

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861359

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬による神経細胞毒性と小胞体ストレス

研究課題名(英文) The effect of endoplasmic reticulum stress on neurotoxicity caused by inhalational anesthetics

研究代表者

小見田 真理 (KOMITA, Mari)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90589194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：目的) 吸入麻酔薬により神経障害が助長される可能性が指摘されているが、その機序は明らかではない。近年小胞体機能の障害により様々な疾患が誘発されることが明らかになっている。我々は小胞体機能が障害された遺伝子変異マウスやその細胞を用いて、吸入麻酔薬の神経毒性の分子機序に小胞体機能が関与しているのかどうかを検討した。

結果・考察) 吸入麻酔薬の曝露によって小胞体ストレスに関係するBiPやCHOPの発現誘導が見られることから、吸入麻酔薬は小胞体機能を阻害する事が示された。変異BiPマウスと同様、小胞体機能の障害により誘発される疾患の患者においては、吸入麻酔薬による神経障害が出現しやすいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Background: The mechanisms by which inhalational anesthetics cause neurotoxicity are not well clarified. Since ER stress leads to cellular dysfunction and apoptotic cell death, leading to diverse human disorders such as neurodegenerative diseases, we hypothesized ER stress may play a role in neurotoxicity caused by inhalational anesthetics.

Results, Conclusions: Sevoflurane exposure cause ER stress, which is tolerated to some extent in the wild type cells. When this tolerance is limited, like in cells with mutant BiP, the exposure leads to cell death in the brain, indicating that ER stress may partially mediate neurotoxicity caused by inhalational anesthetics. This study conceivable that the patients with certain conditions sensitive to ER stress such as ischemia, hypoxia, developing brain or neurodegenerative diseases may be vulnerable to inhalational anesthetics.

研究分野：麻酔科学

キーワード：神経科学 ストレス

1. 研究開始当初の背景

生後7日目のラットに、イソフルラン、ミダゾラム、笑気で麻酔を行うと、神経細胞にアポトーシスが生じ、成長後に学習・記憶障害が残る、という2003年のJevtovicらの報告以来、麻酔薬による神経障害についての研究が多く進められているが、これらの分子機序は十分には明らかとなっていない。

この分子機序の一説に、細胞質カルシウム変化によるものがある。吸入麻酔薬に曝露されると、小胞体や細胞外からカルシウムが細胞質に流入し、その結果、細胞質カルシウムが上昇して、さらにミトコンドリアからのチトクロームの放出、カスパーゼの活性化を介して細胞死を誘導する、というものである。

Bipなどの小胞体分子シャペロンは、カルシウム結合タンパク質であり、カルシウム濃度の変化によって小胞体での蛋白合成が阻害され、小胞体ストレスにつながると考えられる。

小胞体は、細胞内小器官であり、タンパク質の合成、カルシウムの貯蔵などの役割を果たしている。

小胞体ストレスは、様々な侵襲により、小胞体でのタンパク成熟が阻害され、異常蛋白が集積し、小胞体での処理能力を上回る状態となることである。

すると、小胞体ストレス反応(UPR)が起こり、分子シャペロンの産生増加、それ以外のタンパクの産生抑制、異常タンパクの分解が亢進する。こうして小胞体ストレスが軽減されるが、侵襲が大きいと、代償できず、細胞死が誘導される。

Bipは、タンパク質の構造形成を促進する、小胞体分子シャペロンであり、小胞体ストレス反応のセンサーの役割も果たしている。

私たちは、BiPの、カルボキシ末端にあるKDEL配列を、HAタグに置換した、変異BiPノックインマウスを作成した。

小胞体分子シャペロンBiPは小胞体から分泌されると、ゴルジ体でKDEL受容体に認識され、小胞体に輸送され回収されるが、変異BiPは回収されない。そのため、細胞はBiPの産生を亢進して補うため、細胞は小胞体ストレスに対して感受性が高くなる。

2. 研究の目的

吸入麻酔薬により神経障害や認知機能障害が助長される可能性が指摘されているが、その機序は明らかではない。吸入麻酔薬は細胞膜を透過し、細胞内小器官にも作用すると考えられる。

近年小胞体機能の障害により神経変性疾患などの様々な疾患が誘発されることが明らかになっている。我々は小胞体機能が障害された遺伝子変異マウスを用いて、吸入麻酔薬の神経毒性の分子機序に小胞体機能が関与しているのかどうかを検討した。

3. 研究の方法

・細胞での実験

小胞体機能を担う代表的な分子シャペロ

ンBiPの変異体を発現する変異Bipノックインマウス由来の線維芽細胞(B/B MEFs)、野生型マウス由来の線維芽細胞(+/+ MEFs)、マウス神経芽腫細胞(Neuro2a cells)をそれぞれ麻酔群は3%セボフルラン、対照群は酸素に2.5~7.5時間曝露後、24時間培養し、細胞を回収した。小胞体ストレスやその結果生じる細胞死に關与するBiPやCHOPの発現を検出し、対照群と比較した。

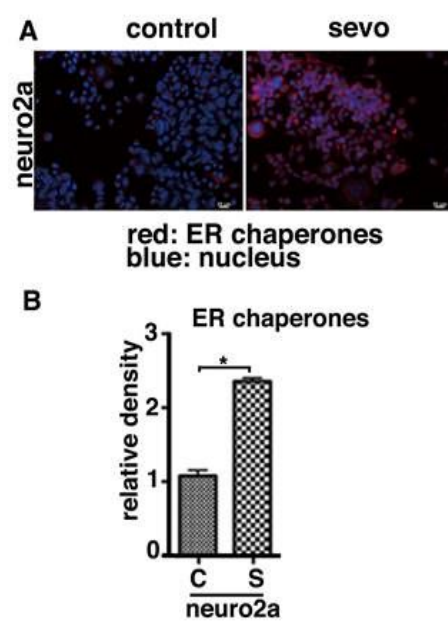
・マウスでの実験

ヘテロ変異Bipノックインマウス同士を交配し、出産前日(妊娠17.5日目)に母マウスを麻酔群は3%のセボフルラン、対照群は40%酸素に3時間曝露し、24時間後に帝王切開を行い新生児マウスの遺伝子型を調べ、脳組織を取り出し細胞死を解析し、対照群と比較した。また、麻酔群のマウスにおいては、麻酔中の血圧・脈拍・尾の血流量・呼吸数・酸素飽和度をモニターし、大きなバイタルの変動がみられないか確認した。

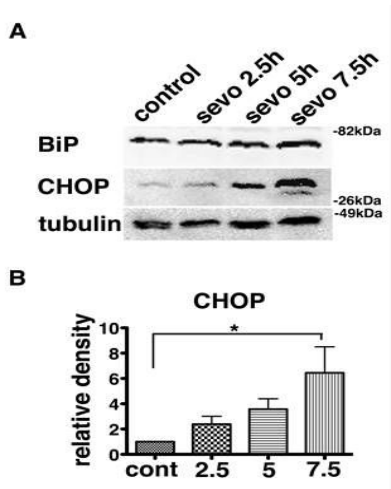
4. 研究成果

まず最初に、吸入麻酔薬が小胞体機能にどのような影響を及ぼすかを調べるため、私たちは神経芽腫細胞neuro2aにセボフルランを曝露する実験を行った。

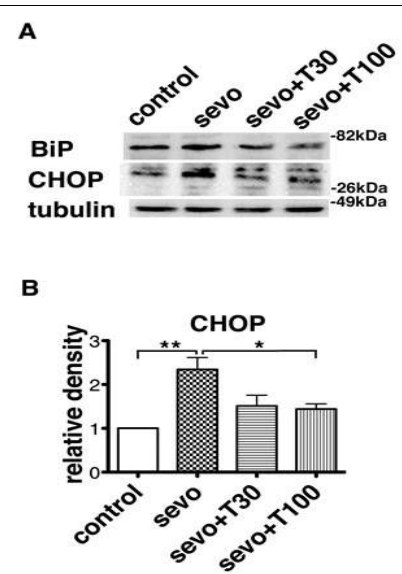
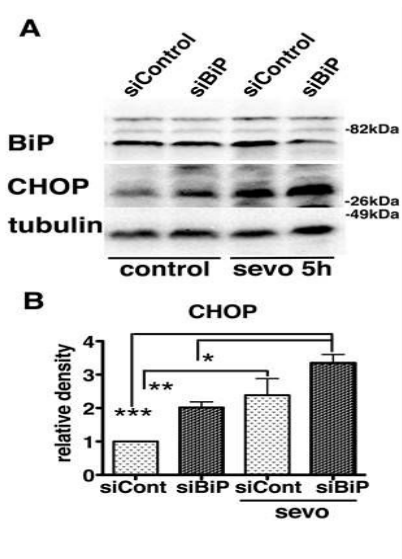
neuro2aにセボフルラン3%を3時間曝露したところ、小胞体シャペロン(Bipを含む)の発現が有意に増加した。つまり、セボフルランの曝露によって、小胞体ストレスが生じたと考えられた。(Fig. 1)



次に、曝露時間を変えてneuro2aにセボフルラン3%を曝露したところ、小胞体ストレスによる細胞死を誘導する転写因子であるCHOPの発現量が時間依存的に増加した。つまり、セボフルランの曝露で、小胞体ストレスによる細胞死が誘導される傾向があると考えられた。(Fig. 2)

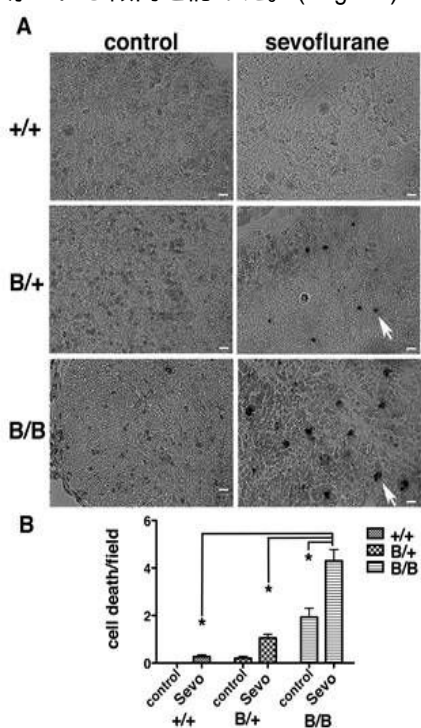


また、BiPの発現量を減らすSi BiPやケミカルシャペロン TUDCA を用いた実験により、小胞体分子シャペロン BiP やケミカルシャペロン TUDCA は、小胞体ストレスによる細胞死から、細胞を保護する役割があると考えられた。つまり、小胞体機能を向上させると、神経毒性の抑制につながる事が示唆された。(Fig. 3) (Fig. 4)

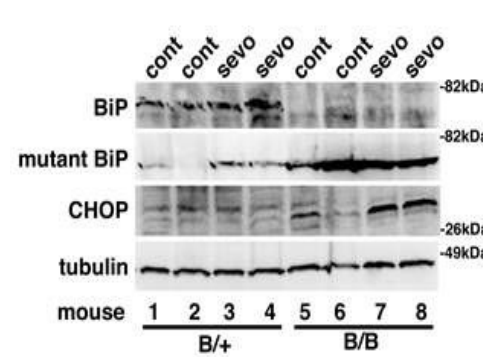


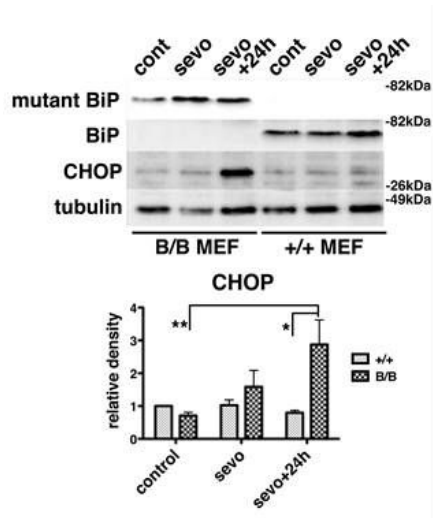
続いて *in vivo* での実験を行った。ヘテロ変異 BiP ノックインマウス同士を交配し妊娠させ、妊娠後期の 17.5 日目に、母親に麻酔を行った。酸素 40% 下に麻酔群には、セボフルラン 3% を 3 時間曝露した。麻酔終了後 24 時間後に帝王切開し、胎児の脳を回収して、遺伝子型を解析し、神経アポトーシスを検出し、対照群と比較を行った。

すると、胎児マウス脳の組織像では変異 BiP マウス、特にホモ変異マウスにおいて、セボフルラン曝露によって細胞死が多く誘導される傾向を認めた。(Fig. 5)

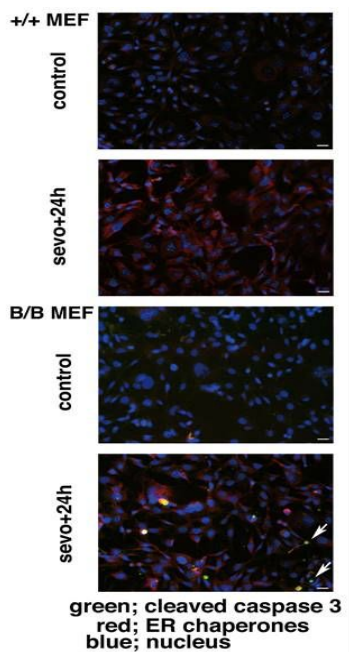


また、ウエスタンブロット解析においても、セボフルラン曝露によって、ホモ変異マウスやマウス由来の繊維芽細胞では変異 BiP や CHOP の発現が増加しており、小胞体ストレス反応による代償ができず、細胞死が誘導されたと考えられた。つまり、吸入麻酔薬の曝露で小胞体ストレスが生じたが、野生型のマウスでは小胞体ストレス反応による代償により生き延びるが、ホモ変異 BiP マウスでは小胞体ストレスによる代償ができず細胞死が誘導されたと考えられた。(Fig. 6) (Fig. 7)





また、マウス線維芽細胞に吸入麻酔薬を曝露することによって、野生型・ホモ変異マウスのどちらの細胞でも Bip の発現が増加したが、アポトーシスを誘導する活性化カパーゼ 3 が増加したのはホモ変異マウス細胞のみであった。(Fig. 8)



今回の研究の考察は以下のとおりである。吸入麻酔薬セボフルランの曝露によって BiP の発現誘導がみられることより、吸入麻酔薬は小胞体機能を阻害し、小胞体ストレス反応を誘導することが示唆された。

野生型細胞では、BiP など小胞体分子シャペロンの産生増加により細胞障害が代償されるが、変異細胞では代償されず、神経細胞死が誘導されることが示唆された。また、その神経毒性は麻酔薬を用いた時間や量に依存して高まると考えられた。

今回の研究の limitation は以下の通りである。

まずは、吸入麻酔薬の曝露時間が、invitro と invivo で異なるという点があげられる。

細胞は 5 時間、7.5 時間という長時間の麻酔に耐えられたが、マウスは 3 時間以上の麻

酔に耐えられなかったためである。長時間の麻酔では、低血圧、低酸素血症、低血糖などの麻酔薬以外の影響を除外できなくなってしまう。

次に、invitro の実験で用いた神経芽腫細胞や線維芽細胞は、通常の神経細胞とは異なるという点もあげられる。

Invivo の実験においては、今回の実験ではセボフルラン曝露時期を妊娠後期に設定したが、この時期は、マウスの神経アポトーシスに対する感受性が高い時期とは異なるという点があげられる。

事実、新生児マウスに麻酔を行うと、野生型マウスに神経細胞死が生じたという研究報告が多数みられる。私たちは、異なる遺伝子型のマウスに同条件で麻酔を行うために麻酔時期を胎児期に設定した。

その結果、今回の研究では、変異型マウスには神経細胞死が生じたが、野生型マウスには生じなかった。つまり、変異型マウスは野生型マウスより神経細胞死に対する感受性が高いと考えられた。

同様に、神経変性疾患や躁うつ病患者など、小胞体機能障害により誘発される疾患患者においても、麻酔薬による神経細胞死が生じやすい可能性が考えられる。

今回の研究で用いたセボフルランは吸入麻酔薬の一つであり、気道刺激性が少ない、心筋抑制は比較的少ないなどの特徴があるため、小児麻酔領域で最も頻繁に用いられる麻酔薬である。他の吸入麻酔薬との神経毒性の違いについては、様々な研究報告が認められるが、明確にはされていない。

この研究の結論は以下のとおりである。

吸入麻酔薬の曝露によって BiP や CHOP の発現誘導が見られることから、吸入麻酔薬は小胞体機能を阻害する事が示唆された。変異 BiP マウスと同様、小胞体機能の障害により誘発される疾患の患者においては、吸入麻酔薬による神経障害が出現しやすいかもしれない。そのため、実際の臨床において麻酔薬濃度や曝露時間を軽減するなどの配慮が求められる可能性がある。

## 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)

Komita M, Jin H, Aoe T. (2013)

The effect of endoplasmic reticulum stress on neurotoxicity caused by inhaled anesthetics.

Anesth Analg. Nov;117(5):1197-204.

DOI 10.1213/ANE.0b013e3182a74773.

査読 無

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0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 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

小見田 真理 (KOMITA, Mari)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90589194

##### (2) 研究分担者

青江 知彦 (AOE, Tomohiko)  
千葉大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：90311612

##### (3) 連携研究者

なし( )

研究者番号：