

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670666

研究課題名(和文) 幼弱脳への麻酔薬の毒性:iPS細胞による毒性評価系の確立及び予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Neurotoxicity of anesthetics in the developing neurons: in vitro model to assess the neurotoxicity in human induced pluripotent stem cell derived neurons.

研究代表者

横田 浩史(MAKITA, Koshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号:20199657

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): 神経細胞に分化誘導されたヒトiPS細胞に対して、これまでに動物実験で幼弱脳に対してアポトーシスを誘導するとされる麻酔薬を作用させ、ヒト神経細胞における麻酔薬の毒性検討モデルを作成し、今後考案される治療法の効果判定系を確立することをめざした。麻酔薬として、ケタミンを使用した結果、ケタミンは100  $\mu$ M程度の濃度で機能を低下させ、ATPの産生量が低下すること、さらに高濃度のケタミンにより、細胞内のROSレベルが上昇し、Caspaseの活性が亢進し、アポトーシスが誘導されることが示された。iPS由来のドパミン作動性ニューロンは、麻酔薬の毒性評価系として、有用な実験系であると考えられた。

研究成果の概要(英文): To study the toxic effect of anesthetic drugs on human neurons, an experimental model using cultured neurons derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) was examined, and the mechanisms of their toxicity were studied. We studied ketamine toxicity in this study, and we established an in vitro model to assess the neurotoxicity in iPSC-derived neurons. The present data indicate that initial mitochondrial dysfunction and autophagy may be resulted from inhibitory effect of ketamine on the mitochondrial electron transport system. Higher ketamine concentration can induce ROS generation and apoptosis in human neurons, and these mechanisms underlie ketamine-induced neural toxicity.

研究分野: 麻酔学

キーワード: iPS細胞由来神経細胞 麻酔薬 毒性評価 ケタミン ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

2003年に Jevtovic-Todorovic らが生後7日齢のラットに臨床使用濃度の麻酔薬(笑気、イソフルラン、ミダゾラム)を6時間使用したところ、脳に広範なアポトーシスが発生し成長後に学習障害が認められたことを報告してから、麻酔薬の持つ神経毒性についての関心が高まってきた。里元らは、新生仔マウスに一般臨床で用いられる麻酔薬(セボフルラン)を通常濃度(3%)で6時間使用して、セボフルランそのものが脳の発達および成長後の学習記憶障害を引き起こすことを世界に先駆けて報告した(Satomoto et al. 2009)。しかし、現在、この領域の研究手法は、動物実験モデルとヒトにおける学習障害の有無に関する臨床研究が主であるが、前者には種差の問題が存在し、後者は時間がかかるうえに麻酔薬以外の介在要因も多く、ヒトにおける発達期中枢神経細胞に対する麻酔薬の影響をより効率的に調べるのできる実験系の開発が望まれてきた。

2006年に山中らによってヒトの皮膚から作成されたiPS細胞は、リプログラミングにより発生初期の多様な分化能を獲得した細胞であり、分化誘導により、神経幹細胞に分化させることができ、脊髄損傷の治療など、再生医療の領域で注目されている。我々はこうしてiPS細胞から作成された神経幹細胞を用いれば、ヒトにおける発達期の脳に対する全身麻酔薬の毒性について細胞培養で調べる実験系を構築できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経幹細胞に分化誘導されたヒトiPS細胞に対して、これまで動物実験で幼弱脳に対してアポトーシスを誘導するとされる麻酔薬を作用させ、アポトーシスの誘導について検討し、ヒト神経幹細胞における麻酔薬の毒性検討モデルを作成し、今後考案される治療法の効果判定系を確立することを目的に計画された。

## 3. 研究の方法

本研究では、麻酔薬として、ケタミンを使用した。

### (1) iPS細胞由来神経幹細胞の培養とドパミン作動性ニューロンへの分化

iPS細胞由来神経幹細胞は、ReproNeuro DA kitとして、リプロセル社から購入したものを使用した。この細胞を融解後、0.01% poly-L-lysine をあらかじめコーティングした96ウェルプレートに播種し、Maturation Mediumを加えて14日間培養したものを実験に用いた。

### (2) 免疫細胞化学法による、iPS細胞由来神経細胞の形質評価

iPS細胞由来神経細胞をラミニンコーティングを行ったガラスボトムプレート( $\mu$ -Slide

8 well)に播種し、4% paraformaldehyde で10分間固定した後、0.1% Triton X-100で1分間処理し、1% BSAで1時間ブロッキング処理を行い、1次抗体を4°Cで一晩反応させる。PBSによる洗浄の後、2次抗体で1時間処理し、DAPIによる核染色を加えて、共焦点顕微鏡(Leica製TCS SP8)での観察を行った。1次抗体には、神経マーカーであるclass III beta-tubulinと、ドパミン作動性ニューロンのマーカーとして、tyrosine hydroxylase (TH)に対する抗体を使用し、2次抗体には、Alexa Fluor 488 Chicken anti-mouse IgG (Invitrogen) または Alexa Fluor 647 anti-rabbit IgG (Invitrogen)を使用した。

### (3) 細胞のケタミンへの曝露

20, 100, 500  $\mu$ Mのケタミンを6時間または24時間培地に加え、ケタミンが及ぼす作用について、以下の方法で評価した。

### (4) Cell viability analysis

ケタミン曝露下で生細胞の数を、ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega社製)を用いて検討した。この方法では、蛍光標識化された細胞膜透過性の基質である Glycyl phenylalanyl-aminofluorocoumarin を添加すると、生細胞内のプロテアーゼ活性で蛍光を発することを利用し、蛍光強度の測定によって生細胞の数を測定することができる。蛍光強度は、Promega社製GloMax Microplate Readerによって行った。

### (5) Caspase3/7活性の測定

ケタミン曝露下でアポトーシスを起こした細胞の数をApoTox-Glo Triplex Assay (Promega社製)を用いて検討した。(4)の生細胞測定の実験に引き続いて、caspase-Glo 3/7 reagentを各ウェルに追加し、37°Cで30分間反応させると、Caspase活性により、発光基質が活性化され、Caspase活性に比例して発光反応を得ることができる。発光の強度をGloMax Microplate Readerにより測定し、Caspase3/7の活性を定量した。

### (6) 活性酸素種(ROS)の定量

ケタミン曝露下での細胞内の活性酸素種(ROS)レベルをROS-Glo  $H_2O_2$  Assay (Promega社製)を用いて検討した。 $H_2O_2$ 基質を6時間反応させると、細胞内の $H_2O_2$ と基質が反応し、ルシフェリン前駆物質が形成される。これに、ROS-Glo Detection Solutionを加え、25分後の発光量をGloMax Microplate Readerにより測定し、ROS産生量とした。さらに、ROS産生と、Caspase3/7活性の上昇の間の因果関係を調べるため、ROS scavengerのTrolox (500  $\mu$ M)を作用させ、ROSの除去がCaspase3/7の活性にどのような影響が出るかを検討した。

### (7) ATP産生量の定量

ケタミン曝露下での細胞内の ATP 量の変化を Mitochondrial ToxGlo Assay (Promega 社製) を用いて検討した。ATP Detection Reagent を各ウェルに添加し、細胞を溶解すると、ATP 量に比例して発光反応を得ることができる。発光の強度を GloMax Microplate Reader により測定し、ATP 量を定量した。

#### (8) NAD<sup>+</sup>および NADH の定量

NAD<sup>+</sup>/NADH-Glo Assay kit (Promega 社製) により Ketamin 曝露下の細胞における NAD<sup>+</sup>/NADH を測定した。キットの反応液を使用することにより、細胞内の NADH は pro-luciferin 還元酵素との作用により luciferin を形成する。さらに Ultra-Glo recombinant luciferase を作用させることで、NADH に比例する形で発光を得ることができる。発光の強度を GloMax Microplate Reader により測定し、NADH の量を定量した。また、NAD<sup>+</sup>についてはこれを還元した状態で NADH の定量を行うと、NAD<sup>+</sup>+NADH の総量を定量できるので、これを用いて最終的に NAD<sup>+</sup>/NADH を計算した。

#### (9) ミトコンドリアにおける酸化リン酸化反応の活性測定

ミトコンドリアコンプレックス I, II, IV, V の活性測定を MitoTox Complete OXPHOS Activity Assay Panel (Abcam 社製) を用いて行った。このキットは、ウシ心筋から採取されたミトコンドリアを 96 ウェルプレートにコーティングしたものであり、これにミトコンドリアコンプレックスの基質を加え、基質の減少曲線を特定の波長の吸光度により計測した。吸光度の計測は FLUOstar OPTIMA-6 (BMG Labtech) を使用し、コンプレックス I, V は 340nm、コンプレックス II は 600nm、コンプレックス IV は 550nm の波長設定で、カインティクスモードで測定した。

#### (10) ミトコンドリア膜電位の評価

ケタミンへ曝露した細胞におけるミトコンドリア膜電位を Mito-ID Membrane Potential Cytotoxicity Kit で評価した。ケタミンへの曝露後、Mito-ID Membrane Potential Dye Loading Solution を各ウェルに添加し、室温で 30 分間反応させ、GloMax Microplate Reader で 590nm の傾向強度を測定した。また、活性化したミトコンドリアを可視化するため、MitoTracker Red CMXRos で染色し、共焦点顕微鏡 TCS SP8 で観察した。

#### (11) 透過型電子顕微鏡における細胞内小器官の形態観察

細胞を 2.5% グルタルアルデヒド + 4% パラホルムアルデヒドで固定し、メタノールによる脱水処理の後、Epon812 に包埋し、超薄切片を作成し、ウラン酢酸とクエン酸鉛で染色し透過型電子顕微鏡 (日立社製 H-7100) で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) iPS 細胞由来神経幹細胞の培養とドパミン作動性ニューロンへの分化

典型的な培養経過を Fig 1 に示す。神経幹細胞として播種された細胞は、培養後まもなくは三角様の形状をしている (Fig. 1A, B) が、丸みを帯び、小突起を伸ばすようになる (Fig 1C)。培養 14 日後には、さらに突起を延長させ、突起同士がネットワークを形成するようになる (Fig 1D)。beta III-tubulin と TH の陽性率はそれぞれ  $91.8 \pm 2.9\%$  (Fig. 1E) と  $36.9 \pm 9.7\%$  (Fig. 1F) であった。

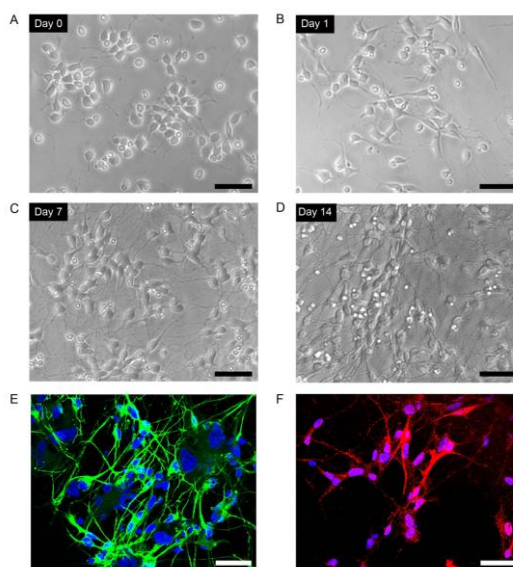


Fig 1 iPS 細胞由来神経幹細胞の培養とドパミン作動性ニューロンへの分化。A: 培養当日、B: 培養開始翌日、C: 培養開始 7 日後、D: 培養開始 21 日後 E:  $\beta$  III tubulin 染色 (緑色) F: Tyrosine hydroxylase 染色 (赤)

### (2) ケタミンのニューロンへの作用：形態の変化

iPS 由来のドパミン作動性ニューロンに対して、ケタミンを 20, 100, 500  $\mu$ M で 24 時間作用させたところ、500  $\mu$ M で細胞突起の退縮・消失が認められた。

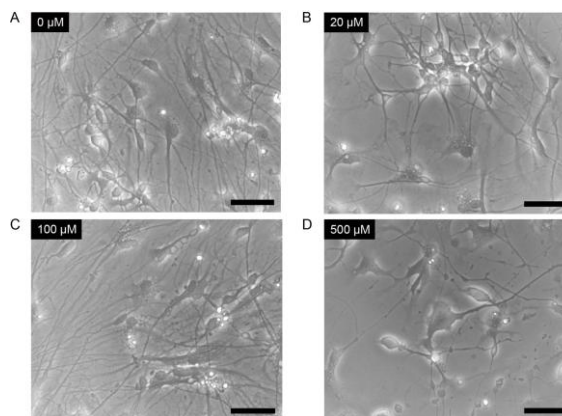


Fig 2. ケタミンのニューロンの形態への影響

### (3) ケタミンによる ROS 産生の増加とアポ

## トーシスの誘導

iPS 由来のドパミン作動性ニューロンに対して、ケタミンを 20, 100, 500  $\mu\text{M}$  で 6 時間または 24 時間作用させた場合のアポトーシスの発生について検討した。Caspase 3/7 は早期アポトーシスのマーカーであるが、500  $\mu\text{M}$  のケタミンへの曝露で 6 時間後より有意に上昇し、24 時間その傾向が維持されることが示された (Fig. 3A)。さらに、ROS の産生も同様に 500  $\mu\text{M}$  のケタミンへの曝露で 6 時間後より有意に上昇し、24 時間その傾向が維持された。生細胞の数についてはケタミンの作用による変化はなかった (Fig 3C)。

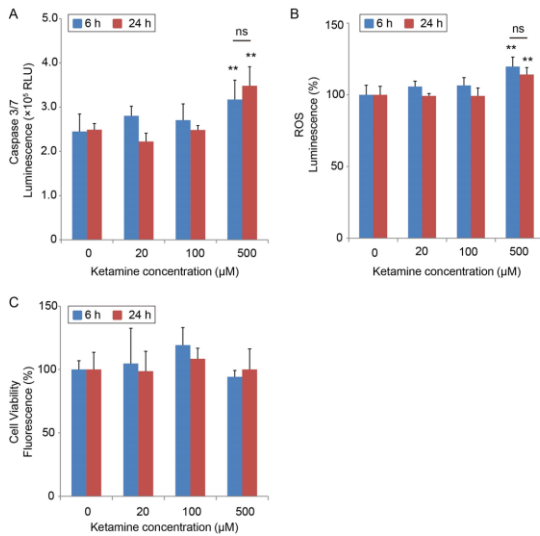


Fig 3 iPS 細胞由来ドパミン作動性ニューロンにおけるケタミンによるアポトーシス誘導 (A)、ROS 産生 (B)、生細胞の割合への影響 (C) に関する検討

ケタミンによるアポトーシス誘導と ROS 産生量の増加の関係について調べるために、ROS scavenger Trolox を作用させた状態で検討を行ったところ、Trolox により、ROS 量は有意に減少し、それに伴って、Caspase 3/7 の活性の上昇がなくなることが示された (Fig 4)。

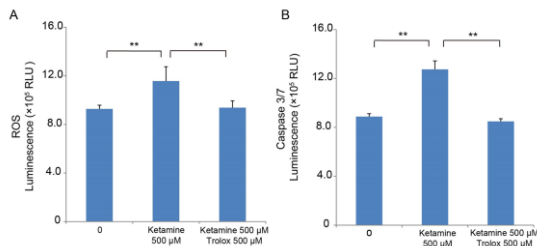


Fig 4: ケタミンのアポトーシス誘導における ROS 産生の役割

## (4) ケタミンによるミトコンドリア機能の抑制

iPS 由来のドパミン作動性ニューロンに対して、ケタミンを 20, 100, 500  $\mu\text{M}$  で 6 時間または 24 時間作用させた場合のミトコンドリア機能について評価するため、細胞内の ATP レベルについて検討した。ケタミン曝露 6 時間後より、細胞内 ATP レベルは 100, 500  $\mu\text{M}$

で有意に減少し、この傾向が 24 時間継続した。(Fig 5)。

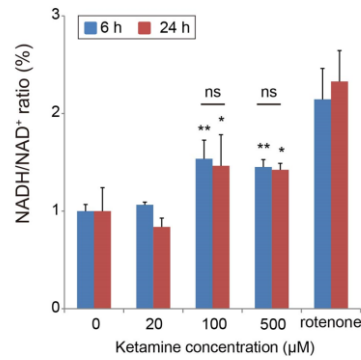


Fig 5: iPS 細胞由来ドパミン作動性ニューロンにおけるケタミンによる ATP 産生への影響に関する検討

さらに、NADH/NAD<sup>+</sup>について検討を行ったところ、ケタミンを 100, 500  $\mu\text{M}$  で作用させると、6 時間後より、NADH/NAD<sup>+</sup>が上昇することが示された (Fig 6)。

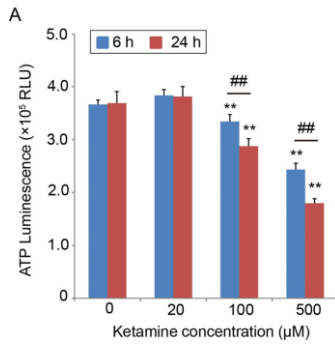


Fig 6: iPS 細胞由来ドパミン作動性ニューロンにおけるケタミンによる NADH/NAD<sup>+</sup>への影響に関する検討

NADH/NAD<sup>+</sup>の上昇は、ミトコンドリアでの利用障害ではないかと考え、MitoTox Complete OXPHOS Activity Assay Panel を使用してミトコンドリアにおける酸化的リン酸化反応に対するケタミンの作用を検討した。ケタミンは 125  $\mu\text{M}$  以上で有意にミトコンドリアコンプレックス I および V の活性を低下させた (Fig 7)。

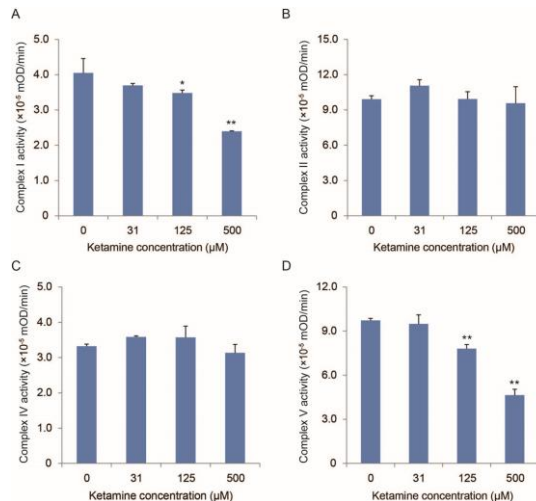




Fig 7: ケタミンのミトコンドリアコンプレックスに対する効果

我々は、さらに、iPS 由来のドーパミン作動性ニューロンにケタミンを作用させた際のミトコンドリア電位の変化を Mito-ID Membrane Potential Cytotoxicity Kit で評価した。ケタミンは 500  $\mu$ M で有意にミトコンドリア電位を低下させた。(Fig 8)

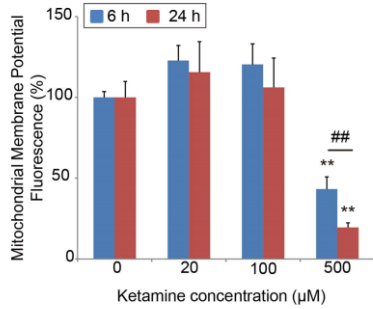


Fig 8: iPS 細胞由来ドーパミン作動性ニューロンにおけるミトコンドリア電位の測定

iPS 由来のドーパミン作動性ニューロンにおいて、活性化されたミトコンドリアを MitoTracker Red で染色し、共焦点顕微鏡で観察したところ、ケタミンを 100, 500  $\mu$ M で作用させるとミトコンドリアが断片化されている像が観察され、500  $\mu$ M では、その数も減少している様子が観察された。(Fig 9)

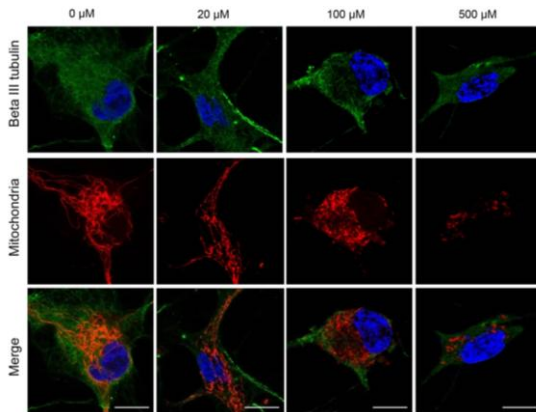


Fig 9: MitoTracker による活性化型ミトコンドリアの形態観察。緑は  $\beta$  III tubulin を染めたもの、青は DAPI による核染。100  $\mu$ M では、ミトコンドリアが断片化している状況が観察され、500  $\mu$ M では、活性化型ミトコンドリアの総数も減少した。

さらに、透過電顕標本での観察では、ケタミンを 100, 500  $\mu$ M で作用させるとミトコンドリアが最小化しており、オートファゴゾーム用の構造が濃度依存的に認められ、ミトコンドリアが壊されている様子が観察された。(Fig 10)

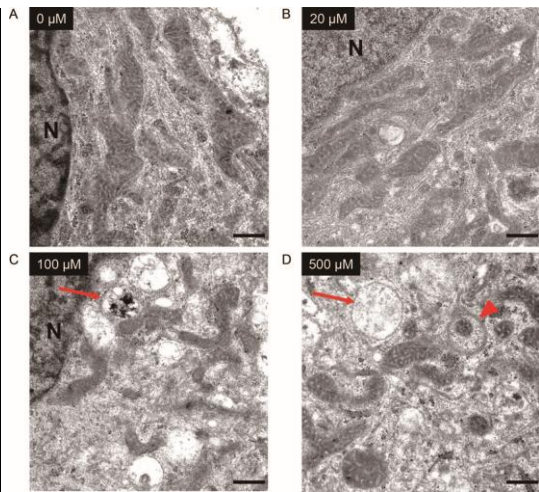


Fig 10: iPS 細胞由来ドーパミン作動性ニューロンにおけるケタミンによるミトコンドリアの形態変化:透過型電子顕微鏡による観察。赤矢印の箇所ではオートファゴゾーム様の構造が認められた。

以上の検討により、①iPS 由来のドーパミン作動性ニューロンは、麻酔薬の毒性評価系として、有用な実験系であること、②ケタミンは 100  $\mu$ M 程度の濃度でミトコンドリアコンプレックス I, V の機能を低下させ、これに伴い、ATP の産生量が低下し、ニューロンの機能を低下させること③さらに高濃度のケタミンにより、細胞内の ROS レベルが上昇し、これが原因で Caspase の活性が亢進し、アポトーシスが誘導されることが示唆された。100  $\mu$ M という濃度は臨床で使用される際の血中濃度としては上限に位置するため、極端に血中濃度が上がらない管理を心がければ、ケタミンをこれらの毒性に関係なく安全に使用できると考えられるが、低酸素などにより、組織の感受性が変化することなども考慮すれば、より慎重な投与が推奨されると考えられた。

## 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)

Ito H, Uchida T, Makita K. Ketamine causes mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. Plos One (In Press) 2015. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

伊藤裕之, 内田篤治郎, 榎田浩史. ヒト人工多能性幹細胞由来神経細胞を用いたケタミンの毒性評価:ミトコンドリア機能障害およびアポトーシス誘導に関する検討. 日本麻酔科学会 第62回学術集会 2015. 5. 28 神戸

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎田浩史 (MAKITA, Koshi)

東京医科歯科大学

大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20199657

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

伊藤裕之 (ITO, Hiroyuki)

東京医科歯科大学

医学部附属病院・助教

研究者番号：80595554

内田篤治郎 (UCHIDA, Tokujiro)

東京医科歯科大学

大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40262183