

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861249

研究課題名(和文) 発達期および老年期の脳内神経伝達からみた吸入麻酔薬の影響とその解析

研究課題名(英文) Modulation of neural circuits by volatile anesthetic in the mouse brain during postnatal development and senium

研究代表者

菅澤 佑介 (SUGASAWA, Yusuke)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80459114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000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関心が高まっている。我々は電気生理学的手法を用い、発達過程への吸入麻酔薬の影響を線条体Cholinergic interneuronの過分極活性化陽イオン電流(Ih)の変化により分析を行った。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を抑制した。さらに感覚応答に重要とされるCholinergic interneuronのrebound activationを抑制し、Ihが関与する生理的条件下での発火頻度を変化させた。

研究成果の概要(英文)：Volatile anesthetics have been reported to inhibit the hyperpolarization-activated cation current (Ih) that contributes to generation of synchronized oscillatory neural rhythms. Meanwhile, 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 developing striatum. Our analyses showed that the changes in Ih of cholinergic interneurons occurred in conjunction with maturation. In addition, sevoflurane caused significant inhibition of Ih in a dose-dependent manner. Moreover, sevoflurane significantly decreased spike firing during the rebound activation, which is essential for responses to the sensory inputs from the cortex and thalamus. The sevoflurane-induced inhibition of Ih in striatal cholinergic interneurons may lead to alterations 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 脳内神経伝達

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、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する。

1990年代より N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体遮断薬と gamma-aminobutyric acid (GABA) 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。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きた。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位の抑制、さらには静止膜電位の形成に関与す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。またシナプスにおいては、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。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。

今回特記すべきは、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的および組織学的検索を行なうことである。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。

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。Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) は神経細胞に豊富に存在し、神経伝達物質合成酵素やシナプス小胞結合タンパク、イオンチャネル、神経伝達物質受容体などをリン酸化することによってそれらタンパク機能を調節し、シナプス伝達の可塑性、さらには学習・記憶をはじめとする高次脳機能に重要な役割を果たすと考えられている。そこで本研究では、大脳皮質や海馬において学習や記憶に関与するとされる CaMK をはじめ、プロテインキナーゼ C (PKC)、ミトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 系、および神経終末端の G タンパク質の伝達物質放出調節における吸入麻酔薬の影響について免疫プロットにより定量し、その発現機序を解析する。

学習や記憶はシナプスにおける電気信号の伝達効率が変化することにより成立している。このシナプス伝達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。神経伝達に関する研究の対象観察は主に CA1 領域で行われている。これは CA1 が記憶・学習に強く影響を与える部位であると考えられているためである。また海馬にも多く存在する CaMK であるが、LTP を含めた数種類のシナプス可塑性にとって重要な酵素としてその特性が注目されており、シナプス後高密度構造にきわめて豊富に存在する多サブユニット セリン/スレオニン タンパク質リン酸化酵素である。この酵素を薬理的に阻害すると LTP が阻止され、学習と記憶に障害を与えることは広く知られている。さらにスパインの形態変化を引き起こすこと、あるいはシナプスの GABA 受容体や、最近注目を浴びているシナプス領域外 GABA 受容体 (Tonic GABA receptor)

を介した反応にも目を向け、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。

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 (I_h) の変化により分析を行う。

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。

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は多い。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するものと考えられる。

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 (I_h) 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 I_h 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 の経時的变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 週等での経時的变化を観察する。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 μ 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) 虚血神経終末端の G タンパク質伝達物質放出調節における吸入麻酔薬の影響：伝達物

質の放出抑制に働く 3 量体 G タンパク質のほか、神経終末端内には単量体 G タンパク質が存在する。G タンパク質の活性阻害剤や促進剤をそれぞれ calyx of Held 神経終末端内に直接注入し、シナプス反応の振幅に対する作用をみる。また高頻度刺激によるシナプス抑制と回復時間を検討する。この高頻度刺激により枯渇したシナプス小胞の補給をこの単量体 G タンパク質は促進すると予想されるが、吸入麻酔薬への曝露によりどのような影響を受けるかを解析する。

(4) 吸入麻酔薬長期曝露と細胞内シグナル伝達の免疫プロットによる定量化：細胞内シグナル定量解析の意義として、海馬では Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK)、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) が記憶・学習の獲得過程に関与している。特に CaMK は海馬の興奮性入力である錐体細胞の樹状突起に高濃度に発現しているため、スパインの形態変化を引き起こし、シナプスのグルタミン受容体 (GluR1) の量を変化させることによりシナプス伝導効率を長期的に変化させるといわれている。このためシナプス伝達長期増強 (LTP)、長期抑制 (LTD) などのシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。一方、MAPK は核内の cAMP response element binding protein (CREB タンパク質) をリン酸化して神経の回路形成や生存に関与するタンパク質発現を調節している。そこで吸入麻酔曝露による中枢神経系への影響について検討するため、マウスを吸入麻酔薬に 1 日あたり 5 時間曝露 (約 4~5 日間) し、大脳皮質および海馬を摘出する。各組織を 0.5% TritonX-100、プロテアーゼ阻害薬、ホフファターゼ阻害薬を含む可溶性バッファーでホモジナイズ、さらに遠心分離により細胞抽出液を得る。そして CaMK、プロテインキナーゼ C (PKC)、MAPK の定量変化を免疫プロット法により解析する。また海馬では神経終末において興奮性伝達物質：グルタミン酸の放出に関与する synapsin I を定量化し、後シナプスでは AMPA 受容体 (GluR1) を免疫プロットにより定量する。

(5) マウス線条体 cholinergic interneuron における I_h 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 I_h の絶対値増加を認め、セボフルランは濃度依存性に I_h を抑制し、 I_h 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 (K_{ir}) は中枢神経系の調律形成に I_h と同様に重要とされるが、 K_{ir} 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 K_{ir} への直接作用は小さく、またセボフルランの I_h に対する作用への K_{ir} 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、 I_h 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 I_h 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。

(3) 線条体 cholinergic interneuron は自発的な発火をみとめ、 I_h 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。

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 9 件)

Ishibashi C, Hayashida M, Sugasawa Y, Yamaguchi K, Tomita N, Kajiyama Y, Inada E: Effects of dexmedetomidine on hemodynamics and respiration in intubated, spontaneously breathing patients after endoscopic submucosal dissection for cervical esophageal or pharyngeal cancer.

J Anesth 30: 628-636, 2016, 査読有

榎本達也, 杉田萌, 勝田陽介, 保利直助, 洪景都, 斎藤理恵, 長谷川理恵, 高橋良佳, 菅澤佑介, 山口敬介, 井関雅子, 稲田英一: 慢性痛患者の特性は抗うつ薬デュロキセチンの治療効果を予測できるか? 麻酔 65: 1005-1008, 2016, 査読有

Sugasawa Y: Effect of yokukansan, japanese herbal medicine, on phantom-limb pain. M.E.J.Anesth 23: 499-500, 2016, 査読有

Ando N, Sugasawa 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

菅澤佑介, 榎本達也, 松本園子, 飯田史絵, 原厚子, 光畑裕正: 加味帰脾湯の慢性痛に対する効果. 痛みと漢方 24: 52-56, 2014, 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

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.

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.

山口敬介, 榎本達也, 菅澤佑介, 斎藤理恵, 高橋良佳, 長谷川理恵, 千葉聡子, 井関雅子: ガバペンチンがサブスタンス P 受容体を介する MAP キナーゼシグナル伝達系に与える影響について. 日本ペインクリニック学会 第 49 回大会, グランフロント大阪, 大阪府大阪市.

福田征孝, 菅澤佑介, 河内山幸, 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.

勝田陽介, 菅澤佑介, 田中真佑美, 赤澤年正, 角倉弘行, 稲田英一: 脊髄くも膜嚢胞合併妊娠の帝王切開術の麻酔経験. 日本麻酔科学会 関東甲信越・東京支部 第 55 回合同学術集会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市.

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅澤 佑介 (SUGASAWA, Yusuke)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 80459114