

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861974

研究課題名(和文) 発達期脳神経における全身麻酔薬による細胞死誘導の機序解明

研究課題名(英文) Continuous monitoring of caspase-3 activation induced by propofol in developing mouse brain

研究代表者

西村 晶子(Nishimura, Akiko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00551227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経発達期における全身麻酔薬の神経毒性が重要な問題とされている。これまでに長時間の麻酔薬暴露がアポトーシス変化を誘導することが報告されているが、アポトーシス変化がいつ開始されるのかは不明である。本研究ではFRET現象を利用しカスパーゼ3活性を蛍光顕微鏡下で可視化できるSCAT3遺伝子を導入したマウスを用い、全身麻酔薬によるアポトーシス誘導を継続的に観察する手法を開発した。SCAT3遺伝子導入マウスの新生仔から作成した脳スライス標本において、全身麻酔薬であるプロポフォルの投与開始5時間後にカスパーゼ3活性の有意な増大を認めた。本手法はアポトーシス変化の継続的観察に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The neurotoxicity of anesthetics on the developing brain has drawn the attention of anesthesiologists. Previous studies have shown that prolonged exposure to anesthetics causes apoptosis. Exactly when the apoptotic cascade starts in the brain remains uncertain. We describe the development of a continuous monitoring system to detect caspase-3 activation using an in vivo model. Brain slices from neonatal SCAT3 transgenic mice with a heterozygous genotype (n = 20) were used for the monitoring of caspase-3 cleavage. SCAT3 is a fusion protein of ECFP and Venus connected by a caspase-3 cleavable peptide, DEVD. A specimen from the hippocampal CA1 sector was mounted on a confocal laser microscope and was continuously superfused with propofol. We observed a shift in the histogram toward the right over time, indicating caspase-3 activation at five hours in the propofol. Thus, real-time FRET imaging was capable of identifying the onset of apoptosis triggered by propofol in neonatal brain slices.

研究分野：麻酔学

キーワード：カスパーゼ3 SCAT3 FRET プロポフォル アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 1999年にNMDA受容体遮断薬が幼若ラットの大脳皮質に細胞死を引き起こすことが報告されてから( ), NMDA受容体遮断薬でありGABA受容体作動薬である全身麻酔薬が脳神経発達に与える影響について、動物やヒトを対象にした数多くの研究が報告されてきた。しかし脳神経発達期の麻酔薬暴露が明らかな学習障害を示した行動実験の報告は少なく( ), ヒトを対象とした大規模調査の結果でも結論は出ていない。組織学的報告と実際の発育過程に差異があるのは生体内環境下で麻酔薬の影響を継時的に観察する手法が未だ確立されていないためである。

(2) 神経細胞のアポトーシス変化をCaspase 3活性により判定する場合、一般的に免疫染色を行うため数時間の恒温培養が必要となる。このため細胞のCaspase 3活性をリアルタイムで観察することはできなかった。近年開発されたSCAT3遺伝子プローブは、FRET現象を利用してCaspase 3活性により蛍光波長が変化するタンパクを全身の細胞内に発現させることができる( )。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではSCAT3遺伝子導入マウスを使用することで、生細胞においてアポトーシス変化の指標であるCaspase 3活性を継時的に観察する手法を確立することを目的とする。

(2) 全身麻酔薬の暴露による脳組織のアポトーシス変化がどのようなタイミングで発生するのか生体組織で検証する端緒とする。

3. 研究の方法

SCAT3は、433nmの波長で励起され475nmの蛍光を発生するECFPと475nmの波長で励起され525nmの蛍光を発生するVenusがLinkerで接続されている蛍光タンパクを全身の細胞に発現させる遺伝子プローブである。ECFPとVenusはLinkerで接続されているとECFPの励起光でVenusの蛍光が発生するFRET現象をおこす。Linkerはcaspase3活性により切断されるため、caspase3活性が誘導されるとFRET現象が消失し、観察される蛍光波長がVenusの525nmからECFPの475nmに変化する(図1)。

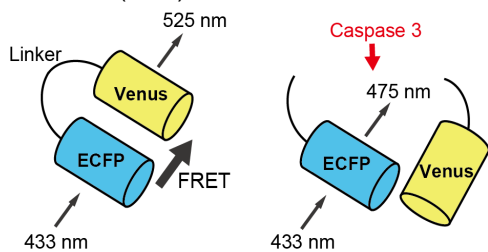


図1 Caspase3活性による蛍光波長の変化

(1) SCAT3遺伝子を導入したHeLa細胞において、Caspase3活性による蛍光波長変化を顕微鏡下で観察できることを検証する。

(2) SCAT3遺伝子を導入した遺伝子改変マウスの継代維持を確立する。

(3) SCAT3遺伝子導入マウスの新生仔マウスから脳スライス標本を作成し、Caspase3活性誘導による蛍光波長変化を蛍光顕微鏡下で観察する。

4. 研究成果

(1) SCAT3遺伝子を導入したHeLa細胞において、Caspase3活性を誘導するTNFおよびサイクロヘキシミドの投与により観察される蛍光波長が変化することが観察された。図2はHeLa細胞を顕微鏡下で経時的に観察した図で、ECFPの蛍光強度とVenusの蛍光強度の比率を疑似カラーで表示している。FRET現象消失によりECFPの蛍光強度が強くなると黄色-赤色に変化する。90-100分後にECFPとVenusの蛍光強度が変化しCaspase3活性によってFRET現象が消失したことがわかる。

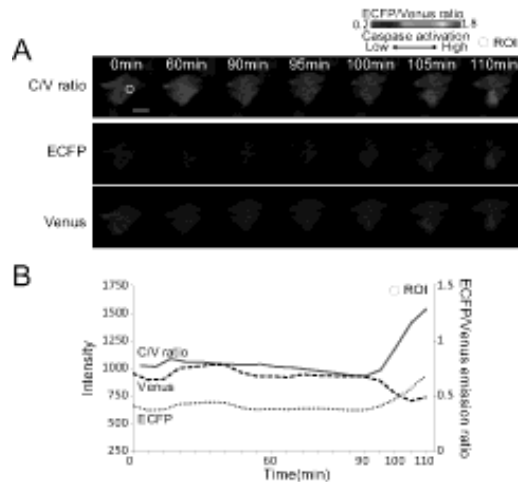


図2 HeLa細胞における蛍光波長の変化

(2) SCAT3遺伝子を導入した新生仔マウスの神経細胞において、FRET現象消失による蛍光波長変化が観察された。

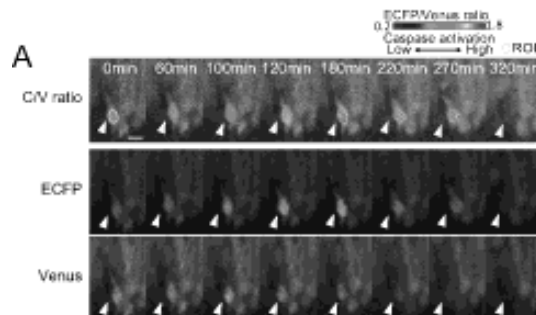


図3 マウス神経細胞における蛍光波長変化

図3は図2と同様、ECFPとVenusの蛍光強度比を疑似カラーで表現しており、観察を開始した100分後にCaspase3活性によってFRET現象の消失が誘導され蛍光強度比が変化したことがわかる。

(3) SCAT3 遺伝子を導入した新生仔マウスから脳スライス標本を作成し、認知機能に關与する海馬のCA1領域に着目し、全身麻酔薬への暴露によってどのようなタイミングでCaspase3活性が誘導されるのか検証した。図4は麻酔薬を投与しないコントロールの一例で図5は全身麻酔薬であるプロポフォールを投与した海馬における蛍光波長変化の一例である。

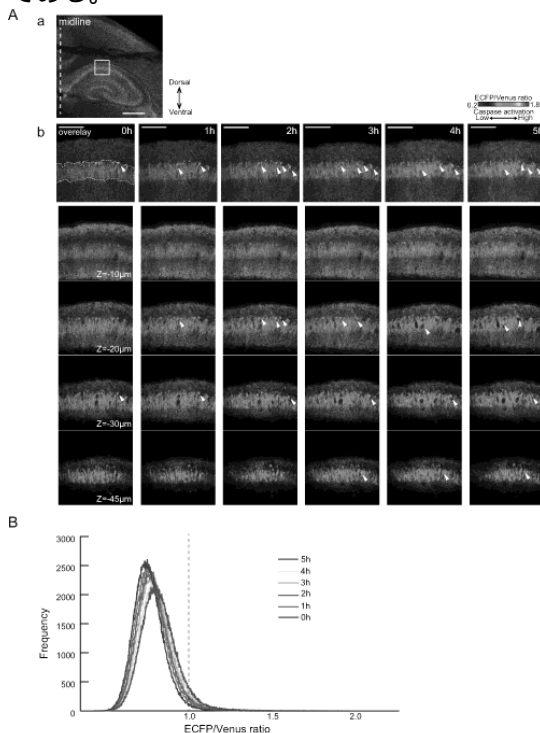


図4 海馬における蛍光波長の継時的変化

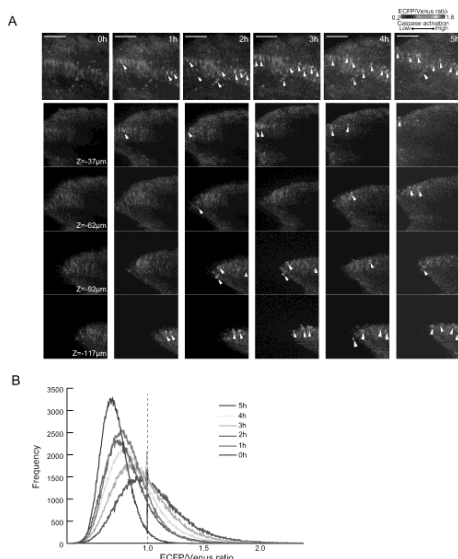


図5 全身麻酔薬投与後の蛍光波長変化

コントロールでは継時的にわずかにCaspase3活性の増大が認められるものの測定開始時と有意差は認められなかった。これに対し、プロポフォール投与下では1-2時間後から蛍光波長の変化が認められ、投与5時間後には優位にCaspase3活性が増大した。この結果はこれまでの組織学的研究の結果を支持するものであると同時に、組織の一部では明らかに麻酔薬投与後の早い時間でCaspase3活性が誘導されていることを示すものであった。

<引用文献>

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vokler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW: Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 283, 70-74  
 Jetovic-Todorovic V, Beasls J, Benschoff N, Olney JW: *Neuroscience*. 122, 609-616  
 Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, Miura M: Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* 160, 235-243.

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)

Ayumi Koono, Akiko Nishimura, Shiro Nakamura, Ayako Mochizuki, Atsushi Yamada, Ryutaro Kamijo, Tomio Inoue, Takehiko Iijima: Continuous monitoring of caspase-3 activation induced by propofol in developing mouse brain *Int. J. Devl Neuroscience* 51 (2016) 42-49 (査読有)

[学会発表](計2件)

今野歩, 西村晶子, 中村史朗, 山田篤, 上條竜太郎, 井上富雄, 飯島毅彦: 発達機能神経における全身麻酔薬による細胞死誘導の検討  
 (第62回 昭和大学学士会総会, 東京, 2015年10月)

Konno A, Nishimura A, Nakamura S, Yamada A, Kamijo R, Inoue T, Iijima T: Live imaging of apoptogenic change induced

by general anesthetic neurotoxicity in  
developing mouse  
(IARS 2015 Annual Meeting and  
International Science Symposium,  
Honolulu, USA, March 2015)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西村 晶子 (NISHIMURA, Akiko)  
昭和大学・歯学部・全身管理歯科学講座  
歯科麻酔科学部門・助教  
研究者番号：5 5 1 2 2 7

### (2)研究協力者

今野 歩 (KONNO Ayumi)