

学位申請論文

Syntaxin 1A ノックアウトマウスにおけるセボフルランの脊髄後角興奮性シナプス伝達に対する作用の減弱

獨協医科大学 麻酔科学

國分 伸一

要 旨 神経伝達物質の放出を調節する開口放出関連タンパクである syntaxin 1A のセボフルランの鎮痛機序への影響を解明するために, syntaxin 1A ノックアウトマウス (KO) および野生型マウス (WT) を用いてセボフルランの最小肺胞濃度および脊髄後角表層の微小興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) を測定した. セボフルランの最小肺胞濃度は WT 群の $3.36 \pm 0.005\%$ (mean \pm S.D.) と比較して KO 群では $3.51 \pm 0.038\%$ と有意に高かった ($p < 0.05$). セボフルラン投与により WT 群 (0.34 ± 0.08) および KO 群 (0.41 ± 0.05) の両群で mEPSCs の発生頻度の減少を認めたが, KO 群に比して WT 群では有意な減少を示した ($p < 0.05$). WT 群, KO 群ともにセボフルランの投与によって mEPSCs の振幅に有意な変化はみられなかった. 以上の結果から, セボフルランの興奮性シナプス伝達におけるシナプス前性抑制に syntaxin 1A が関与している可能性が示唆された.

Key Words : syntaxin 1A, セボフルラン, 脊髄, パッチクランプ・ホールセル記録, 微小興奮性シナプス後電流

緒 言

Syntaxin 1A は神経に存在する soluble NSF attachment protein receptor (SNARE) タンパク質の1つとして知られており, シナプス小胞からの神経伝達物質の放出を調節している^{1,2)}. そして, syntaxin 1A ノックアウトマウス (KO マウス) では海馬の長期増強が減弱していることが報告され, シナプスの可塑性における syntaxin 1A の関与が示唆されている³⁾. さらに, syntaxin 1A の欠損によって疼痛域値の上昇, シナプス伝達の変化や末梢神経損傷による syntaxin 1A の変化が引き起こされることが実験的に証明されている^{4,5)}. これらの報告はいずれも syntaxin 1A が侵害刺激における興奮性シナプス伝達に何らかの影響を与えていることを強く示唆するものである.

一方, 日常の臨床で古くから使用されているハロセン, エンフルラン, イソフルラン, セボフルランなどの揮発

性吸入麻酔薬は鎮静, 鎮痛, 健忘といった作用を併せ持ち, その作用機序の詳細はいまだに不明な点が多いとされているが, 近年, GABA_A あるいはグリシンなどの抑制性シナプス伝達への関与や, 興奮性シナプス伝達に対する抑制作用などがいくつかの研究から推測されている^{6,7)}.

これらの報告に基づくと, 揮発性吸入麻酔薬が syntaxin 1A の神経伝達物質放出の調整に影響を与えている仮説を立てることは妥当なものと考えられた. したがって, 本研究では, 揮発性吸入麻酔薬の作用機序を解明する目的で, 臨床で最も使用されているセボフルランの鎮痛作用における脊髄での興奮性シナプス伝達への syntaxin 1A の関与について検討を行った.

方 法

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て行った.

1. 対 象

本研究では, 生後6から8週の C57BL/6J 雄性的 WT マウス (syn1A^{+/+}) および KO マウス (syn1A^{-/-}) を使用した. 遺伝子型はポリメラーゼ鎖増幅反

平成24年11月26日受付, 平成24年12月6日受理
別刷請求先: 國分伸一

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 麻酔科学

応 (polymerase chain reaction, PCR) 法によって確認した. 本研究では WT マウス 7 匹 (WT 群, $n=9$) と KO マウス (KO 群, $n=9$) を用いて行った.

2. 行動学的評価

マウスのセボフルランの最小肺胞濃度 (minimum alveolar concentration, MAC) を調べる目的でセボフルラン投与下でのテールクランプ試験を行った⁸⁾. MAC は 1 気圧下において, 吸入麻酔薬により動物の半数 (50%) を不動化させるのに必要な肺胞内における吸入麻酔薬の濃度であり, 本研究ではマウスをプラスチック容器に留置し, 1.5% から 5% までセボフルラン濃度を 0.5% 毎に上昇させて曝露し, 各濃度で 20 分間平衡を保った状態で, 尾の中央部分をクリップで 1 分間に 10 回クランプした. さらに, 4.75% から 1.75% までセボフルラン濃度を 0.5% 毎に低下させ, 同様にクランプし, 頭部や四肢, 体幹に動きがあった回数を測定した. そして, この結果を Hill の式に代入し, 体動が 5 回となった濃度, すなわち 50% 効果濃度 (EC_{50}) を 1MAC として算出した⁹⁾.

3. 電気生理学的評価

1) スライス標本の作製

ペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔下に椎弓切除を施行, 脊髄の腰膨大部を摘出した. 取り出した脊髄は, 直ちに 95% O_2 , 5% CO_2 で飽和した 4°C の氷冷リンゲル液 (組成: NaCl, 113 mM; KCl, 3 mM; $NaHCO_3$, 25 mM; NaH_2PO_4 , 1 mM; $CaCl_2$, 2 mM; $MgCl_2$, 1 mM; D-glucose, 11 mM; pH: 7.4) に浸し, スライサー (Microslicer[®], D.S.K., Japan) を用いて厚さ 350~450 μ m の脊髄スライス標本作製した.

2) マイクロピペット電極管の作製

マイクロピペット電極管は, マイクロピペット作製装置 (P-97; Sutter Instrument, USA) により作製し, KOH により pH を 7.4 とした電極液 (K gluconate 123 mM; KCL, 14 mM, Na gluconate, 2 mM; ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 1 mM; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine Ethanesulfonic acid (HEPES), 10 mM) を充填した. 測定されたマイクロピペット電極管の直列抵抗は 5 から 10 M Ω であった. アクセス抵抗は 11 から 20 M Ω にて常に確認し, 直列抵抗に 10% 以上の変化が起きた際のデータは全て除外した.

3) ホールセル・パッチクランプ記録

顕微鏡のステージ上で脊髄スライス標本を持続的にリ

ンゲル液で灌流させながらパッチクランプ・ホールセル記録を行った. 顕微鏡には近赤外線微分干渉顕微鏡 (Axioskop FS; Zeiss, Germany) を用い, 光学 CCD カメラ (IR-CCD2741; Hamamatsu Photonics, Japan) を接続して脊髄スライス標本を映像化した. パッチクランプ・ホールセル記録は脊髄後角表層レクセドの第 II~III 層内の直径 10 から 20 μ m の神経細胞から行った. 微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs) はパッチクランプ増幅器 (Axopatch 200B; Axon Instruments, USA) を用いた voltage-clamp mode 下 (膜電位を -70 mV に固定) に, デジタル変換記録装置 (Digidata 1230 interface; Molecular Devices, USA) を使用して 10.0 kHz の頻度でコンピュータに記録した.

mEPSCs はリンゲル液へのセボフルラン投与前に 5 分間, 投与中に 10 分間, 投与終了後に 10 分間, 合計 25 分間記録した. セボフルランの投与は気化器にて 0.75 mM のセボフルランを溶解させたリンゲル液に灌流液を切り替えることで行った. セボフルランの溶解濃度は, クロロホルムを溶媒として液-液抽出による前処理を行った後, ガスクロマトグラフィーを用いて測定した. リンゲル液にはテトロドトキシン (0.3 μ M; San-kyo, Japan) を加えることにより活動電位を, グリシン受容体アンタゴニストであるストリキニン (1-2 μ M; Sigma, U.S.A.), GABA_A 受容体アンタゴニストであるビククリン (10 μ M; Biomol International, U.S.A.) を加えることにより抑制性シナプス入力を遮断した.

得られた記録は, 解析ソフト (pCLAMP 9.2; Molecular Devices, USA, Mini-Analysis 6.0.7; Synaptosoft, USA) を用いて処理を行った.

4. 統計解析

断りのない限り, 全ての結果は平均値 \pm 標準偏差で示し, 各パラメータの平均値間の比較はステューデント *t* 検定を用いて行った. また Hill の式 (Hill Equation: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log}EC_{50} - X) * \text{hill Slope}))}$) に最小二乗法を用いて EC_{50} を算出した. mEPSCs の頻度及び振幅における KO マウスと WT マウス間の比較には二元配置分散分析法 (two-way analysis of variance, two-way ANOVA) を用いて検討した. 統計処理は統計ソフト Prism 5 (Graph Pad, U.S.A.) を使用し, 統計的有意水準は $p < 0.05$ とした.

結 果

1. 行動学的評価

テールクランプ試験において測定された WT マウス

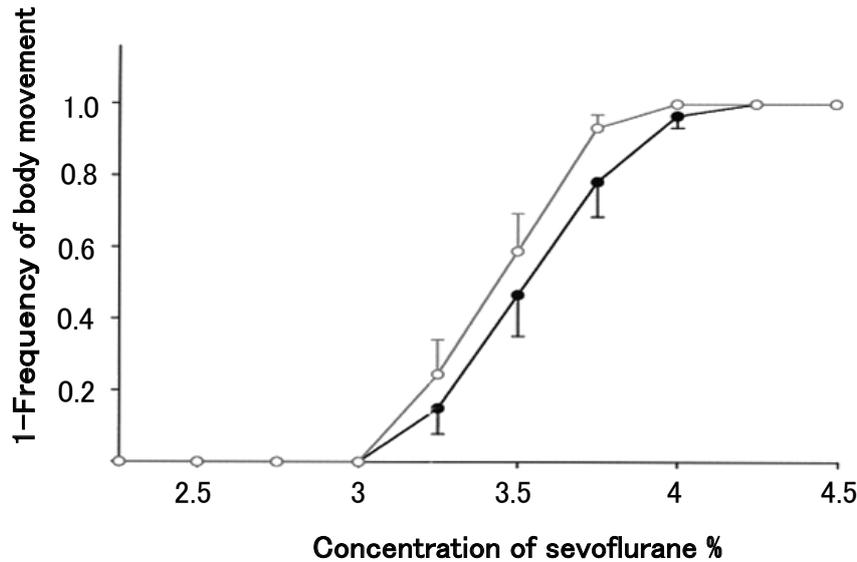


図1 セボフルラン投与下のマウスのテールクランプ試験

縦軸はテールクランプに対する体動を示し、1に近いほど体動が少ないことを示す。横軸はセボフルラン濃度 (%) を示す。KO群の最小肺胞濃度 (MAC) はWT群に比べ高かった。(○: WT群, ●: KO群)

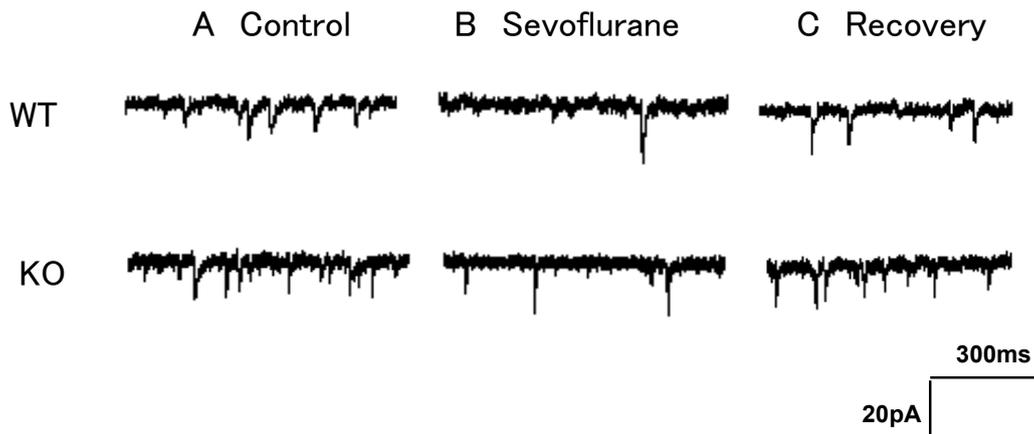


図2 パッチクランプ・ホールセル法により記録されたmEPSCsの1例

WT群およびKO群の両群のニューロンでセボフルラン灌流前のコントロール (A) と比較してセボフルランの灌流 (B) によってmEPSCsの発生頻度が減少し、さらにセボフルラン灌流を中止 (C) するとその頻度は回復した。

のセボフルランのMACは $3.36 \pm 0.005\%$ 、KOマウスのセボフルランのMACは $3.51 \pm 0.038\%$ であり、KOマウスのMACはWTマウスに比べ有意に高かった ($p < 0.05$) (図1)。

2. 電気生理学的評価

図2にWT群およびKO群のセボフルラン0.75mM灌流前後の脊髄後角表層ニューロンにおけるmEPSCsの実例を示す。

両群ともにセボフルラン0.75mM灌流中にmEPSCs

の発生頻度はセボフルラン0.75mM灌流前に比して有意に減少したが ($p < 0.05$)、投与中止によって回復した (図3)。一方、セボフルラン0.75mM灌流によるmEPSCsの振幅の変化は両マウスとも灌流前、灌流中、灌流後で有意な差は認められなかった (図4)。

WT群 ($n=7$, 0.34 ± 0.08) におけるmEPSCsの発生頻度はKO群 ($n=7$, 0.44 ± 0.05 , $p < 0.05$) に比べ有意に減少したが、mEPSCsの振幅の変化には有意差がみられなかった (図2-5)。

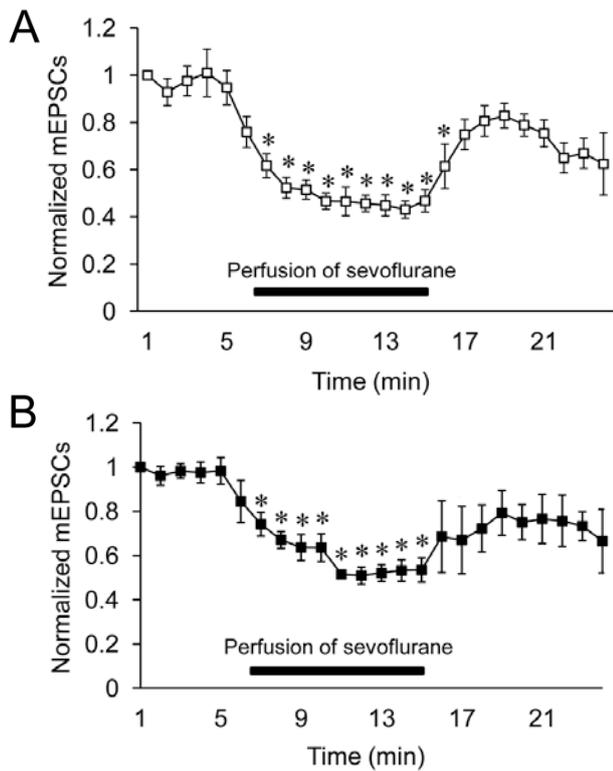


図3 セボフルラン灌流下における脊髄後角表層ニューロンの mEPSCs 発生頻度 (normalized frequency of mEPSCs) の変化

縦軸は記録開始1分間の記録を基準とした mEPSCs の発生頻度, 横軸は時間経過 (min) を示す. セボフルラン灌流 (6-15 min) により WT 群, KO 群の両群で mEPSCs の発生頻度は灌流前に比べ減少したが (* $P < 0.05$), 灌流中止でその頻度は回復した. (□: WT 群, ■: KO 群)

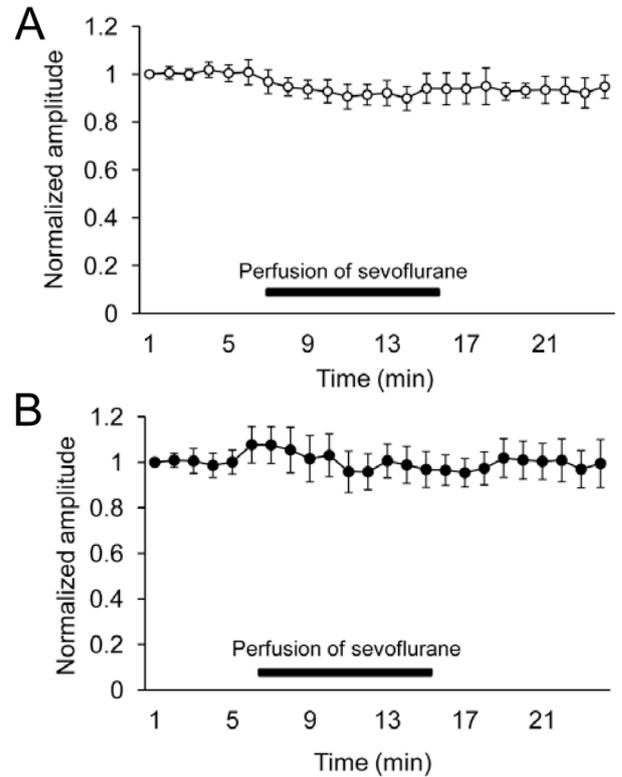


図4 セボフルラン灌流下における脊髄後角表層ニューロンの mEPSCs 振幅 (normalized amplitude of mEPSCs) の変化

縦軸は記録開始1分間の記録を基準とした mEPSCs の振幅を, 横軸は時間経過 (min) を示す. セボフルラン灌流下で WT 群, KO 群の両群で mEPSCs 振幅の有意な変化はみられなかった. (○: WT 群, ●: KO 群)

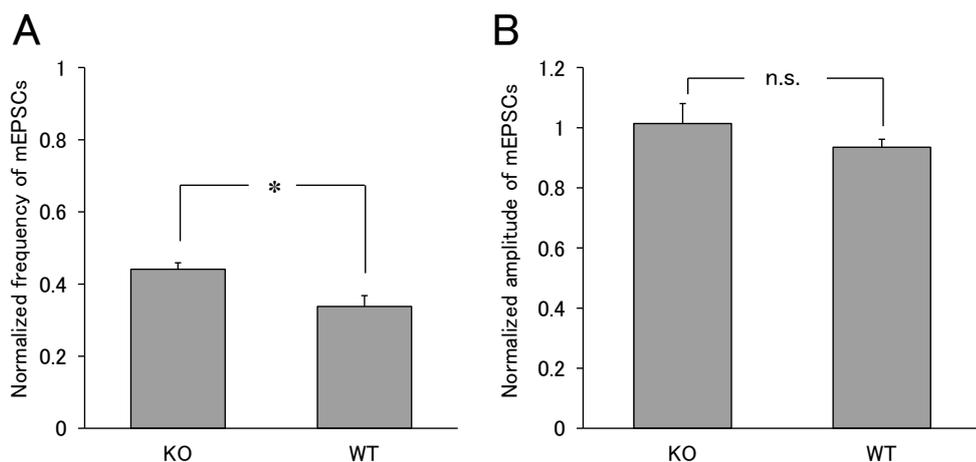


図5 セボフルラン灌流中の WT と KO における mEPSCs の発生頻度 (normalized frequency of mEPSCs) と振幅 (normalized amplitude of mEPSCs) の比較

セボフルラン灌流中の脊髄後角表層ニューロン mEPSCs の発生頻度は WT 群に比して KO 群で有意に多かった (* $P < 0.05$, $n = 7$) (A). しかし, mEPSCs の振幅は両群で有意差はみられなかった (B).

考 察

SNARE タンパク質の一種である syntaxin 1A は神経細胞軸索や内分泌細胞に発現し、細胞内輸送系において分泌小胞と形質膜の間で膜の結合過程と融合過程を仲介することによって神経伝達物質やホルモンの開口、放出を制御していることが知られている^{1,2,10}。そして、近年ではこれらの SNARE タンパク質が痛みによる脊髄や末梢神経での様々な形態的あるいは機能的変化に関与していることが明らかにされつつある。Yamaguchi ら¹¹ は、脊髄神経節における神経細胞軸索の神経発芽や延長、樹状突起の変化などには syntaxin 1A が関与していることを明らかにしており、藤原ら³ は KO マウスではこれらの SNARE タンパク質がシナプスの可塑性に関与していることを報告している。これらの報告によると、syntaxin 1A が侵害受容における脊髄後角シナプス伝達の変化に関与していることは明らかであり、本研究では臨床で広く使用されている揮発性吸入麻酔薬であるセボフルランの鎮痛効果と syntaxin 1A の関係に興味を持たれることも明白であるため、われわれは KO マウスの侵害受容行動や脊髄スライス標本における mEPSCs へのセボフルランへの影響について研究を行った。

本研究では、侵害受容行動を評価する目的でテールクランプ試験を用いて KO マウスと WT マウスのセボフルランの MAC を比較したところ、WT マウスに比べ KO マウスでは MAC は有意に大きいものであった。このことから syntaxin 1A の阻害が生じるとセボフルランの鎮痛効果は減弱することが推測され、syntaxin 1A がセボフルランの鎮痛作用の発現に関与していることが示唆された。

さらに、これらの鎮痛機序をより明らかにするために脊髄スライス標本を用いてパッチクランプ・ホールセル記録でセボフルラン灌流前後の mEPSCs の変化を両群で比較した結果、セボフルラン灌流中の mEPSCs は両群において振幅の変化には有意な差はなかったため、セボフルランは脊髄においてシナプス前性に作用することでその鎮痛作用を発現し、シナプス後性の鎮痛作用を持たない可能性が示された。一方、両群のセボフルラン灌流による mEPSCs の発生頻度の減少について比較した結果、KO 群に比して WT 群では mEPSCs の発生頻度は有意に少なく、セボフルランの鎮痛作用はシナプス後性ではなくグルタミン酸などの興奮性神経伝達物質のシナプス前終末端からの放出を抑制するシナプス前性の機序であるという推測に達した。

本研究で明らかになった KO マウスの侵害受容に対するセボフルラン作用の減弱、およびセボフルランによる

興奮性シナプス伝達抑制の減弱は Takasusuki ら⁴ による末梢神経損傷後の脊髄後角表層の mEPSCs の発生頻度を観察した研究において、syntaxin 1A の欠損は侵害受容による興奮性シナプス伝達をシナプス前性に促進させ、さらに疼痛域値を低下させるという結果と矛盾しない。すなわち syntaxin 1A は脊髄においてシナプス前性の鎮痛作用に重要な役割を果たしており、セボフルランが脊髄後角表層の syntaxin 1A に影響を及ぼしていることを強く示唆するものである。

セボフルランやイソフルランなどの吸入麻酔薬の作用部位、作用機序はまだ解明されていないが、一般に吸入麻酔薬は中枢神経の広範囲においてシナプス伝達の遮断を行い、軸索あるいはシナプス領域において興奮性及び抑制性シナプスの抑制や増強がシナプス前及びシナプス後性に起こるとされている¹²。しかし、脊髄におけるシナプス伝達に対する作用機序に関しては議論の余地があり、Cheng ら¹³ や Wakai ら¹⁴ は吸入麻酔薬がシナプス後性に作用したと報告しているが、Haseneder¹⁵ らは吸入麻酔薬がシナプス前性に作用するという異なる機序の報告をしているため、今後のさらなる研究が必要であると考えられた。

多くの全身麻酔薬は抑制性シナプス成分、特に GABA_A に対する作用が主な作用機序と考えられ、セボフルラン同様に全身麻酔薬として頻用されている静脈麻酔薬のプロポフォールはシナプス内外における GABA_A 受容体への結合と活性化による抑制電流の発生と考えられている¹⁶。一方、吸入麻酔薬については GABA_A やグリシンなどの抑制性シナプスへの作用^{6,7}、海馬での NMDA 受容体や AMPA 受容体への作用^{17,18}、運動ニューロンへの影響^{13,19} を示した研究などがあり、その作用機序については依然として統一された見解が得られていない。これらの作用機序は非常に複雑であり、セボフルランの作用機序を脊髄の興奮性シナプス伝達だけで議論することは困難であり、セボフルランの麻酔作用ではさらに多角的な作用機序の検討を行う必要がある。しかし、本研究と以前の研究の結果から、セボフルランの作用機序に脊髄後角表層の syntaxin 1A が関与していることは明白であり、臨床で多く経験する吸入麻酔薬の麻酔効果の個体差に syntaxin 1A などの SNARE タンパク質の発現量が関与している可能性も考えられ、今後もセボフルランの syntaxin 1A への影響に関する研究を行う意義は十分に残されていると考えられた。

結 論

本研究ではセボフルランの鎮痛機序における syntaxin 1A の役割について調べた。Syntaxin 1A ノックアウト

トマウスではセボフルランの MAC が増加し、この変化はシナプス前性の機序で起こることから、syntaxin 1A は脊髄における侵害受容性シナプス伝達においてシナプス前性に影響を与えることが考えられた。

謝 辞 稿を終えるにあたり、ご指導賜りました獨協医科大学生理学（生体情報）教室、堀雄一教授と福島央之先生、麻酔科学講座、山口重樹教授と高薄敏史先生をはじめ、御協力賜りました先生方一同に感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 赤川公朗：ニューロサイエンスの仮説 神経伝達を制御する syntaxin 1A/HPC-1 と記憶. 脳の科学 **252** : 177-181, 2003.
- 2) Sudhof TC : The synaptic vesicle cycle. *Ann Rev Neurosci* **27** : 509-547, 2004.
- 3) Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, et al : Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *J Neurosci* **26** : 5767-5776, 2006.
- 4) Takasusuki T, Fujiwara T, Yamaguchi S, et al : Enhancement of synaptic transmission and nociceptive behaviour in HPC-1/syntaxin 1A knockout mice following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* **26** : 2179-2187, 2007.
- 5) Fukushima T, Takasusuki T, Tomitori H, et al : Possible involvement of syntaxin 1A downregulation in the late phase of allodynia induced by peripheral nerve injury. *Neuroscience* **175** : 344-357, 2011.
- 6) de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, et al : Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology* **92** : 1055-1066, 2000.
- 7) Downie DL, Hall AC, Lieb WR, et al : Effects of inhalational general anaesthetics on native glycine receptors in rat medullary neurons and recombinant glycine receptors in *Xenopus oocytes*. *Br J Pharmacol* **118** : 493-502, 1996.
- 8) Rampil IJ : Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats. *Anesthesiology* **80** : 606-610, 1994.
- 9) Barakat AR, Schreiber MN, Flaschar J, Georgieff M, Schraag S : The effective concentration 50 (EC50) for propofol with 70% xenon versus 70% nitrous oxide. *Anesth Analg* **106** : 823-829, 2008
- 10) Jahn R, Scheller RH : SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7** : 631-643, 2006.
- 11) Yamaguchi K, Nakayama T, Fujiwara T, et al : Enhancement of neurite-sprouting by suppression of HPC-1/syntaxin 1A activity in cultured vertebrate nerve cells. *Brain Res* **740** : 185-192, 1996.
- 12) Koblin DD : Mechanisms of Action. In *Anesthesia*. ed by Miller RD. Churchill Livingstone, New York, pp67-100, 1994.
- 13) Cheng G, Kendig JJ : Enflurane decreases glutamate neurotransmission to spinal cord motor neurons by both pre- and postsynaptic actions. *Anesth Analg* **96** : 1354-1359, 2003.
- 14) Wakai A, Kohno T, Yamakura T, et al : Action of isoflurane on the substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *Anesthesiology* **102** : 379-386, 2005.
- 15) Haseneder R, Kurz J, Dodt HU, et al : Isoflurane reduces glutamatergic transmission in neurons in the spinal cord superficial dorsal horn : evidence for a pre-synaptic site of an analgesic action. *Anesth Analg* **98** : 1718-1723, 2004.
- 16) Ying SW, Goldstein PA : Propofol suppresses synaptic responsiveness of somatosensory relay neurons to excitatory input by potentiating GABA (A) receptor chloride channels. *Mol Pain* **1** : 2, 2005.
- 17) Nishikawa K, MacIver MB : Excitatory synaptic transmission mediated by NMDA receptors is more sensitive to isoflurane than are non-NMDA receptor-mediated responses. *Anesthesiology* **92** : 228-236, 2000.
- 18) McFarlane C, Warner DS, Todd MM, et al : AMPA receptor competitive antagonism reduces halothane MAC in rats. *Anesthesiology* **77** : 1165-1170, 1992.
- 19) Rampil IJ, King BS : Volatile anesthetics depress spinal motor neurons. *Anesthesiology* **85** : 129-134, 1996.