

令和 5 年 4 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20956

研究課題名(和文) 幼若期の麻酔薬暴露による遅発性認知機能低下の分子メカニズム解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying cognitive decline at adult stage induced by neonatal exposure to midazolam and development of a therapeutic strategy

研究代表者

土井 浩義 (DOI, HIROYOSHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60906337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：幼少期に複数回の麻酔薬暴露を受けると、遅発性の学習・記憶障害を引き起こすことがこれまでに分かっていたが、その理由は十分に解明されていなかった。本研究により、麻酔薬(ミダゾラム)への早期曝露がマウス海馬における神経幹細胞のクロマチンアクセス性および遺伝子発現を継続的に変化させ、成体期に至るまで神経幹細胞を強制的かつ長期的に休止させることが原因であることを発見した。また、麻酔薬誘導性の神経幹細胞の継続な休止により、発達期から成体期にかけて新生されるニューロンが少なくなるために、後天的な学習・記憶障害を引き起こされることが分かった。さらに、自発的運動はその学習・記憶障害を改善しうることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明とされてきた麻酔薬誘導性の遅発性の学習・記憶障害のメカニズム解明に成功した数少ない研究成果であり、本研究によりさらに麻酔学領域での研究が発展するものと思われる。また本研究では、自発的運動がマウスにおける麻酔薬誘導性の認知機能低下を改善することを見出しており、これはヒトにおいても有効な治療法となりうる可能性があり、将来的な臨床への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：There is abundant evidence that environmental insults, such as exposure to anesthetics, at early-life stages impair brain functions in later life, but the underlying mechanisms are poorly understood. Neural stem cells (NSCs) express inhibitory neurotransmitter -aminobutyric acid type A receptors that are the main target of most anesthetics, including midazolam (MDZ). We found that early-life exposure to MDZ persistently alters chromatin accessibility and global transcription to reinforce long-lasting NSC dormancy in the mouse hippocampus until adulthood, resulting in reduced neurogenesis and cognitive decline. Furthermore, a simple physical activity, running, could overcome these adverse outcomes by normalizing MDZ-induced transcriptomic alterations. Our study provides insights for further understanding and developing therapeutic strategies for neurological disorders induced by early-life exposure to anesthetics.

研究分野：麻酔学

キーワード：ニューロン新生 神経幹細胞 記憶・学習障害 ミダゾラム 麻酔薬曝露 GABA クロマチン 自発的運動

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めたこれまでの研究結果より、幼若期の麻酔薬暴露と成体期以降の認知機能低下の関連性が指摘されていたが、詳細な分子メカニズムについては依然として不明であった。一方で、ヒトを含めた哺乳類において、海馬の一部領域(歯状回)にニューロンを作ることのできる神経幹細胞が存在し、神経幹細胞の増殖を介した継続的なニューロンの新生が成体期以降の学習・記憶機能維持に貢献していることが知られていた。ここで、神経幹細胞の増殖は、局所神経回路から放出される GABA シグナルにより抑制されること、また GABAA 受容体はミダゾラムを含む多くの麻酔薬の重要なターゲットであることから、我々のグループは麻酔薬暴露後に起こる成体期以降の認知機能低下は、GABA シグナルによる神経幹細胞の増殖抑制とそれに付随するニューロン新生抑制により引き起こされていると考えた(図 1)。その仮説の基づき、麻酔薬による神経幹細胞の増殖抑制メカニズムの解明を進めるとともに、低下した認知機能の改善法開発に挑戦した。

2. 研究の目的

本研究は、神経幹細胞の RNA-seq 解析を用いて、ミダゾラム暴露とその後の認知機能低下の背景にある分子メカニズムを解明し、ヒトにも応用可能な認知機能改善を開発することを目的とした。麻酔薬を使った過去の研究は、ニューロンもしくはニューロンと相互作用するグリア細胞に着目したものがほとんどであるのに対し、本研究ではニューロンを産生する神経幹細胞の挙動に焦点を当てたものであり、その点にこの研究の独自性がある。また、本研究では遺伝子改変マウスと FACS を用いて神経幹細胞を単離してシーケンスを行う予定であり、これは過去に例のない実験系であり、このシーケンス結果の解析は麻酔薬暴露後の認知機能低下のメカニズム解明に繋がると考えられた。

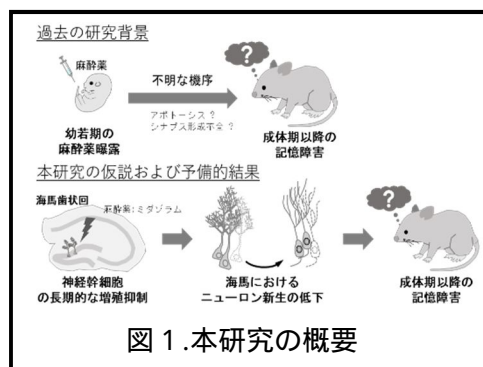


図 1. 本研究の概要

3. 研究の方法

1. 神経幹細胞の増殖抑制に関わる候補因子の選定

これまでに我々のグループは、幼若期ミダゾラム暴露を受けたマウスは、海馬神経幹細胞の増殖が成体期まで持続して抑制されることを発見し(図 2)、その結果、ニューロン新生の減少、および海馬依存的な記憶機能低下が見られることを発見した(図 3)。本研究では、神経幹細胞の挙動制御に関わる候補遺伝子の同定を試みた。

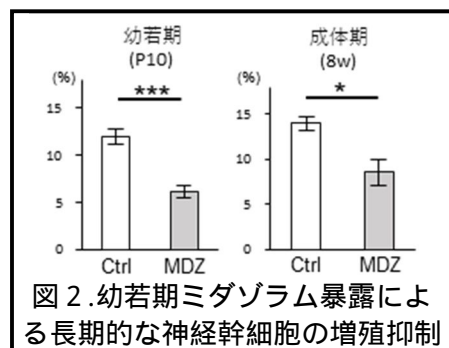


図 2. 幼若期ミダゾラム暴露による長期的な神経幹細胞の増殖抑制

具体的には、健常およびミダゾラムを投与した Nestin-GFP マウスの海馬から、GFP の蛍光を指標に神経幹細胞を直接単離、RNA を回収し、RNA-seq を行った(図 4)。健常およびミダゾラム投与マウスの遺伝子発現パターンを比較して、ミダゾラム投与により優位に変化した遺伝子を抽出した。さらに GO 解析や GSEA 解析、ネットワーク解析などから候補遺伝子を絞り込みを行い、候補遺伝子の探索を行った。ここでは、ミダゾラム投与直後(幼若期)および成体期のサンプルを回収し、神経幹細胞の挙動が長期間乱れる原因を探った。

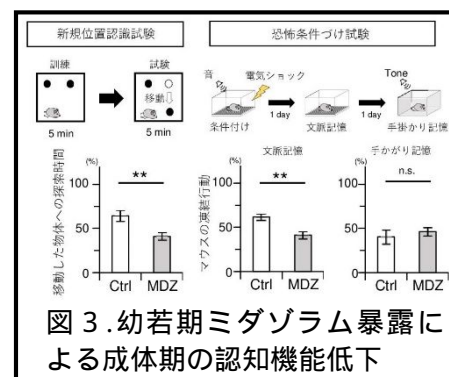


図 3. 幼若期ミダゾラム暴露による成体期の認知機能低下

2. 神経幹細胞の増殖抑制メカニズムの解明

増殖細胞にのみ感染するレトロウイルスを用いて、海馬神経幹細胞特異的に、1. の解析から得られる候補遺伝子の発現を制御した。健常あるいはミダゾラム暴露マウスの海馬神経幹細胞で候補因子の発現・機能を制御した場合、低下したニューロン新生が回復するのかどうかを免疫染色により評価し、ミダゾラム暴露により神経幹細胞の増殖が抑制されるメカニズムを解明しようと試みた。

3. 麻酔薬で低下したニューロン新生および認知機能改善法の創出

申請者のグループはこれまでに、自発的運動はニューロン新生を促進することで認知機能を改善することを報告しており 1) (PNAS 2018)、麻酔薬(ミダゾラム)暴露誘導性に低下した神経幹

細胞の増殖および認知機能の回復にも有効だと見込まれる。幼若期の麻酔薬暴露は、その臨床的必要性から回避は難しいため、麻酔薬暴露以降の治療的介入が必要とされる。そこで本研究では、自発的運動が、幼若期ミダゾラム暴露で低下した神経幹細胞の増殖およびニューロン新生の回復に有効な治療法になりうるかを免疫染色、行動解析を用いて評価した。

4. 研究成果

発達期マウスへのミダゾラム暴露は、クロマチン状態の継続的な変化とEgr1を代表とする細胞休止状態関連遺伝子の長期的な発現を上昇させることで、神経幹細胞を強制的かつ長期的な休止状態に誘導することが明らかとなった[Proc Natl Acad Sci U S A 2021] (図4)。この神経幹細胞の継続的な休止により、発達期から成体期にかけて新生されるニューロンが減少し、成体期以降の学習・記憶障害が引き起こされることが分かった。これにより、長年にわたり不明とされていた発達期の麻酔薬暴露と成体期以降の学習・記憶障害の分子メカニズムに海馬におけるニューロン新生が関わることを示された。また、この発達期ミダゾラム暴露による神経幹細胞の強制的な休止状態は、発達期以降に自発的運動(ランニング)を行うことで、休止した神経幹細胞が活性化し、ニューロン新生を亢進させることで、低下した学習・記憶機能を改善することを発見しており、発達期麻酔薬暴露による認知機能低下のメカニズム解明およびその治療法の開発がさらに推進できるものと思われる。

本研究成果は、2021年9月13日(水)午後3時(米国東部標準時間)に国際学術雑誌『Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America』に掲載された。

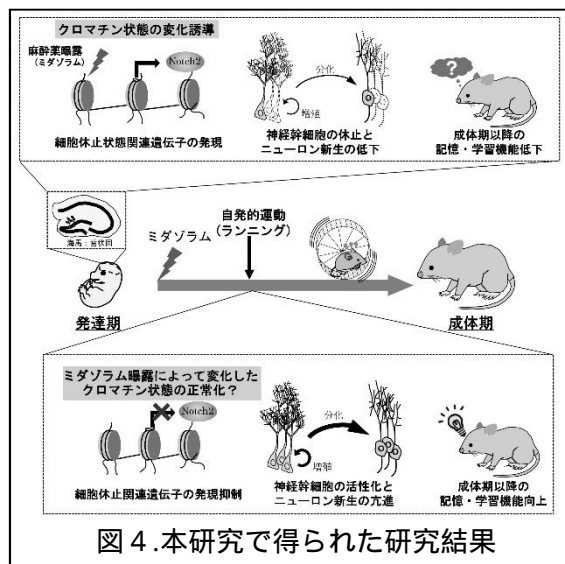


図4.本研究で得られた研究結果

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 1件）

1. 著者名 Doi Hiroyoshi, Matsuda Taito, Sakai Atsuhiko, Matsubara Shuzo, Hoka Sumio, Yamaura Ken, Nakashima Kinichi	4. 巻 118
2. 論文標題 Early-life midazolam exposure persistently changes chromatin accessibility to impair adult hippocampal neurogenesis and cognition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2107596118	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土井 浩義、松田 泰斗、中島 孝輔、中島 欽一、山浦 健
2. 発表標題 幼若期ミダゾラム曝露による神経幹細胞のクロマチン構造変化
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第69回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyoshi Doi, Taito Matsuda, Ken Yamaura, , Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Midazolam anesthesia modifies chromatin landscape to promote neural stem cell dormancy
3. 学会等名 NEURO 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石井 健	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 133
3. 書名 実験医学2022年3月号	

〔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
---------	---------