

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791703
 研究課題名（和文）全身麻酔薬が脳内エリスロポエチン誘導におよぼす影響の分子生物学的解析
 研究課題名（英文）Molecular biological analysis about the effect of general anesthetics on the induction of erythropoietin in the brain
 研究代表者
 田中 具治 (TOMO HARU TANAKA)
 京都大学医学(系)研究科(研究院) 助教
 研究者番号：10402893

研究成果の概要（和文）：エリスロポエチンの脳における主たる産生源は、アストロサイトであると考えられているが、これまで、全身麻酔薬のアストロサイトに対する作用については、まだ十分研究がなされていない。全身麻酔薬が共通してアストロサイトに作用することにより低酸素下での脳内エリスロポエチン誘導を抑制することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Erythropoietin is endogenously expressed in the central nervous system (CNS). EPO in the CNS, mainly produced in astrocytes. We investigated the effect of general anesthetics on EPO expression in the mouse brain and primary cultured astrocytes. We found the common inhibitory effect of the general anesthetics against hypoxia-induced EPO upregulation in the mouse brain through a direct effect on astrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3300000	990000	4290000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：若手研究(B)

キーワード：麻酔学、脳内エリスロポエチン、低酸素

1. 研究開始当初の背景

エリスロポエチンは、約20年前にはじめて、脳における発現が報告され、以降の研究により、アストロサイト、ニューロン、血管内皮細胞に発現し、なかでもアストロサイトによるものが大半をしめることや、低酸素や虚血によって誘導され、中枢神経の保護作用を有すること、また中枢神経の発生に重要であることなどが、明らかになってきている。このエリスロポエチン誘導については、低酸素誘導性因子 hypoxia-inducible factor(HIF)によって主として調節をうけているものと考えられている。HIFは、エリスロポエチンのみならず、ブドウ糖代謝、細胞増殖、血管新生などの多岐にわたる生理的現象に関わる多

数の遺伝子を誘導することが報告されており、低酸素下で活性化することが知られている転写因子である。

我々のグループでは、以前より HIF に注目し、これまで麻酔薬が HIF に及ぼす影響について報告してきた。その中で、本研究では、種々の全身麻酔薬（イソフルラン、セボフルラン、ハロタン、亜酸化窒素、ケタミン、ペントバルビタール）によってマウス脳でのエリスロポエチン誘導にどのような影響を与えるかを検討した。

この意義としては、エリスロポエチンの主たる産生源は、アストロサイトであると考えられているが、これまで、全身麻酔薬の作用については、もっぱら、ニューロンへの作用の

みが注目され、グリア細胞に対する作用については、グルタミン酸の取り込みが全身麻酔薬により抑制されるという知見はあるものの、まだほとんど研究がすすんでいないのが現状である。全身麻酔薬によるエリスロポエチンおよび HIF 誘導の機序について研究することで、さらに全身麻酔薬の中樞神経に対する作用の新たな一面を明らかにできるのではないかと考えた。

また、近年、全身麻酔薬が神経細胞のアポトーシスを誘導し、脳の正常な発生を抑制するとの報告が動物レベルにて相次いで行われるようになり、胎児や新生児に対する全身麻酔薬の作用が臨床的に注目を集めている。しかし、全身麻酔薬の神経毒性の正確な機序については、不明な点が多く、神経伝達物質の正常な放出が一時的であるにせよ妨げられることで、成長段階である神経回路の発達が抑制されるのであろうと推察されているにすぎない。一方、エリスロポエチンは、脳においてその正常な発生に重要であると考えられており、我々は、全身麻酔薬による脳発達抑制は、エリスロポエチンを介した可能性があると考えている。その場合、麻酔薬間でのエリスロポエチン抑制の程度差を検討することで、より胎児や新生児期に適した麻酔薬を選択することが可能となるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

エリスロポエチンの脳における主たる産生源は、アストロサイトであると考えられているが、これまで、全身麻酔薬のアストロサイトに対する作用については、まだ十分研究がなされていない。また、近年、全身麻酔薬が神経細胞のアポトーシスを誘導し、脳の正常な発生を抑制するとの報告が動物レベルにて相次いで行われるようになり、胎児や新生児に対する全身麻酔薬の作用が臨床的に注目を集めている。しかし、全身麻酔薬の神経毒性の正確な機序については、不明な点が多い。エリスロポエチンは、脳においてその正常な発生に不可欠であると考えられており、全身麻酔薬による脳発達抑制は、エリスロポエチンを介した現象である可能性があると考えている。全身麻酔薬のグリア細胞への作用機序について研究することで、さらに全身麻酔薬の作用の新たな一面を明らかにできるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

6週齢 BALB/c マウスを 10%酸素環境に 3時間暴露した際に、脳における HIF の代表的支配遺伝子である EPO の誘導を検討した。低酸素により脳内の EPO mRNA は強い誘導を受けるが、この誘導はイソフルランを同時投

与することにより濃度依存的に抑制された。この抑制はイソフルランのみではなく、セボフルラン、ハロタンといった吸入麻酔薬でも、またプロポフォール、バルビタール、ケタミン、ミダゾラムといった静脈麻酔薬でも確認された。一方腎臓での低酸素による EPO 誘導は麻酔薬による影響を受けなかった。つづいて脳内の HIF の発現について検討すると、HIF-1 α は通常酸素下でも発現しており、低酸素下でもほとんど変化していない、一方、HIF-2 α は、通常酸素下ではほとんど発現していないが、低酸素環境下では発現が上昇しており、この発現上昇はイソフルランの投与により抑制された。これらの結果は、麻酔薬が低酸素下での脳内 HIF-2 α 発現を抑制し、EPO 誘導を抑制していることを示唆している。脳内の EPO は主としてアストロサイトにより産生されると報告されていることから、麻酔薬はアストロサイトに作用して、低酸素下での HIF-2 α 発現を抑制していると考えられる。実際に初代培養したアストロサイトを各麻酔薬の存在下で低酸素環境に暴露した場合、HIF の誘導が、麻酔薬により抑制されるのが確認された。麻酔薬が共通してアストロサイトにこのように作用するのはどのようなメカニズムによるものかを検討するために、初代培養アストロサイトを用いて酸素消費量が麻酔薬によりどのように影響されるかを検討した。バルビタールでは酸素消費量が抑制されるが、ケタミンでは変化しなかった。この結果は全身麻酔薬に共通して確認されたアストロサイトにおける HIF 誘導抑制が、細胞活動低下に伴う酸素消費量の減少による二次的な影響で一義的に説明することはできないことを示している。これまで麻酔薬のアストロサイトに対する作用については、吸入麻酔薬がグルタミン酸の取り込みを抑制する、という報告はあるが、それ以外については不明な点が多い。我々は、この麻酔薬による HIF 抑制機構をより詳細に検討することで、麻酔薬のアストロサイトへの作用をさらに明らかにできるのではないかと考えて現在も研究をすすめている。

4. 研究成果

6週齢 BALB/c マウスを 10%酸素環境に 3時間暴露した際に、脳における HIF の代表的支

配遺伝子である EPO の誘導を検討した。低酸素により脳内の EPO mRNA は強い誘導を受けるが、この誘導はイソフルランを同時投与することにより濃度依存的に抑制された。この抑制はイソフルランのみではなく、セボフルラン、ハロタンといった吸入麻酔薬でも、またプロポフォール、バルビタール、ケタミン、ミダゾラムといった静脈麻酔薬でも確認された。一方腎臓での低酸素による EPO 誘導は麻酔薬による影響を受けなかった。つづいて脳内の HIF の発現について検討すると、HIF-1 α は通常酸素下でも発現しており、低酸素下でもほとんど変化していない、一方、HIF-2 α は、通常酸素下ではほとんど発現していないが、低酸素環境下では発現が上昇しており、この発現上昇はイソフルランの投与により抑制された。これらの結果は、麻酔薬が低酸素下での脳内 HIF-2 α 発現を抑制し、EPO 誘導を抑制していることを示唆している。脳内の EPO は主としてアストロサイトにより産生されると報告されていることから、麻酔薬はアストロサイトに作用して、低酸素下での HIF-2 α 発現を抑制していると考えられる。実際に初代培養したアストロサイトを各麻酔薬の存在下で低酸素環境に暴露した場合、HIF の誘導が、麻酔薬により抑制されるのが確認された。麻酔薬が共通してアストロサイトにこのように作用するのはどのようなメカニズムによるものであろうか？まず考えられるのは、麻酔薬により細胞の活動性が低下することによって酸素消費量が減少し、その二次的な結果として低酸素の程度が緩和され、結果として HIF の蓄積が抑制されるというものである。この仮説を検証するため、初代培養アストロサイトを用いて酸素消費量が麻酔薬によりどのように影響されるかを検討した。バルビタールでは酸素消費量が抑制されるが、ケタミンでは変化しなかった。この結果は全身麻酔薬に共通して確認されたアストロサイトにおける HIF 誘導抑制が、細胞活動低下に伴う酸素消費量の減少による二次的な影響で一義的に説明することはできないことを示している。これまで麻酔薬のアストロサイトに対する作用については、吸入麻酔薬がグルタミン酸の取り込みを抑制する、という報告はあるが、それ以外については不明な点が多い。我々は、この麻酔薬による HIF 抑制機構をより詳細に検討することで、麻酔薬のアストロサイトへの作用をさらに明らかにできるのではないかと考えて現在も研究をすすめている。

我々が見いだした多数の全身麻酔薬によるエリスロポエチンおよび HIF-2 誘導の抑制は、全身麻酔薬がアストロサイトへの共通した作用を有することを示唆するものである。

全身麻酔薬のグリア細胞に対する作用についてはこれまであまり研究されてこなかったが、本研究においては、低酸素という条件下ではあるが、全身麻酔薬のアストロサイトにおける作用を、エリスロポエチンの抑制という現象を介して明瞭に示すことが可能である点が、本研究の最大の特色である。この現象を精査することにより、麻酔薬の作用の新たな一面を明らかにできる可能性が高い。予備実験からは、麻酔薬が直接的にアストロサイトに作用している可能性が示唆されており、グリア細胞の機能の重要性が近年の研究により明らかになってきていることもあわせて、本研究は、全身麻酔薬の作用の研究においても新たなきっかけを与えるものと考えている。

さらに麻酔薬がアストロサイトに直接作用している場合の機序であるが、多数ある全身麻酔薬の分子標的としては、さまざまなもの（例えば吸入麻酔薬やプロポフォールでは、GABA 受容体を、ケタミンや亜酸化窒素ではグルタミン酸受容体が主たるものと考えられている）が想定されており、これらいくつもの麻酔薬が共通してアストロサイトの HIF-2 やエリスロポエチンを抑制する機序は、想像が付きにくい。しかしながら、麻酔薬が細胞内モーター蛋白の動態を抑制するとの報告がなされており、仮説として、この作用により転写因子の核移行が抑制される可能性がある。今後は、蛍光により標識した HIF-2 蛋白を発現させ、その動態を検討することによって、この仮説を検討したいと考えている。

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 1 件)

Tomoharu Tanaka, Shinichi Kai, Tomohiro Koyama, Hiroki Daijo, Takehiko Adachi, Kazuhiko Fukuda, Kiichi Hirota General Anesthetics Inhibit Erythropoietin Induction under Hypoxic Conditions in the Mouse Brain Plos one 6(12)2011, e29378
査読あり

学会発表] (計 1 件)

田中 具治ほか。“全身麻酔下では、低酸素による脳内エリスロポエチン(EPO)発現誘導が抑制される。”第38回日本集中治療医学会学術集会、横浜

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中具治 (TOMOHARU TANAKA)

研究者番号 : 10402893

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :