

学位論文題名

胚性腫細胞株 P19EC 細胞の静脈麻酔薬による 細胞死に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 緒言

静脈内に薬物を投与して麻酔状態を得る方法を静脈麻酔法といい、このときに用いられる薬剤を静脈麻酔薬という。バルビツレート、ベンゾジアゼピン誘導体、propofol などの一部の静脈麻酔薬には何らかの脳保護作用があることが報告される一方、propofol, ketamine などの静脈麻酔薬は細胞死を引き起こすことが報告されているが、その詳細は不明な部分も多い。

そこで静脈麻酔薬の神経細胞死に対する作用を調べることを目的として、胚性腫細胞株 P19EC 細胞に対する propofol, pentobarbital および ketamine の作用を調べた。また P19EC 細胞が神経細胞に分化することにより、細胞膜の膜構造が変化するという報告があることから、静脈麻酔薬の作用が細胞分化によりどのような影響を受けるかも検討した。

II. 材料および方法

静脈麻酔薬として 2,6-diisopropyl phenol (propofol), 5-ethyl-5-[1-methylbutyl]-2,4,6-trioxohexahydropyrimidine (pentobarbital) および 2-[2-chlorophenyl]-2-[methylamino]-cyclohexanone (ketamine) を使用した。

神経系細胞のモデルとしてマウスの胚性腫細胞株 P19EC 細胞を使用し、10%牛胎仔血清を添加した α -MEM を用い、5% CO₂-95%空気下 (37°C) で通法により培養した。また、P19EC 細胞の神経細胞への分化は、McBurney らの方法に基づいて行った。

まず、静脈麻酔薬による細胞死を確認するために、麻酔薬作用後の細胞内 ATP 量の測定を行った。P19EC 細胞を 96 穴プレートで培養し、pentobarbital と ketamine は α -MEM に溶解し、propofol は懸濁して作用させた。最終濃度は、それぞれ、0.08~2.00 mM, 0.146~3.645 mM, 0.046~0.927 mM とした。麻酔薬添加後 24, 48, 72 時間後に ViaLight[®] Plus Kit, Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタを用いて細胞内 ATP 量の測定を行った。

次に細胞死の様式を調べるために、DNA 断片化の確認、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH) 活性の測定、caspase3/7 活性の測定を行った。培養した細胞に 0.7 mM propofol, 0.5 mM pentobarbital および 0.9 mM ketamine を 24 時間作用させた後に、DNAzol[®]を用いて DNA を回収、臭化エチジウム含有 1%アガロースゲルで電気泳動を行って DNA を確認した。また、P19EC 細胞を蛍光測定用 96 穴プレートに播種し、前述と同様な条件下で培養。培養2日目に 0.7 mM propofol,

0.5 mM pentobarbital あるいは 0.9 mM ketamine を細胞に 0, 1, 3, 6 時間作用させた後, CytoTox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Assay により LDH 活性を測定した. Caspase3/7 活性は LDH 活性の測定と同様の条件下で, P19EC 細胞を発光測定用 96 穴プレートに培養し, Caspase-Glo™3/7 Assay を用いて測定した.

最後にアポトーシスの経路を調べるために活性酸素種(reactive oxygen species :ROS)の測定と, 前初期遺伝子 (*c-fos*, *c-jun*) の mRNA 発現を確認した. 前述と同様な条件下で P19EC 細胞を発光測定用 96 穴プレートに培養し, aminophenyl fluorescein (APF) を用いて ROS に属するヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$), パーオキシナイトライト(ONOO^-)及び次亜塩素イオン(OCl^-)の測定を行った. また前初期遺伝子は前述と同様な条件下で麻酔薬を 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 および 24 時間作用させ, 全 RNA を抽出, cDNA 合成後, RT-PCR 法により得られた増幅産物を臭化エチジウム含有 1%アガロースゲルを用いて電気泳動し, 確認した.

統計学的検定には paired t-test を用い, 5%以下の危険率で有意差ありとした.

III. 結果と考察

P19EC 細胞に静脈麻酔薬を作用させると, propofol, pentobarbital, ketamine のいずれの麻酔薬においても麻酔薬の濃度および時間に依存した細胞内 ATP 量の減少が観察された. レチノイン酸非作用群では, 24 時間後に細胞が 50 %減少する麻酔薬の濃度 ($C_{0.5}$) は, propofol, pentobarbital, ketamine ではそれぞれ 0.7 mM, 0.5 mM, 0.9 mM 程度であった.

レチノイン酸作用後, 細胞の形態は線維芽細胞様から初代培養の神経細胞に類似した形態に変化した. また, $C_{0.5}$ は propofol, pentobarbital, ketamine の順に 0.9 mM, 1.1 mM, 2.1 mM と増加した. 以上の結果から神経細胞へ分化することによって静脈麻酔薬による細胞死に対する抵抗性が増大することが明らかになった. これは神経細胞に分化することによってレセプターの発現などに変化が生じて, 麻酔薬に対する感受性が低下した可能性が考えられる. また, pentobarbital と ketamine の $C_{0.5}$ (0.5 mM 及び 0.9 mM) はマウスにおける 50%致死の腹腔内濃度 (pentobarbital の LD_{50} =0.4 mM 及び ketamine の LD_{50} =0.73 mM) に類似していることから, 静脈麻酔薬の有害作用を調べる有用なモデルとして P19EC 細胞を用いことが可能だと考えられた.

静脈麻酔薬作用 24 時間後の DNA を電気泳動すると, 全ての麻酔薬において DNA の梯子状(ラダー)パターンが認められた. また全ての麻酔薬で LDH 活性を基に計算した細胞障害率は, 統計的に有意な変化はなかった. 一方, caspase3/7 活性は経時的な上昇を認めた. 以上の結果から本研究で認められた静脈麻酔薬による細胞死の様式はアポトーシスであると推測された.

神経細胞における caspase 活性化の機序として, ROS 産生, *c-fos*, *c-jun* などの前初期遺伝子の発現などが考えられている. 今回用いた麻酔薬を P19EC 細胞に作用させても ROS 産生の増加は観察されなかった. よって, アポトーシスに ROS 産生は関与していないか, 仮に関与があるとしても APF で検出しないスーパーオキシドか過酸化水素であることが考えられた. また, 種々のストレスによるアポトーシスの誘導においてシグナルの伝達に関与する MAP (mitogen-activated protein)キナーゼ経路に, *c-fos* あるいは *c-jun* を介するものがある. 本研究においては静脈麻酔薬を P19EC 細胞に作用させても, *c-fos* 及び *c-jun* の発現に変化は認められなかったことから, アポトーシスの誘導にこの経路は関与していないものと推測された.

IV. 結論

高濃度の静脈麻酔薬は、神経細胞にアポトーシスによる細胞死を引き起こすこと及び未分化の細胞の方が感受性が高いことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 島 和 昭

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

胚性腫細胞株 P19EC 細胞の静脈麻酔薬による 細胞死に関する研究

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

propofol, ketamine などの静脈麻酔薬は細胞死を引き起こすことが報告されているが、その詳細は不明な部分も多い。そこで静脈麻酔薬の神経細胞死に対する作用を調べることを目的として、胚性腫細胞株 P19EC 細胞に対する propofol, pentobarbital および ketamine の作用を調べた。また P19EC 細胞が神経細胞に分化することにより、細胞膜の膜構造が変化するという報告があることから、静脈麻酔薬の作用が細胞分化によりどのような影響を受けるかも検討した。

静脈麻酔薬として propofol, pentobarbital および ketamine を使用した。神経系細胞のモデルとしてマウスの胚性腫細胞株 P19EC 細胞を使用した。また、P19EC 細胞の神経細胞への分化は、McBurney らの方法に基づいて行った。

まず、静脈麻酔薬による細胞死を確認するために、麻酔薬作用後の細胞内 ATP 量の測定を行った。pentobarbital と ketamine は α -MEM に溶解し、propofol は懸濁して作用させた。最終濃度は、それぞれ、0.08～2.00 mM, 0.146～3.645 mM, 0.046～0.927mM とした。麻酔薬添加後 24, 48, 72 時間後に細胞内 ATP 量の測定を行った。

次に細胞死の様式を調べるために、DNA 断片化の確認、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase:LDH) 活性の測定、caspase3/7 活性の測定を行った。培養した細胞に 0.7 mM propofol, 0.5 mM pentobarbital および 0.9 mM ketamine を 24 時間作用させた後に、DNA を回収、臭化エチジウム含有 1%アガロースゲルで電気泳動を行って DNA を確認した。また、P19EC 細胞を蛍光測定用 96 穴プレートに播種し、前述と同様な条件下で培養し、0.7 mM propofol, 0.5 mM pentobarbital あるいは 0.9 mM ketamine を細胞に 0, 1, 3, 6 時間作用させた後、LDH 活性を測定した。Caspase3/7 活性は LDH 活性の測定と同様の条件下で培養し、測定した。

最後にアポトーシスの経路を調べるために活性酸素種 (reactive oxygen species :ROS) の測定と、前初期遺伝子 (*c-fos*, *c-jun*) の mRNA 発現を確認した。前述と同様な条件下で麻酔薬を作用

させ、ROS に属するヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)、パーオキシナイトライト(ONOO^-)及び次亜塩素イオン(OCl^-)の測定を行った。また前述と同様な条件下で麻酔薬を作用させ、全 RNA を抽出、cDNA 合成後、RT-PCR 法により得られた増幅産物を臭化エチジウム含有 1%アガロースゲルを用いて電気泳動して前初期遺伝子を確認した。

P19EC 細胞に静脈麻酔薬を作用させると、propofol, pentobarbital, ketamine のいずれの麻酔薬においても麻酔薬の濃度および時間に依存した細胞内 ATP 量の減少が観察された。レチノイン酸非作用群では、24 時間後に細胞が 50 %減少する麻酔薬の濃度($\text{C}_{0.5}$)は、propofol, pentobarbital, ketamine ではそれぞれ 0.7 mM, 0.5 mM, 0.9 mM 程度であったのに対し、レチノイン酸作用後は 0.9 mM, 1.1 mM, 2.1 mM と増加した。以上の結果から神経細胞へ分化することによって静脈麻酔薬による細胞死に対する抵抗性が增大することが明らかになった。これは神経細胞に分化することによってレセプターの発現などに変化が生じて、麻酔薬に対する感受性が低下した可能性が考えられる。また、pentobarbital と ketamine の $\text{C}_{0.5}$ はマウスにおける 50%致死の腹腔内濃度に類似していることから、静脈麻酔薬の有害作用を調べる有用なモデルとして P19EC 細胞を用いことが可能だと考えられた。

静脈麻酔薬作用後の DNA を電気泳動すると、全ての麻酔薬において DNA の梯子状 (ラダー) パターンが認められた。また全ての麻酔薬で LDH 活性を基に計算した細胞障害率に変化はなく、caspase3/7 活性は経時的な上昇を認めたことから、本研究で認められた静脈麻酔薬による細胞死の様式はアポトーシスであると推測された。

神経細胞における caspase 活性化の機序として、ROS 産生、*c-fos*, *c-jun* などの前初期遺伝子の発現などが考えられている。今回用いた麻酔薬を P19EC 細胞に作用させても ROS 産生の増加や、*c-fos* 及び *c-jun* の発現に変化は認められなかったことから、アポトーシスの誘導にこの経路は関与していないものと推測された。

以上より、高濃度の静脈麻酔薬は神経細胞にアポトーシスによる細胞死を引き起こすこと、及び未分化の細胞の方が感受性が高いことが明らかになった。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1) *c-fos*, *c-jun* を調べた理由、2) 細胞内 ATP 量と生存細胞数の相関、3) 全身麻酔薬の作用機序、4) 分化後の細胞では細胞死に対する抵抗性が增大する理由、5) 麻酔薬の脳保護作用の機序等であった。これらの質問に対して申請者から適切な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、静脈麻酔薬が神経細胞に対してアポトーシスを誘導することを示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。本研究業績は博士 (歯学) の学位に値するものと認められた。