれ6時間行い、麻酔終了0, 1, 3, 7, 28日後に断頭し、抽出された全脳を用いて、2次元電気泳動と質量分析法によるプロテオ-

ム解析を行った。

(3) 全身麻酔による脳代謝像解析

ラットを対象に、プロポフォールおよびイソフルランの臨床使用濃度における麻酔をそれぞれ2時間および6時間行い、麻酔終了後に断頭し、抽出された全脳の水溶性成分から **NMR** スペクトラムを測定した。得られた **NMR** スペクトラムは主成分分析を行い、**Principal Component (PC) score** と **Loading Plot** を作成し、脳代謝状態の特徴を抽出し、また、両麻酔薬における脳代謝状態の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 全身麻酔による遺伝子発現変動測定

①静脈麻酔薬による脳内日内変動遺伝子発現への影響：プロポフォール麻酔により **Dbp (D site albumin promoter binding protein)** 発現は増加し、他の遺伝子発現が減少した。これらの変化は覚醒後24時間でも持続し、対照に比し有意差を示した。一方、デクスメドミジン麻酔により **Dbp** と **Tef (thyrotroph embryonic factor)** 以外の遺伝子発現が減少した。覚醒後24時間後には、これらの変化が麻酔前値に復した。以上の結果より、麻酔薬の種類により若干の差異はあるものの、吸入麻酔と同様に総じて、サーカディアン遺伝子発現が抑制されることが示され、静脈麻酔薬においてもサーカディアンリズムを変調させる可能性が示唆された。また、麻酔薬の種類により覚醒後の影響が長時間持続する可能性も示唆された。本研究は、従来報告されていなかった静脈麻酔薬による脳内日内変動遺伝子への影響を初めて明らかにしたものであり、全身麻酔における麻酔薬・麻酔法の適切な選択ならびに今後の研究の方向性を示し、臨床における患者管理の安全性向上に有意義なものである。

②薬物代謝関連肝内遺伝子発現への影響：6時間の麻酔後において、全ての麻酔薬で麻酔後同様な変化を示した遺伝子 (**Por, Nr1i2, Ces2**) と麻酔薬に特異的に変化する遺伝子が認められた。さらに、覚醒後24時間において、8つの遺伝子は、いずれかの麻酔薬を使用すると遺伝子発現量変化が麻酔前に復しておらず、全ての麻酔薬で麻酔前の発現量に復しない遺伝子 (**Nir, Ces2**)、個々の麻酔薬によりさらに変動が増強している遺伝子 (**Cyp2b15, Ces2, Ugt1a7, Abcb1a**) も認めた。これらの結果より、麻酔薬の種類により麻酔後の薬物代謝に異なった影響をおよぼす可能性、さらに覚醒後でも薬物代謝に影響し続ける可能性が示唆された。本研究は、従来報告されていなかった全身麻酔薬による薬物代謝酵素関連遺伝子への長期的な影響を初めて明らかにし

たものであり、周術期薬物投与における警鐘ならびに研究の方向性を示し、臨床における患者管理の安全性向上に有意義なものである。

③視交叉上核における時計遺伝子発現変動と概日行動リズムへの影響：主に4つの結果を得た。i) *mPer2*は概日リズムを呈し、本来発現していない夜間に光照射を行うと一過性に発現が誘起されるが、セボフルラン麻酔により抑制される。ii) 概日リズムに従う昼間期での *mPer2* 増加をセボフルラン麻酔は抑制し、覚醒2日後においても周期的な発現抑制を示す。iii) 午前中の麻酔により夜間の活動開始時刻が遅延し、さらに麻酔翌日の一日活動量が減少する。iv) 麻酔後には、SCNにおける NAD^+ 濃度が非麻酔群に比して有意に上昇する。これらの結果は、セボフルラン麻酔による NAD^+ の増加がSCNにおける *mPer2* 発現を抑制し、また麻酔薬による *mPer2*の抑制は、麻酔後の概日行動リズムにも影響を及ぼすことが示唆された。本研究は、揮発性麻酔薬が特定の脳内時計遺伝子発現に及ぼす効果に関して詳細に検討し、その機序を考察したものであり、全身麻酔機序解明にも関連する、今後の研究展開を行う上で重要な基礎的データを示し、また、臨床的にも麻酔覚醒過程における気分障害や行動障害といった問題点や高次脳機能調節への影響を解析するための重要な知見へと繋がる有意義なものである。

(2)全身麻酔薬による脳内蛋白発現変動測定
少なくとも1測定点で強度変化の見られたスポットは、プロポフォール群で45種類、セボフルラン群で65種類であった。HSP70、HSP84bといったストレス・細胞死関連のタンパクは両群で減少したが、神経発育系、細胞代謝系、信号伝達系タンパク変化は強度よび持続時間に相違があり、特に *Ulip2* や *DHPL2* は両群で正反対の変化を認めた。また、プロポフォール麻酔は麻酔後数日にピークをもつ軽度の変化を示すのに対して、セボフルラン麻酔は麻酔直後からより強い変動ピークをむかえ、数日から28日までタンパク変動が残存する傾向を認めた。これらの結果は、麻酔薬により脳プロテオームへの影響は異なり、セボフルラン麻酔はプロポフォール麻酔より脳プロテオームにより強く、また長期間にわたり影響を及ぼすことを示した。本研究は広く臨床応用されている静脈麻酔薬と吸入麻酔薬の脳プロテオームにおよぼす影響が異なることをラット実験モデルにおいて明らかにし、またその解析から、臨床麻酔の安全性を向上させる相違点を指摘するとともに、一連の全身麻酔機序解明の研究における一助となる有意義なものである。

(3)全身麻酔による脳代謝像解析
イソフルラン麻酔群は対照群と比較して PC score の分離がみられなかったが、プロポフォール麻酔群では明らかな分離を認め、時間経過とともに大きく分離した。またこの分離に強く影響を及ぼしていたのは酢酸であった。これらの結果は、イソフルランに比べてプロポフォールが脳代謝に大きな影響を及ぼすことと、プロポフォール投与が、麻酔作用を増強することで知られる酢酸濃度をより増加させることを明らかとし、長時間麻酔におけるイソフルランの安全性を推察させた。本研究は広く臨床応用されている静脈麻酔薬と吸入麻酔薬の脳代謝におよぼす影響が異なることをラット実験モデルにおいて明らかにし、またその解析から、麻酔作用のメカニズムを推察させる脳内代謝物を特定することに成功し、今後の全身麻酔機序解明の方向性をも示した有意義なものである。

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10件)

- ① Tsuboko Y, Sakamoto A: Propofol anaesthesia alters the cerebral proteome differently from sevoflurane anaesthesia. *Biomedical Research* 32: 55-65, 2011. (査読有り)
- ② Ohe Y, Iijima N, Kadota K, Sakamoto A, Ozawa H: The general anesthetic sevoflurane affects the expression of clock gene *mPer2* accompanying the change of NAD^+ level in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neuroscience Letters* 490: 231-6, 2011. (査読有り)
- ③ Kawaguchi H, Hirakawa K, Miyauchi K, Koike K, Ohno Y, Sakamoto A: Pattern recognition analysis of proton nuclear magnetic resonance spectra of brain tissue extracts from rats anesthetized with propofol or isoflurane. *PLoS One*. 5: e11172, 2010. (査読有り)
- ④ Yoshida Y, Nakazato K, Takemori K, Kobayashi K, Sakamoto A: The influences of propofol and dexmedetomidine on circadian gene expression in rat brain. *Brain Research Bulletin* 79: 441-444, 2009. (査読有り)
- ⑤ Nakazato K, Yoshida Y, Takemori K, Kobayashi K, Sakamoto A: Expressions of

genes encoding drug-metabolizing enzymes are altered after sevoflurane, isoflurane, propofol or dexmedetomidine anesthesia. Biomedical Research 30, 17-24, 2009.
(査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ohe Y, Sakamoto A, et al., The general anesthetic sevoflurane effects the expression of clock gene mPer2 accompanying the change of NAD(+) level in the suprachiasmatic nucleus of mice, American Society of Anesthesiologists 2010 Annual Meeting, 2010 年 10 月 16 日、San Diego、USA
- ② 大江裕美子、坂本篤裕、他、全身麻酔薬 sevoflurane は時計遺伝子 mPer2 の発現を NAD 上昇を伴い抑制する、日本麻酔科学会第 57 回学術集会、2009 年 6 月 4 日、福岡
- ③ 坪光祥晃、坂本篤裕、他、Propofol による脳プロテオームへの影響、日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2008 年 8 月 16 日、神戸
- ④ 中里桂子、坂本篤裕、他、セボフルラン、イソフルラン麻酔後のラット肝臓における薬物代謝系遺伝子発現への影響、日本麻酔科学会第 55 回学術集会、2008 年 6 月 12 日、横浜
- ⑤ 吉田結富子、坂本篤裕、他、Propofol と dexmedetomidine による脳内 circadian gene の発現、日本麻酔科学会第 55 回学術集会、2008 年 6 月 12 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 篤裕 (SAKAMOTO ATSUHIRO)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30196084

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：