

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462415

研究課題名(和文)脳内神経ネットワークからみた吸入麻酔薬の作用機序と発達脳に与える影響に関する研究

研究課題名(英文)Study on the mechanism of the volatile anesthetics and the influence on the developing brain in the neural network.

研究代表者

西村 欣也(NISHIMURA, Kinya)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80164581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、発達脳に対する麻酔薬の影響が懸念され、その関心が高まっている。私たちは電気生理学的仕法、および生化学的仕法を用いて、発達過程にあるマウス線条体での麻酔薬の影響を観察した。ここでは線条体にあるコリナージック細胞の過分極活性化陽イオン電流(Ih電流)の変化を元に観察した。日齢7～28日のマウス線条体では日齢増加に伴い神経細胞膜の変化に伴い、Ih電流値の絶対値増加を認めた。そして、吸入麻酔薬であるセボフルランの添加により濃度依存性にIh電流の抑制が観察された。さらにIh電流が関与する条件下では細胞の持つ発火頻度を変化させることが見られた。

研究成果の概要(英文)：The use of volatile anesthetics is an exceedingly common practice. However, over the decade, volatile anesthetics induced neurotoxicity in pediatric populations has gained a certain notoriety based on animal studies demonstrating that these anesthetics may in neurotoxicity including neuro-apoptosis and long-term neurocognitive. And, volatile anesthetics have been reported to inhibit the hyperpolarization-activated cation current (Ih) that contributes to generation of synchronized oscillatory neural rhythms. The developmental change of Ih has been speculated to play a pivotal role during maturation. We examined the effect of volatile anesthetic sevoflurane on Ih in striatum. Our analyses showed that the change in Ih of cholinergic interneurons occurred in conjunction it with maturation. The sevoflurane-induced inhibition of Ih in striatal cholinergic interneurons may lead to alternations of the acetylcholine-dopamine balance in the neural circuits during the early postnatal period.

研究分野：麻酔科学

キーワード：吸入麻酔薬 セボフルラン 線条体 コリナージック細胞 発達脳

## 1. 研究開始当初の背景

吸入麻酔薬は今日まで広く全身麻酔に使用されてきたが、昨今、『麻酔・沈静は脳に対して安全！？』という極めて基本的な問題に対して疑問詞がつけられている。高齢者における全身麻酔後の認知機能障害をはじめ、小児期の麻酔曝露が脳の発達に影響を与え、学習能力低下や行動異常を引き起こす可能性が示唆されたため、今や公衆衛生学的にも看過出来ない問題として関心が高まっている。本研究計画では神経ネットワーク解析を主軸として、遺伝子工学的研究仕法に加え、細胞内シグナル伝達物質の定量化という生化学的仕法と、Whole-cell Patch-clamp 法を中心とした電気生理学的仕法を導入し、発達期および老化モデルマウスの脳に対して、吸入麻酔薬曝露が神経伝達物質放出機構に与える影響について検討した。1990年代より NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) 受容体遮断薬と GABA (gamma-aminobutyric acid) 受容体作動薬がシナプス形成期の脳に対してアポトーシスを伴う神経変性を来し、その後の学習能力低下や行動異常を引き起こすという研究結果が数多く報告されている。これは麻酔科領域のみならず、子をもつ両親にとっても極めて重大な問題であり、今や国家レベルの公衆衛生学的コホート調査を用いて比較検討が行われるに至った。その上で脳神経細胞障害に全身麻酔という医療行為のみかどうかに統一見解はないものの、いずれにしても全身麻酔薬が与える影響は無視できないものとなっている。そして未だ作用機序が解明されていない吸入麻酔薬であるが、このほど私たちの研究室はこの吸入麻酔薬は大脳皮質・線条体を中心とした大脳皮質基底核 視床ループにおける情報伝達回路に“乱れと興奮”が生じることが報告した。そこでこの“乱れと興奮”の解析をもとに、新生児期の吸入麻酔薬曝露が脳内神経ネットワーク活動に与える影響を評価することを目的とした。

元来、学習や記憶はシナプスにおける電気信号の伝達効率の変化することにより成立している。このシナプス電動効率は伝達物質の放出効率とシナプス後細胞の受容体を介する応答効率によって決定され、いずれのメカニズムにも多種多様の膜タンパク質と細胞内シグナル分子が関与している。ここで分子生物学と電気生理学の仕法を組み合わせることによって、発達期の脳への麻酔薬が伝達物質の脳内放出効率調節機構に与える影響をより明らかにした。近年の基礎医学における分子生物学・生理学の技術的進歩により、吸入麻酔薬の作用機序の解析が進められ、その分子標的がかなり明らかにされて来ており、脳内抑制シナプス伝達を担っている GABA 受容体やグリシン受容体などの受容体チャネルの活性増強や興奮性シナプス電圧の抑制、さらには静止膜電位の形成に与えるリーク型カリウムチャネルの活性化等が報告

されている。元来、シナプス伝達は静的なものではなく、むしろさまざまな因子や操作により正の方向にも負の方向にも調節できる一連の高度かつダイナミックな過程を含んでいる。ここではシナプスにおいて入力線維の短い反復刺激がグルタミン酸作動性シナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation; LTP) を引き起こすことが観察されており、LTP が学習および記憶に関与すると考えられている。

このように脳神経系では多数の神経細胞がネットワークを形成しており、我々麻酔科医が日常的に使用している吸入麻酔薬もこの神経ネットワーク活動に影響を与える可能性が高い。幼児期の吸入麻酔薬曝露が学習障害や行動異常を誘発する可能性が指摘され、その作用機序の中心に大脳皮質および海馬が取りあげられている。その上で近年、加齢に伴う脳機能障害に髄液クリアランスの低下が関与している可能性が示唆されており、これにより脳におけるベータアミロイドなどの有害物質排泄が障害され、認知機能障害の一因になりうると考えられている。この髄液クリアランス低下には、加齢によるアストロサイトの LRG1 発現の増加が関与している可能性があり、吸入麻酔薬が老化モデルマウスの脳において電気生理学的にどのような影響を与え、また髄液クリアランスについても変化をもたらすかを検討することは意義深いと考えた。元来、LRG1 過剰発現トランスジェニックマウスは重度の運動失調を呈し、形態学的には海馬及び小脳の形成異常を認める。このことは LRG1 が脳の老化のみならず、脳の発達にも重要な役割を演じている可能性を示している。加えて、近年多くの脳機能分子が明らかにされつつあるが、麻酔科学研究の中心的課題である麻酔薬の神経回路内伝達制御原理は解明に至っていない。吸入麻酔薬は海馬の錐体細胞のみならず、発火パターンにおいて大脳皮質の神経細胞にも変化をもたらす。この変化が可逆性であることを考慮し、吸入麻酔薬曝露による影響の結果と捉えている。特に基底核の medium spiny neuron (MS ニューロン) における変化が著明であることから、GABA ニューロンの関与が強く示唆される。基底核線条体には2種類の GABA 抑制性インターニューロンが知られており、ひとつは Ca バインディングプロテインのひとつである parvalbumin を含有し、非常に早く減衰のないスパイク発射と深い後過分極を示す fast spiking cell (FS 細胞) と、somatostatin をもつ low threshold spike cell (LTS 細胞) である。これらの細胞は gap junction で電気的に結合しており、相互に抑制性の情報伝達を行っているが、吸入麻酔薬がこの gap junction 阻害による GABA 抑制性インターニューロンのネットワーク活動阻害に関与する可能性が示唆される。大脳皮質での gap junction の阻害は未だ証明されていないため、本研究での結

果は注目に値する。また、この発火パターンの発現、および変化には線条体での膜抵抗の変化から、内向き整流型Kチャンネルに作用することが示唆される。さらに電気生理学的手法を用い、日齢に伴う発達過程への吸入麻酔薬：sevofluraneの影響を線条体 cholinergic interneuron の過分極活性化型陽イオン電流 (Ih) の変化により分析を行った。吸入麻酔薬の曝露により、新生児期の麻酔曝露による学習・行動障害発現のみならず術後特異的にみられる高次脳機能障害（集中力の低下、記憶力低下等）の発現が、社会的に問題視されている。特に海馬をその病因とするてんかん症例や線条体を病因とするパーキンソン病ではその発現頻度が高いことを考えると、今回の研究がその発現メカニズム解析に寄与することが考えられる。吸入麻酔薬による発火パターンの変化を元に、海馬や線条体における gap junction への影響や Paired-pulse facilitation (2発刺激増強) の観察、さらに吸入麻酔薬曝露後の細胞内シグナル定量解析および G タンパク質の伝達物質放出調節の実験を組み合わせる。このように吸入麻酔薬は世界各国の病院施設で広く使われ、その安全性はほぼ確立されてはいるものの、発達期の脳への影響、およびそれに派生する学習障害・行動異常など術後高次脳機能障害に関して解明されるべき点が多い。本研究の結果は、発達期や老年期における術後高次脳機能障害発現機序の解明に寄与したものと考える。

## 2. 研究の目的

脳内神経ネットワーク解析を目的とし、吸入麻酔薬を曝露した発達期および老化モデルマウスの脳を用いて、脳スライス標本での集合電位記録や Patch-clamp 法による Whole-cell 記録を組み合わせることで、シナプス伝達制御機構を解析する。併せて免疫プロットにより脳内の細胞内シグナル定量解析を行う。このように遺伝子工学、電気生理学および生化学的仕法を併用し、吸入麻酔薬が脳内神経ネットワーク回路に及ぼす影響を解析し、発達期の脳および老化モデルの脳への影響とその関連性を解析することを目標とする。また、線条体 cholinergic interneuron の過分極活性化型陽イオン電流 (Ih) は生体において様々な役割を担い、心臓組織や中枢・末梢神経で確認され、不整脈やてんかん、神経障害性疼痛との関連も指摘されており、近年注目を集めている。本研究においてはマウス線条体 cholinergic interneuron における Ih を検出し、その日齢による絶対値の変化や sevoflurane 投与によりどのような変化をきたすかを観察する。

## 3. 研究の方法

(1) 発達期のマウスおよび老化モデルマウスに対する LTP の経時的変化と吸入麻酔薬の影響：各マウスにおける脳海馬スライスを作成し、主として海馬 CA1-CA3 シーファー側枝からの LTP を含め、集合電位法で吸入麻酔薬

投与後の変化を検証する。トランスジェニックマウスの海馬において 8 週, 24 週, 48 週等での経時的変化を観察する。また同時に、髄液電気泳動を用いて髄液クリアランスの定量比較を行う。

(2) Tonic GABA 電流と GABA 受容体に与える吸入麻酔薬の影響：神経細胞間の情報伝達はシナプスを介するネットワークが主要な機能構造であると考えられていたが、シナプス領域外に存在する受容体の機能と特性が明らかとなり、この領域外受容体が脳機能調節に重要な役割を担うことが理解されてきた。なかでもシナプス領域外 GABA 受容体は GABA に対する高い親和性と緩慢な脱感作特性を有し、持続的な電流 (Tonic current) を提供している。エーテル麻酔下にマウスの脳を取り出し、スライサーにより 250-300  $\mu\text{m}$  の厚さの脳スライスを作製し、Whole cell patch clamp 法を行う。各細胞の電気生理的発火パターンを確認して細胞の同定を行う。その後吸入麻酔薬セボフルランを添付し、Tonic GABA 電流への影響を観察する。脳の成長発達課程における GABA 受容体サブユニットの変化を含め解析を進め、さらに老化モデルマウスを使用して実験を行い、老化現象とこの領域外 GABA 受容体との関連性を検討する。

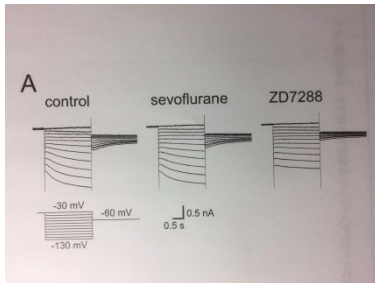
(3) アセチルコリン (ACh) は、7 ニコチン性アセチルコリン受容体 ( $7\text{nAChR}$ ) を介して GABA 作動性介在ニューロンの作用に関して、線状体における Striosome と Matrix での作用様式の違いを検討し、サブユニット 4 2 の役割などを検討することによりコリナージックニューロンを中心とした神経伝達経路の解明を行う。

(4) マウス線条体 cholinergic interneuron における Ih の日齢による絶対値の変化と sevoflurane 投与による影響：日齢 (P)7~35 日のマウス脳スライスを作成し、大脳基底核線条体：cholinergic interneuron から whole-cell patch clamp 法を用いて細胞内電流を測定する。その後電圧は 0mV 固定の上、人工脳脊髄液に灌流し、sevoflurane は灌流液中に添加する。さらに各種拮抗薬を添加し、その変化を観察・分析して検討する。

## 4. 研究成果

(1) 2MAC (MAC; 最小肺泡濃度) の吸入麻酔薬投与によりいずれの日齢 (P7, P14, P21, P28) でも Tonic GABA 電流は増大をみとめ、また GABA transporter blocker の添加でセボフルランの効果が増強されたことから、中因性 GABA に反応して Tonic GABA 電流を増大させていると考えられた。即ち線条体細胞ではセボフルランが Tonic GABA 電流を増大させた。さらにその大きさは生後 7 日 (P7) から 28 日 (P28) までは日齢とともに増加した。また細胞膜容量 ( ) で補正すると、日齢との間に強い相関関係がみられ、この時期の Tonic GABA 電流の増大が、吸入麻酔薬の興奮作用と関連してその後の脳発達に影響を与える可能性が示唆された。

(2) 日齢 7~28 のマウス線条体 Cholinergic interneuron において、日齢増加に伴う神経細胞膜の状態変化と Ih の絶対値増加を認めた。セボフルランは濃度依存性に Ih を抑制し、Ih 活性化抑制による activation curve の偏位を認めたが、日齢間ではセボフルランの効果に差を認めなかった。内向き整流性カリウムチャネル電流 (Kir) は中枢神経系の調律形成に Ih と同様に重要とされるが、Kir 遮断薬であるバリウムを用いた実験結果から、セボフルランの Kir への直接作用は小さく、またセボフルランの Ih に対する作用への Kir の影響は小さいことが示された。更にセボフルランは、感覚応答に重要とされる Cholinergic interneuron の rebound activation を抑制し、cell-attached recordings の解析では、Ih が関与する生理的条件下での発火頻度を変化させることが判明した。セボフルランによる Ih 抑制は、出生後早期の線条体における神経ネットワークに影響を及ぼす可能性がある。



吸入麻酔薬による Ih 電流の変化。阻害薬：ZD728

(3) 線条体 cholinergic interneuron は自発的な発火をみとめ、Ih の他にも、電位依存性カルシウムチャネルおよび ATP 感受性カリウムチャネルによって制御される電流は中枢神経系の pacemaking において重要な役割を担っている。現在は発達期における電位依存性カルシウムチャネルおよび ATP 感受性カリウムチャネルに対する sevoflurane の影響に着目し実験を進めている。

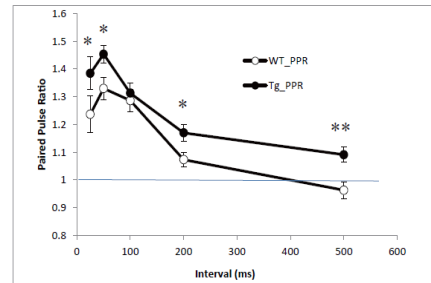
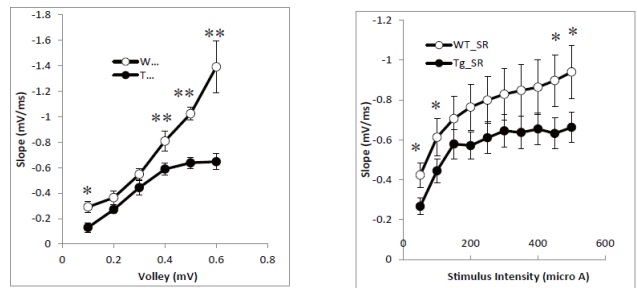
(4) 線状体におけるコリナージックニューロンはテタヌス刺激に応じて acetylcholine を放出し、M1 受容体の活性を介して NMDA 成分を増強し、LTP 誘発に必要とされている。また、可塑性を生ずることも証明され、その活性の重要性が認識されている。また GABA を介した神経伝達でも線状体を大きな役割を呈しているが、今回、striosome より Matrix の方がよりその頻度が高いことを明らかにすることが出来た。

(5) これまで我々は、神経情報の入力と出力が定量的に発現している大脳皮質 基底核の神経回路を対象として、吸入麻酔薬が神経伝達機能に与える影響について検討してきたが、今回、老化に伴いアストロサイト等で発現の増加が認められている leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1) に着目し、Cre-loxP システムを用いたアストロサイトへの特異的 LRG1 遺伝子導入を行なった LRG1 トランスジェニックマウスを老化モデルと

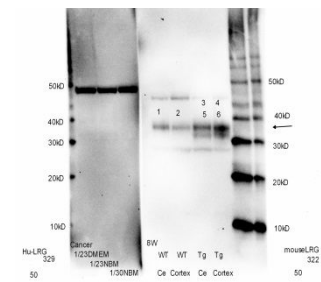
して用い、老化に伴う認知機能障害にあたる吸入麻酔薬の影響を認知・記憶に重要な海馬における電気生理学および組織学的検索を行なったことである。下図 1.2 に示すように、刺激電流の大きさや fEPSP での傾きを低下を、また、Paired Pulse Ratio の上昇などを観察し、LRG1 トランスジェニックマウスの認知機能障害を明らかにすることが出来た。

図：各マウスにおける脳海馬スライスを作成し、海馬 CA1-CA3 シーファー側枝より LTP を含めて集合電位法による検証を行なう。今現在、8 週のトランスジェニックマウス (Tg マウス) に対する海馬で結果を手いるが、さらに 30 週、50 週などの経時変化を観察する。

図 1: 8 週 Tg マウスにおける電気生理学的検証 刺激電流の大きさと fEPSP の傾きのグラフ (左) と fiber volley 活動電位 (中) paired pulse (右)



左脳 = Wild type, 右脳 = トランスジェニック と Western blot 法による LRG 出現



- 1) Cre-loxP システムを用いたアストロサイトへの特異的 LRG1 遺伝子導入を行い LRG1 トランスジェニックマウスを作製した。
- 2) 導入遺伝子の確認と形態学的観察であるが、RT-PCR 法とマウス LRG1 抗体を用いた Western blot 法で脳組織での、LRG1 の発現を確認したところ、脳の萎縮がはっきりと見られる。

## 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 7 件)

1. Inoue R., Suzuki T., Nishimura K., Miura M.: Nicotinic acetylcholine receptor-mediated GABAergic inputs to cholinergic interneurons in the striosomes and the matrix compartments of the mouse striatum. *Nuropharmacology*, 105:318-28. 2016. 査読有
2. Safety of surgery for neonatal congenital diaphragmatic hernia as reflected by arterial blood gas monitoring: thoracoscopic versus open repair. Okazaki T, Okawada M, Koga H, Miyano G, Doi T, Ogasawara Y, Yazaki Y, Nishimura K, Inada E, Lane GJ, Yamataka A. *Pediatr Surg Int*. 2015 Oct;31(10):899-904. 査読有
3. Effects of the volatile anesthetics sevoflurane on tonic GABA currents in the mouse striatum during postnatal development. Ando N, Sugawara Y, Inoue R, Aosaki T, Miura M, Nishimura K. *Eur J Neurosci*. 2014, Oct;40:3147-57. 査読有
4. Comparison of the value of tissue-sealing devices for thoracoscopic pulmonary lobectomy in small children: a first report. Koga H, Suzuki K, Nishimura K, et al. *Pediatr Surg Int*. 2014 Sep;30(9):937-40. 査読有
5. Traction sutures allow endoscopic staples to be used safely during thoracoscopic pulmonary lobectomy in children weighing less than 15 kg. Koga H, Suzuki K, Nishimura K, et al. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2013 Jan;23(1):81-3. 査読有
6. Thoracoscopic plication for diaphragmatic eventration in a neonate. Takahashi T, Okazaki T, Ochi T, Nishimura K, Lane GJ, Inada E, Yamataka A. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;19(3):243-6. 査読有
7. Ando N, Sugawara Y, Inoue R, Aosaki T, Miura M, Nishimura K: Effects of volatile anesthetic sevoflurane on tonic GABA currents in the mouse striatum during postnatal development. *Eur J Neurosci* 40: 3147-3157, 2014, 査読有

[学会発表](計 3 件)

1. 安藤 望, 菅澤佑介, 西村欣也: Tonic GABA抑制と吸入麻酔薬 (教育講演). 日本小児麻酔学会 第20回大会, ロイトン札幌, 北海道札幌市.

2. 三浦正巳, 井上律子, 菅澤佑介, 安藤望, 西村欣也: マウス線条体ニューロンに対する吸入麻酔薬セボフルランの効果. 第92回日本生理学会大会, 神戸コンベンションセンター, 兵庫県神戸市.

3. 福田征孝, 菅澤佑介, 河内山宰, 安藤望, 西村欣也, 林田員和: 川崎病性冠動脈瘤に対する冠動脈瘤縫縮術後に心筋虚血をきたした一例. 日本心臓血管麻酔学会第20回学術大会, アクロス福岡, 福岡県福岡市.

[図書](計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 欣也 (NISHIMURA, Kinya)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 80164581