

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462414

研究課題名(和文) プロポフォール依存(中毒)に脳内報酬系のmiRNAが及ぼす影響

研究課題名(英文) The effect of miRNA in brain reward system on propofol dependence

## 研究代表者

藤井 啓介 (FUJII, KEISUKE)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20618780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロポフォールは脳内報酬系を介して依存を形成する可能性を有するが、その詳細な機序は不明である。本研究はげっ歯類におけるプロポフォール依存モデルを作成し、依存形成機序における脳内報酬系のドーパミンの関与およびmiRNAの誘導を検証する予定であった。行動実験におけるマウスでのプロポフォール依存モデルの作成に成功したが、脳内報酬系の側坐核や線条体等におけるドーパミンの増加およびmiRNAの誘導は確認できなかった。以上より本研究によりプロポフォール依存マウスの作成には成功したが機序の解明には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Although propofol has a possibility to induce dependence mediated by brain reward system, the precise mechanism of propofol dependence is unclear. The aim of this study was making a model of propofol dependence in rodent, clarifying the role of dopamine of brain reward systems in propofol dependent model, and validating the increase of some type of miRNA in brain reward system. We had indeed succeeded to induce propofol dependence in mice behavior test, but dopamine and miRNAs (miR-212) in brain reward system including nucleus accumbens or dorsal striatum were not increased. Propofol has a possibility to induce dependence but its mechanism was not clarified.

研究分野：麻酔科学

キーワード：プロポフォール 依存 miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

プロポフォルが依存を形成する可能性を有することや医療関係者においてプロポフォル依存が生じうることは、これまで数多く報告されている (Clin Toxicol (Phila). 2010; 48:165-70. Anesth Analg. 2007; 105:1066-71. )。また動物モデルでも、プロポフォルが報酬系側坐核 (nucleus accumbens; NAcc) のドパミンを上昇させることから、プロポフォルは報酬系を介して依存を形成することが推測されているが、その詳細な機序については不明である。

一般に依存を形成する薬物は、報酬系に作用することが知られている。報酬系とは、中脳腹側被蓋野から視床下部や側坐核を含む間脳、前頭前野、前帯状回に投射するドパミン神経系である。コカインはNAccを含む腹側線条体のドパミントランスポーターを阻害することにより細胞外ドパミン濃度を上昇させ、cAMP 応答配列結合タンパク (cAMP response element-binding protein; CREB) を活性化する。さらに CREB の活性化には、miRNA の誘導が関与している。薬物依存では miR-212 などの miRNA が up-regulation することにより薬物摂取を促進しているとされる。しかしこれらの機序に対する、プロポフォルの影響については明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

プロポフォルは脳内報酬系に作用し、依存を形成する薬物である。薬物中毒では、報酬系における miRNA の up-regulation あるいは down-regulation が認められることが知られているが、プロポフォルの依存における miRNA の役割については明らかにされていない。本研究は、げっ歯類においてプロポフォル依存モデルを作成し、脳内報酬系におけるドパミン濃度の上昇を確認し、報酬系、特に背側および腹側線条体において、いずれの miRNA の発現量が変化しているのかを同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned Place Preference test: CPP test)

白黒2コンパートメントボックス (図1) を使用しプロポフォルの条件付け開始前に20分間の滞在時間を測定 (pre-test) した後、嗜好性を示すボックスを選定し非嗜好性側を薬物処置ボックス、嗜好性側を溶媒処置ボックスとして決定する。次に条件付けとして、プロポフォルあるいは同容量の10%脂肪乳剤 (イントラリピッド®) をマウスの腹腔内に投与したのち、それぞれ

薬物処置ボックスおよび溶媒処置ボックスに30分間閉じ込める。これを5日間繰り返したのち、6日目に薬物投与せずに行き来可能な仕切りを設置した白・黒ボックスにマウスを入れる。各ボックスの滞在時間を測定し、条件付け前後での薬物処置ボックスへの滞在時間の変化を検証する。条件付けとして使用するプロポフォル濃度は、10、20、40mg/kg とする。

▶ The Conditioned Place Preference Procedure

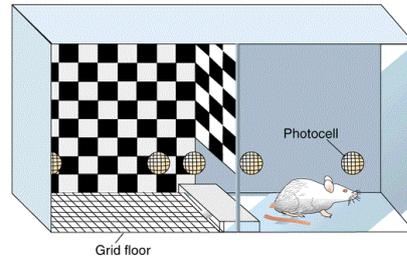


図1 行き来可能な状態の白・黒ボックス

### 2) マイクロダイアリシス法を用いたプロポフォル依存マウスの脳内報酬系におけるドパミンの変化

ペントバルビタール麻酔下に脳定位固定装置を用いて、マウス脳側坐核にガイドカニューラを植え込んだのち、CPP test 同様の薬剂量および投与方法でプロポフォル依存マウスおよび非依存マウスを作成する。ガイドカニューラに透析プローブを挿入し、マイクロダイアリシスポンプを用いて人工脳脊髄液 (147.2mM NaCl, 4.0mM KCl, 2.2mM CaCl<sub>2</sub>, pH6.4, 扶桑薬品工業, 大阪) を灌流する。サンプルはプロポフォル投与20分前から20分おきに回収し、直ちに微量生体試料分析システム (HTEC-500, エイコム, 京都) に連続自動インジェクションし定量する。分析結果はデータ処理装置 (EPC-500, エイコム, 京都) により自動的に記録される。以上によりプロポフォル依存マウスおよび非依存マウスにおけるプロポフォル投与前後での側坐核のドパミン濃度の変化を測定する。

### 3) miRNA の分離精製および定量

上記同様に作成したプロポフォル依存マウスおよび非依存マウスから、側坐核、腹側被蓋野、および背側線条体を摘出し、TriPure Isolation Reagent (ロシュダイアグノスティックス, 東京) と共にホモジナイズ (MagNA Lyser Instrument, ロシュダイアグノスティックス, 東京) し、遠沈する。得られた上清から細胞ライゼートを取り、High Pure miRNA Isolation Kit (ロシュダイアグノスティックス, 東京) の2カラムプロトコールを用いて、miRNA を抽出する。miRNA の定量に cDNA を合成するために TaqMan® MicroRNA Assays を使用して

cDNAを合成し、Real-time PCR解析を行う。対象とするmiRNAは、コカイン慢性暴露で変化することが知られているmiR-124a、let-7d、miR-181a、miR-375、miR-182、miR-382、miR-1、miR-31、miR2-9b、miR-344c、miR-3106およびmiR-212の12種類とした。プロポフォール依存および非依存マウスにおけるmiRNAの発現レベルの違いを同定する。

#### 4. 研究成果

1) CPP testにおいて、プロポフォール0、20、40 mg/kgでは、非嗜好性ボックスへの滞在時間は延長しなかった ( $P = 0.051$ ,  $0.077$ ,  $0.35$ )

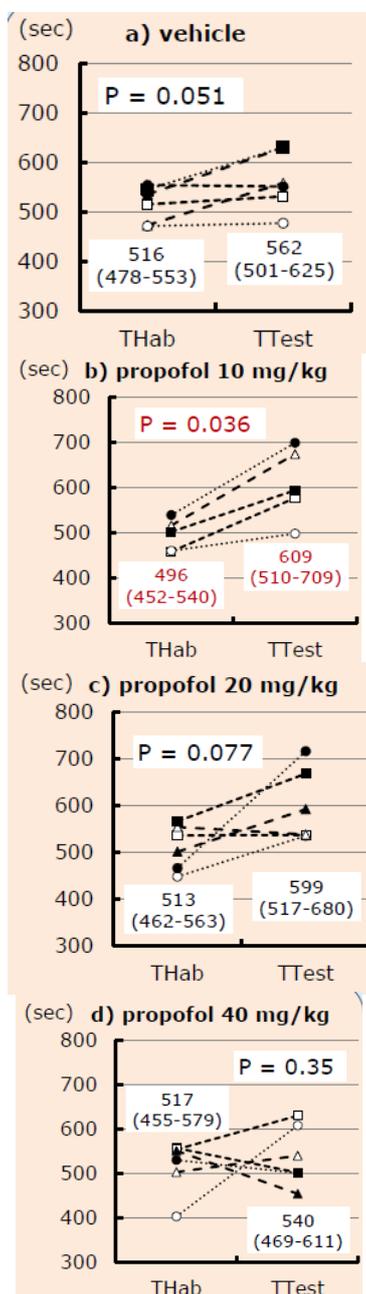


図2 条件付け前 (THab) 後 (TTest) での非嗜好性ボックスへの滞在時間の比較

しかしプロポフォール10 mg/kgによる条件付けでは、非嗜好性ボックスへの滞在時間が有意に延長した (図2)。

プロポフォール20、40 mg/kgでは麻酔状態となってしまうため、場所嗜好性によって示される依存が不明瞭となってしまう可能性を考慮し、プロポフォール2.5、5 mg/kgによるCPP testを行ったが、いずれにおいても非嗜好性ボックスへの滞在時間の延長は認められず、濃度依存性は示されなかった。つまりプロポフォールに対する依存形成は10 mg/kgでのみ確認された。

2) プロポフォール依存および非依存マウスに対し、プロポフォール10 mg/kg投与20分前から100分後まで持続的に側坐核のドパミン濃度を測定した (図3)。

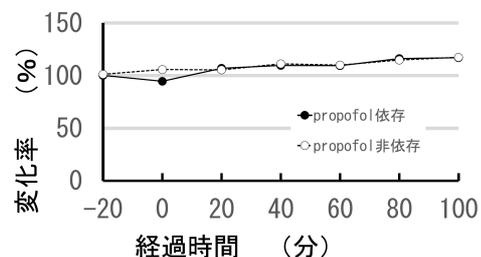


図3 プロポフォール投与前後のプロポフォール依存非依存マウス側坐核におけるドパミン濃度の変化

しかし、プロポフォール投与前後でのドパミン濃度の変化は明らかでなく、さらにプロポフォール依存マウスと非依存マウスでの違いも明らかでなかった。

そこで、プロポフォール依存及び非依存マウスで、脳内報酬系の背側線条体、腹側被蓋野、さらには前頭前野におけるドパミン、ノルアドレナリン、およびセロトニン濃度の変化を確認したが、いずれもプロポフォール投与前後での違いあるいは依存非依存での違いが明らかでなかった。

3) マイクロダイアリス法による脳内報酬系におけるドパミン濃度の変化が明らかでなかったため、miRNAの発現量の定量を行う部位が特定できなかった。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

1. 藤井啓介、吉田朱里、谷奥匡、平山三智子、伊良波浩、水本一弘、低用量プロポフォールは依存を形成する、日本麻酔科学会第61回学術集会、横浜市、2014/5/15

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 啓介 (FUJII, Keisuke)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究

員

研究者番号 : 20618780