

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390366

研究課題名(和文) 視床皮質ニューロンのトランスクリプトーム解析による吸入麻酔薬の作用機序の解明

研究課題名(英文) Determination of the molecular mechanism of volatile anesthetics using transcriptome analysis in thymo-cortico neurons of mice.

研究代表者

山蔭 道明 (Yamakage, Michiaki)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70285005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔薬の分子レベルでの作用機序を検討するため、マウス脳を用いた全mRNAの同時発現解析(トランスクリプトーム解析)を行い、吸入麻酔薬のmRNAへの影響を解析した。また行動学的な解析を追加し、吸入麻酔薬と有害事象の関連について検討した。その結果吸入麻酔薬はRtn4r12遺伝子を特に強く発現させ、また加齢によってLhx9遺伝子の発現が最も増大した。これらの知見は幼若脳への吸入麻酔薬曝露が神経炎症を引き起こし、アポトーシスを誘導するこれまでの知見と矛盾しないものであった。一方で吸入麻酔薬曝露はマウスでは行動学的には変化を起こさず、マウスとヒトでは異なる制御機構が存在するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed a transcriptome-wide association study, a total mRNA analysis, in the mouse brain to try to determine the molecular mechanism of volatile anesthetics. We also examined the behavior of mice to confirm the association between inhalation of volatile anesthetics and undesirable side effects such as nausea, vomiting, and cognitive dysfunction. Exposure to volatile anesthetics caused an increase in the expression level of the Rtn4r12 gene in all mice and an increase in the expression level of the Lhx9 gene in aged mice. These results indicated that inhalation of volatile anesthetics causes neuroinflammation and induces apoptosis in juvenile mice. However, we did not find undesirable side effects of exposure to the volatile anesthetics in any of the mice. The results suggest that the mechanism by which exposure to volatile anesthetics causes nausea or cognitive dysfunction in mice is different from that in humans.

研究分野：麻酔科学

キーワード：トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬の作用機序は分子レベルで近年明らかになりつつある。吸入麻酔薬は細胞膜の多くのイオンチャンネルに結合し、ニューロンの細胞内環境を修飾する。その結果大脳皮質と視床および脳幹に存在する複数の神経核における神経伝達に変化が起きることが報告されている。中でも視床-大脳皮質における神経ネットワークが吸入麻酔薬によって遮断されることが吸入麻酔薬の主な作用機序ではないかと推測されている。そこでわれわれは吸入麻酔薬の曝露による視床-大脳皮質ニューロンのトランスクリプトーム解析(全 RNA の発現プロファイル解析)を行うことで吸入麻酔薬の RNA レベルでの作用機序を解明することができると考えた。

2. 研究の目的

麻酔薬の作用機序の解明は、より安全な麻酔薬の開発や、有害事象を減少させるために有用であると考えられる。われわれは本研究においてマウス視床-大脳皮質ニューロンのトランスクリプトーム解析を通じて吸入麻酔薬の作用機序を RNA レベルで解明し、吸入麻酔薬によって生じうる有害事象として頻度の高い悪心嘔吐や、認知機能障害の可能性について探索する。計画した研究内容は以下の通りである。

- 1) マウス脳神経核におけるトランスクリプトーム解析
- 2) マウスの行動学的解析を用いた術後有害事象の検証

3. 研究の方法

- 1) マウス脳神経核におけるトランスクリプトーム解析。

はじめにマウス脳内での遺伝子発現を測定するため、Naive(週齢 8 および 35 の 2 群)群および吸入麻酔薬曝露群(Vehicle 群, 週齢 8 および 35 の 2 群)の計 4 群を設定した。

Naive 群は処置を行わず、Vehicle 群は 100% 酸素投与下に 3.5%セボフルランを 1 時間吸入させた。いずれの群も断頭直前にはセボフルラン 3.5%吸入させ、入眠を確認した後に断頭した。視床・大脳皮質・海馬よりそれぞれ MMI Cell Cut Plus (Molecular Macnies & Industries, Eching, Germany)を用いてニューロンを単離し、RNeasy® Plus Micro kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて RNA を抽出した。Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)により RNA の質を検定した。得られた RNA から TruSeq® RNA library Preparation kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)によりライブラリを作製し、Illumina HiSeq 2500 プラットフォーム(Illumina Inc.,)により RNA-seq を行なった(paired-end, 101 cycles x 2)。

Illumina HiSeq 2500 より出力される FASTQ ファイルは TCC パッケージおよび BioConductor パッケージを含む R(ver 3.1.1)を用いて解析した。マウスゲノムマップは UCSC の公開データ (NCBI37/mm9, <http://genomes.UCSC.edu/>)を参照してマッピングした。発現変動が 1.5 倍以下の遺伝子はフィルターし、False Discovery Rate は 0.05 とした。

- 2) 雌マウスにおける吸入麻酔薬によるパイク行動の解析。

雌マウス(各群 n=8)について以下の 2 群を設定した。Naive 群、Vehicle 群: 100%酸素および 3.5%セボフルランを 1 時間吸入した。いずれも週齢 8 週齢を用いた。無味であるカオリンペレットと通常ペレットを自由に摂取できるように配置し、処置後 24 時間でのカオリンペレットの摂取量を測定した。

4. 研究成果

視床・大脳皮質において mRNA の抽出を行った結果、発現している mRNA の再現性が

得られず、特に視床・大脳皮質は近接した部位であっても発現している遺伝子プロファイルが大きく異なる可能性が示唆された。海馬については歯状回を含む部位で抽出する際には再現性の高い遺伝子発現プロファイルが得られたため、以下の研究結果は海馬の特に歯状回における遺伝子発現プロファイルを示している。

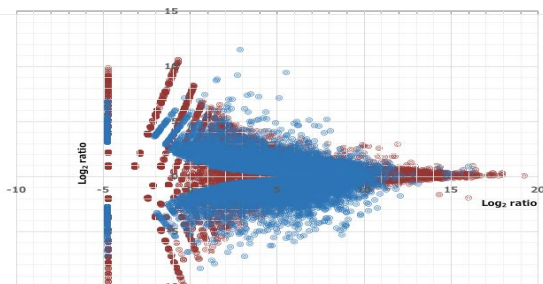


図1 研究1のMicro Array Plotting

研究1における平均読み取り塩基数は41,778,220塩基であり、Phred Quality Scoreは36.8であった。解析したmRNAは37,681遺伝子であった。発現の変動について吸入麻酔薬の曝露によって変動した遺伝子数は5,459遺伝子で、週齢に違いによる変動遺伝子数は11,925遺伝子であった(図1)。

また吸入麻酔薬曝露によって遺伝子発現が増大する遺伝子を以下に示す(表1)。

(表1 発現が増大した遺伝子上位10遺伝子)

Gene ID	Gene Name	log ₂ ratio
Rtn4rl2	Reticulon 4 receptor-like 2	7.80
Mas1	MAS1 oncogene	7.76
Gpx6	Glutathione peroxidase 6	7.62
Ovol2	Ovo-like 2 (Drosophila)	7.19
Calcr	Calcitonin receptor	6.81
Impg1	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1	6.72
Neurod6	Neurogenic	6.33

	differentiation 6	
Neurod2	Neurogenic differentiation 2	6.30
Dio3	Deiodinase, iodothyronine type III	5.91
Cd6	CD6 antigen	5.80

加齢により発現が増大する遺伝子を以下に示す(表2)。

(表2 加齢により発現が増大する遺伝子上位10遺伝子)

Gene ID	Gene Name	log ₂ ratio
Lhx9	LIM homeobox protein 9	9.21
Pouf4f1	POU domain, class 4, transcription factor 1	8.72
Htr5b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	7.48
Cbln3	Cerebellin 3 precursor protein	7.33
Gpr151	G protein-coupled receptor 151	7.08
Irx3	Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)	6.84
Umodl1	Uromodulin-like 1	6.72
Slc5a1	Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	6.71
Irx2	Iroquois related homeobox 2 (Drosophila)	6.48
Iyd	Iodotyrosine deiodinase	6.41

Rtn4rl2 遺伝子はミエリンに多く発現し神経伝達速度に関与するとされ、吸入麻酔薬の作用により神経伝達が阻害され、結果としてRtn4rl2 遺伝子の発現が増大している可能性が考えられる。また Lhx9 遺伝子は神経幹細胞

胞からドーパミン作動性ニューロンへの分化を誘導するとされ、加齢によって発現が増大することから、Lhx9 遺伝子を通じた中枢神経系の防御機構が成熟した脳で起こっている可能性が示唆された。これらの知見は新規であるが、幼若脳においてのみ吸入麻酔薬曝露に伴う神経炎症およびアポトーシスの増大を示唆するこれまでの知見と矛盾しないものである。

研究2では術後悪心嘔吐の原因を検索するため吸入麻酔薬曝露後の異食行動(パイカ行動)を観察したが、吸入麻酔薬曝露単独ではパイカ行動は誘発されなかった。マウスでは元々嘔吐は行動して現れないことから、ヒトとは異なる制御機構が存在する可能性が示唆されたが、詳細は本研究では明らかにできなかった。

よってわれわれの研究成果をまとめると、

- 1) 吸入麻酔薬曝露によって、Rtn4rl2 遺伝子が増大し、吸入麻酔薬はニューロンの作用そのものを変容させるのみならず、神経伝達に影響を与えている可能性が示唆された。
- 2) マウスでは吸入麻酔薬曝露だけでは嘔吐行動は起こらず、ヒトとは異なる制御機構が存在するものと考えられる。

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 28 件)

1. Hayase T, Tachibana S, Yamakage M. Effect of sevoflurane anesthesia on the comprehensive mRNA expression profile of the mouse hippocampus. Med Gas Res. 2016; 6(1): (in press, peer-reviewed)
2. Takahashi K, Niiya T, Takada Y, Narimatsu E, Yamakage M. Severity of Myasthenia Gravis Influences the

Relationship between Train-of-four Ratio and Twitch Tension and Run-down of Rat Endplate Potentials. Anesthesiology. 2016; 124(2): 369-77. (peer-reviewed)

3. Hayase T, Sugino S, Moriya H, Yamakage M. TACR1 gene polymorphism and sex differences in postoperative nausea and vomiting. Anaesthesia. 2015; 70(10): 1148-59. (peer-reviewed)

4. Tachibana S, Hayase T, Osuda M, Kazuma S, Yamakage M. Recovery of postoperative cognitive function in elderly patients after a long duration of desflurane anesthesia: a pilot study. J Anesth. 2015; 29(4): 627-30. (peer-reviewed)

5. Chaki T, Sugino S, Janicki PK, Ishioka Y, Hatakeyama Y, Hayase T, Kaneuchi-Yamashita M, Kohri N, Yamakage M. Efficacy and Safety of a Lidocaine and Ropivacaine Mixture for Scalp Nerve Block and Local Infiltration Anesthesia in Patients Undergoing Awake Craniotomy. J Neurosurg Anesthesiol. 2016 ; 28(1): 1-5. (peer-reviewed)

ほか 23 件

[学会発表](計 82 件)

1. Tachibana S, Hayase T, Yamakage M. Possible Mechanism of Neuroinflammation Induced by Surgical Procedure in the Mouse Hippocampus Determined by Using Transcriptome Analysis. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市
2. Hayase T, Tachibana S, Yamakage M. Prediction of the Molecular Mechanism of Postoperative Nausea and Vomiting Using Transcriptome Analysis. The Annual Meeting of American Society of

Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日～28 日、米国 San Diego 市

3. Takada Y, Narimatsu E, Takahashi K, Niiya T, Yamakage M. Elevation and Suppression of Paraoxon-induced Epileptic Activity in the Rat Hippocampus. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日～28 日、米国 San Diego 市

4. Kazuma S, Tokinaga Y, Takada Y, Hayashi S, Azumaguchi R, Kimizuka M, Yamakage M. Both Desflurane and Sevoflurane Inhibit Endothelium-dependent Vasodilation By Different Mechanisms. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日～28 日、米国 San Diego 市

5. Kumita S, Tachibana S, Hayase T, Yamakage M. Usefulness of Self-made Genetic Testing in Malignant Hyperthermia Patients. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日～28 日、米国 San Diego 市
他 77 件

〔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

山蔭 道明 (YAMAKAGE MICHIAKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70285005

(2)研究分担者

早瀬 知 (HAYASE TOMO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20579007

(3)連携研究者

()

研究者番号：