

## 論文審査の結果の要旨

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

#### 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 vol. 620, pp.163-168, 2016 掲載

吸入麻酔薬であるセボフルラン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や標的分子は未解明である。我々の研究グループでは、セボフルランによる全身麻酔が、様々な器官での時計遺伝子発現に影響を与え、特に視交叉上核における概日リズムの中核となる Period2 (*Per2*) 遺伝子発現を可逆的に抑制することを見いだした。一方、これらの知見は、*in vivo* の実験系や組織切片培養を用いた研究からの結果であり、さらなる麻酔の分子生物学的作用機序の解明には性質の変わらない均一な細胞を大量に用いた実験系が必要と考え、申請者は、既知の神経系 cell line を用いた *in vitro* での実験系の確立を検討した。

2つのステップの実験を構成した。一つは細胞培養装置を安定した温度設定と二酸化炭素ならびに麻酔薬濃度を一定にして暗箱内に送気する構造に改良し、持続的な cell line の培養と揮発性麻酔薬の投与が可能な実験系の確立を行った。もう一つのステップにおいて、cell line に *Luc* 遺伝子を安定的に導入し生物学的発光をモニタリングすることにより、*mPer2* のプロモータ下に *dLuc* を発現し、麻酔薬に応答する培養細胞株を確立する検討を行った。Cell line は時計遺伝子の周期的発現が確認されている 3つの系、マウス視床下部由来の GT1-7、ラット視交叉上核由来の RS182 と N14.5 を使用したが、いずれも生物発光の概日リズムを認めた。セボフルラン投与では、血清飢餓培地を使用した GT1-7 のみが応答し生物発光が可逆的に減少した。このことは、GT1-7 では血清飢餓状態において神経細胞様の特性を持ち麻酔応答する構造を得る状態に分化誘導される可能性が示唆され、一方で、神経細胞様の形態を持つ RS182 と N14.5 では、麻酔による *Per2* 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ことを示唆した。結果として本研究では GT1-7 を用いた *in vitro* での麻酔メカニズムを解析する実験系を確立した。

第二次審査における議論として、実験系における工夫、3つの cell line を選んだ理由、視交叉上核の細胞構成、1つの cell line のみが麻酔薬に反応した理由、日内変動遺伝子への影響による臨床的意義、具体的な今後の研究展望等につき幅広い質疑が行われたが、いずれも適切な応答がなされた。

本研究は *in vivo* および切片培養を用いた研究で得られた知見をさらに発展させ、*in vitro* で麻酔の分子生物学的機序を解析する実験系を確立したものであり、麻酔薬が生体に与える影響に関する研究が飛躍的に発展することが期待され、今後の研究の方向性を示した有意義な研究であるという結論がなされた。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。