

論文内容の要旨

Establishment of an *in vitro* cell line experimental system for the study of
inhalational anesthetic mechanisms

吸入麻酔薬作用機序を研究するための cell line を用いた *in vitro* 実験系の確立

日本医科大学大学院医学研究科 外科系疼痛制御麻酔科学分野

大学院生 永本 盛嗣

Neuroscience Letters (2016) 630.163-168 掲載

【緒言】

吸入麻酔薬 *sevoflurane* は全身麻酔薬として頻用されているが、その作用の分子機序、特に麻酔薬の標的分子はほとんど未解明である。我々の研究グループでは以下の知見を得てきた。①*sevoflurane* による全身麻酔は様々な器官での時計遺伝子発現に影響を与え、脳において概日時計の中核となる *Per2* の発現を抑制する。*Per2* は概日時計の中核となる蛋白質 PER2 をコードし、概日リズムのコアコンポーネントである視交叉上核に強く発現することが知られている。②*sevoflurane* は視交叉上核における *Per2* を可逆的に抑制する。

上記の結果から *sevoflurane* によって *Per2* 発現は可逆的に抑制されることが明らかであった。その際に切片培養を用いた研究を行ってきたが、視交叉上核には様々なタイプのニューロンとグリアが含まれており複雑な構成をとるため、麻酔作用の分子的作用メカニズムの研究は困難であった。従って今後の生化学的・分子生物学的手法による実験のために性質の変わらない均一な細胞を大量に必要とすると考えられたため、今回の研究では *cell line* を用いた *in vitro* での実験系を確立することを目的とした

【方法】

2つのステップで実験が構成されている。一つは持続的な *cell line* の培養と *cell line* への揮発性麻酔薬の投与が可能な系の改良である。培地の温度を一定にするため温度を持続的にモニタリングする構造とした。また二酸化炭素濃度を一定に保ち培地の蒸発を最小限にするために暗箱内への送気をタイマーで制御し間欠的にした。

もう一つのステップは *mPer2* のプロモータ領域に *dLuc* を発現し、麻酔薬に応答する培養細胞株の確立である。*Cell line* はマウス視床下部由来の GT1-7、ラット視交叉上核由来の RS182、N14.5 を使用した。先行研究では *Per2-dLuc* のトランスジェニックマウスのスライスを使用しルシフェラーゼによる生物発光をモニタリングしたことから、*cell line* に *luc* 遺伝子をトランスフェクションし生物発光をモニタリングした。RS182 は *mPer1-Luc* が導入されていたため、GT1-7、N14.5 に対して *mPer2-dLuc* をトランスフェクションした。安定発現株を培養系ルシフェラーゼによる生物発光をリアルタイムで計測し、麻酔薬投与の有無で比較検討した。

【結果】

GT1-7 と N14.5 細胞に安定的に *dLuc* 遺伝子を発現する GT1-7:6D3 と N14.5:4B8.1 を樹立した。また、その2つに加え RS182 を用いた生物発光測定では3細胞株はいずれも生物発光の概日リズムを認めた。*Sevoflurane* 投与では GT1-7:6D3 が応答し生物発光が可逆的に減少した。ただし、この生物発光の抑制は飢餓培地を使用し神経細胞様の形態に分化した場合でのみ認められ、増殖培地中の細胞の場合は認められなかった。N14.5:4B8.1、RS182 では *sevoflurane* による生物発光の抑制は認められなかった。

【考察】

先行研究の結果より *Per2* 発現の抑制は、脳における麻酔効果の生物学的マーカーとなりうる可能性があると考えていた。その抑制のメカニズムには *Per2* プロモータ領域でのヒス

トシアセチル化の阻害が一つにあることが明らかにされているが、さらに根本的な分子生物学的な研究のためには、均一な性質を持った細胞が大量に必要であると考えられる。今回の実験で使用した系では、一定の濃度で揮発性麻酔薬を cell line に投与し、持続的な生物発光をモニタリングすることで麻酔薬の作用をいち早く確認することが可能である。

GT1-7 を用いた麻酔薬投与の実験系で、増殖培地では GT1-7 の *Per2* 発現抑制は認められなかったことから、飢餓状態で GT1-7 は神経細胞様の特性を持ち麻酔応答する構造を会得する可能性が示唆される。RS182 と N14.5 はニューロン様の形態をとっていたにも関わらず *Per2* の発現抑制が認められず、麻酔応答に必要な構成要素が欠落していたと考える。また isoflurane を用いた実験では飢餓状態の GT1-7:6D3 において同様の発現抑制が認められており、共通の経路で麻酔に応答することが示唆されるが、これには増殖中の GT1-7 と飢餓培地中の GT1-7 とでの構成要素の比較検討が必要である。

また、sevoflurane が *Per2* 発現抑制を誘導する時計遺伝子 CLOCK の電気生理学的状態を変化させることが明らかになっている。細胞内のカルシウム濃度の変化や CLOCK リン酸化の状態が麻酔存在下の変化が今後の検討事項である。

今回の実験では GT1-7:6D3 を用いた実験系を確立した。またこの実験系を用いて、GT1-7:6D3 において麻酔効果を得る場合は神経細胞様の特性を持つ必要があることが示唆された。本研究が端緒となり、麻酔薬の分子的作用メカニズムを解明し、麻酔薬が生体を与える影響に関する研究が発展することで、麻酔による合併症を回避し安全な麻酔を行うための重要な知見へとつながると確信している。