

題 目

発達期の脳における
ERK 経路阻害の影響に関する研究

湯舟 晋也

(麻酔・蘇生医学専攻)

防衛医科大学校 医学研究科

平成27年度

目 次

背 景		4 頁
第1章	MEK 阻害剤による ERK リン酸化阻害が、中枢神経におけるアポトーシス発現に与える影響の検討	
第 1 節	目 的	8 頁
第 2 節	方 法	8 頁
第 3 節	結 果	14 頁
第 4 節	考 察	17 頁
第 2 章	MEK 阻害剤による中枢神経毒性の電気生理学的検討	
第 1 節	目 的	19 頁
第 2 節	方 法	19 頁
第 3 節	結 果	22 頁
第 4 節	考 察	23 頁
第 3 章	MEK 阻害剤による中枢神経毒性の行動学的検討	
第 1 節	目 的	25 頁
第 2 節	方 法	25 頁
第 3 節	結 果	28 頁
第 4 節	考 察	30 頁
第 4 章	ノックアウトマウスにおけるアポトーシス発現経路の検討	

第1節	目的	32頁
第2節	方法	32頁
第3節	結果	33頁
第4節	考察	34頁
第5章	総括	36頁
第6章	結論	38頁
謝辞		39頁
附記		40頁
引用文献		42頁
図表及び解説		48頁

背景

臨界期とは、中枢神経が外界からの刺激などに高い感受性を示す一定の時期の事であり、この時期の学習や経験は神経回路の形成に大きく影響し、行動学的にもその影響は長期間持続することが知られている。外国語は臨界期に学習を開始する方がその習得が容易であることなどは既知の事実である。このように神経回路の形成は臨界期に起こる経験によって大きく影響される(1)。胎生期には、基本的な神経回路の形成は遺伝的なプログラムによって規定される。しかし出生の際には、神経回路はその目的とする神経細胞以外の余剰な神経細胞にもシナプス結合を行っているが、臨界期においては、神経細胞は外界からの刺激によって洗練され余計なシナプス結合は除外されていく(1)。臨界期は神経回路の整備の後に終了するが、その神経回路の形成を制御するメカニズムに関しては未だに明らかにされていない。

臨界期は学習に適した期間と考えることができる一方で、外界からの刺激に脆弱な時期でもある。臨界期における外界からの好ましくない刺激により、恒久的なあるいは不可逆的な影響を及ぼしうる。この時期に子猫の片眼を縫合し視覚刺激を遮断すると、視覚刺激の遮断解除後も解剖学的には異常がなくても視覚刺激を認識できなくなってしまうとする研究や(2)、また被虐待児に精神発達障害や学習障害が多く見られることも知られている(3)。動物において、臨界期に神経活動に影響を与える薬剤を投与

することにより、有害な影響を引き起こすことが知られている。例えば、齧歯類での研究では、N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体アンタゴニストであるエタノールや全身麻酔薬は、神経細胞死を引き起こす(4-6)。さらにこれらは、成長後に自閉症スペクトラム(ASD: Autistic spectrum disorders)に見られるような社会行動異常などの機能障害(7)を引き起こす可能性が報告された(6)。また発達期における全身麻酔薬への暴露が中枢神経において神経細胞死を引き起こし、そのメカニズムが細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK: Extracellular Signal-regulated Kinase)の活性化阻害にある可能性があり、この神経細胞死は ERK の活性化抑制に拮抗する薬剤であるリチウムによって減弱されるとする研究(8)や、ERK2 がノックダウンされたマウス(ERK2 ノックダウンマウス)は野生型マウスと比較し記憶や学習に異常があるとする報告もある(9)。

ERK はセリン/スレオニンキナーゼの一つである分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase)である。MAPK はリン酸化酵素の一つであり、特定のタンパク質を活性化させ、また、それ自体が活性化してリン酸化することにより核内へ移行することから細胞外シグナルを核内へ伝える機能を果たしていると考えられる。ERK は元来、細胞増殖シグナルに反応する因子として同定されたが、現在では細胞増殖以外の様々なシグナルも伝達していることがわかっている。

神経細胞では、ERK はその分化、機能発現において重要な役割を果たしている(10)。ERK2 を制御する *Erk2* 遺伝子が中枢神経において欠損したマウスにおいて、

ASDのような社会性に欠ける行動異常が報告されている(11)。しかしこのマウスモデルでは、中枢神経のみで標的遺伝子を破壊した条件特異的遺伝子破壊によるものであるため、臨界期における ERK の役割は明らかにされているとは言えない。

近年では、麻酔薬の中枢神経毒性に関して、齧歯類のみならず霊長類での研究も報告されている。全身麻酔薬である Isoflurane を生後6日目のアカゲザルに暴露させると中枢神経にアポトーシスを来すとする報告や(12)、胎生期あるいは生後間もないアカゲザルに全身麻酔薬である propofol に投与すると同様にアポトーシスを来すとする報告がある(13)。また発達期アカゲザルの ketamine 投与による、成長後の記憶、学習障害を指摘する報告もある(14)。

比較的早い時期から、小児麻酔による神経毒性の可能性は指摘されてきているが、ヒトを観察対象とした全身麻酔薬暴露の有無による前向き比較試験を実施することの倫理的困難さ、暴露後の成長過程における環境因子の差異の大きさなどから、ヒトでのデータはまだ十分とは言えない。しかし近年ではヒトにおいて、2歳までに手術を受けると、それ以降に手術を受けた児よりも行動異常を来す割合が増加するとする報告や(15)、2歳までの複数回の麻酔薬暴露は認知機能障害を来すとする報告も出てきた(16)。近年大規模な疫学的研究が進行中であり、米国食品医薬品局(FDA)では、麻酔鎮静薬の乳幼児における中枢神経系と認知力の発達に与える影響を検討するプロジェクトである SAFEKIDS (The Safety of Key Inhaled and Intravenous Drugs in

Pediatrics)が2009年から開始された。その後、2010年にプロジェクトは SmartTots (Strategies for Mitigating Anesthetic Related neurotoxicity in Tots)にその名を変えて現在も進行中である。2014年に発表された中間報告では、手術後の乳幼児に対する行動異常などの影響が、麻酔薬による直接的な影響なのか、あるいは原疾患や手術操作になどの要因によるものなのかは結論が出ておらず、そのため現段階では小児に対する麻酔方法の変更や、あるいは手術時期の検討などに至る段階ではないのが現状である。

現在のところ、齧歯類や霊長類での評価により麻酔薬の神経毒性が明らかにされてきたが、動物において麻酔薬に対して感受性の高い時期が、ヒトにおいてどの時期に相当するかどうか不明であり、動物実験の結果をヒトにあてはめることは適切ではない。しかしヒトの臨界期における麻酔薬暴露が、神経回路の形成に重篤な影響を来すのであれば、今後の安全な麻酔管理のためにも、メカニズムの解明は喫緊の課題である。そこで、発達期の脳に麻酔薬が与える影響のメカニズムの一端を解明することを目標とし、ERK 経路の挙動に注目した。

本研究では、臨界期において ERK が神経回路の形成において重要な役割を担っているかを検証することを目的とした。尚、本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認(承認番号 13008 及び 14105)を得ている。

第1章 MEK 阻害剤による ERK リン酸化阻害が、中枢神経におけるアポトーシス発現に与える影響の検討

第1節 目的

麻酔薬による発達期中枢神経毒性はその対象の年齢に大きく依存する(17)。齧歯類での研究では、麻酔薬への暴露を、最もシナプス形成が活発であると考えられる日齢6日目(P6: Postnatal day 6)あるいは日齢7日目(P7)に行った場合、最も強くアポトーシスが発現するとされ(4-6, 17)、また活発なシナプス形成のピークが終了すると考えられる P14 ではアポトーシスがあまり起こらないと考えられている(17)。

神経回路の形成に重要な役割を果たしている可能性のある ERK の活性化にはそのリン酸化が必要であり、MAP キナーゼキナーゼによりスレオニン残基、チロシン残基がリン酸化される。本章では、ERK のリン酸化を臨界期またはその終了後に阻害することで、中枢神経障害の程度に差があるのかどうかを検証することを目的とした。

第2節 方法

1. 使用動物

本研究は、防衛医科大学校(Tokorozawa, Saitama, JAPAN)動物実験施設における倫理審査において承認(承認番号 13008 及び 14105)を受けて実施した。動物は本動

物実験施設にて管理、飼育した C57/BL6 マウスを使用した。動物は 12 時間明暗サイクル(明サイクル:午前7時～午後7時)、室温 21±1°C、適切な給水給餌で管理された。また、過去の報告において仔マウスに自然発生的に生起する中枢神経のアポトーシスが、母親が異なるとその程度も異なる可能性が示唆されているため(18)、各実験において同腹仔で比較検討した。

2. 使用薬剤

本研究では血液脳関門を通過する MEK (Mitogen-activated protein/Extracellular signal regulated kinase kinase)阻害剤である SL327 (ENZO Life Science, Farmingdale, NY, USA) を使用した。SL327 は α -[amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzeneacetonitrile と表記される選択的な MEK 阻害剤で、ERK1/2 のリン酸化を阻害する。SL327 はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解しその濃度が 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調整した。

3. 薬剤投与方法

P6 または P14 において、C57/BL6 マウスの腹腔内に SL327 の投与量が 50 mg/kg となるように溶液を腹腔内注射し比較検討した。対照となるマウスには、同量の DMSO を腹腔内注射した。また、ERK のリン酸化阻害による中枢神経障害の程度を比較するために、0、10、30、50、100 mg/kg の各濃度の SL327 溶液を P6 マウスに腹腔内注射した。注射 6 時間後に、アポトーシス評価のため全脳組織を取り出した。

4. サンプル調整

全脳組織からサンプルを調整するために、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5 % sodium deoxycholate、0.1% sodium dodecyl sulfate、protease inhibitor cocktail (Complete; Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)、phosphatase inhibitors (PhosSTOP; Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)で作成したサンプルバッファー内でホモジェナイズし、4°C、15,000 r.p.m.、30 分間遠心し上清のみ採取、使用するまで-80°Cにて保存した。次に蛋白質定量を行なうため、Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)を使用した。96 穴マイクロプレートに、ビシニコニン酸試薬とサンプルをそれぞれバッファーで希釈した後、Assay kit A, Bを混合し添加した。37°C、30 分間インキュベートした後、iMark マイクロプレートリーダー(BioRad, Hercules, CA, USA)を用いて波長 562 nm における吸光度のバックグラウンドとの差を測定した。測定後、サンプルを 5 µg/mL になるようにバッファーで希釈し、Sample Buffer Solution with Reducing Reagent for SDS-PAGE (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を添加し、95°C、5 分間加熱処理後、氷冷した。

5. ウェスタンブロット法

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行なうため、8%ポリアクリルアミドゲルを NA-3000 (Nihon eido, Tokyo, Japan)上で作成した。電気泳動ゲルからメンブレンへの転写は、タンク式によるエレクトロニックトランスファーを用い、泳動・転写には

Power Station 1000VC (ATTO, Tokyo, Japan)を使用した。泳動は100 V、2時間行い、転写は PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA)を使用し、100 V、4時間行った。転写したメンブレンに検出用抗体が非特異的に結合することを防ぐため、5%スキムミルク添加 TBS-T (25mM Tris (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Tween-20)にて30分間室温でブロッキングした後に1次抗体を加えた。

1次抗体は、アポトーシスの定量には anti-cleaved poly-(adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) (#9544, rabbit polyclonal; Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を1:4,000に5%スキムミルクで希釈した抗体溶液を用い、4°C over nightで振盪させた。この他に ERKの定量に anti-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (#9102, rabbit polyclonal; Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を1:1,000、ERKリン酸化(pERK)の定量に anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101, rabbit polyclonal; Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を1:4,000に希釈して用い、同様に振盪させた。2次抗体は、anti-Rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG (#7074, goat polyclonal, Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を使用し室温で2時間振盪させた。1,2次抗体溶液での振盪後の洗浄には TBS-Tを使用し、10分間洗浄後リンスを3回繰り返し行った。化学発光法により検出するため、SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL, USA)を使

用し、LAS-3000 (Fuji Film Corporation, Tokyo, Japan)を使用して検出、撮影した。

撮影された検出バンドの濃度測定には、Multi Gauge (Fuji Film Corporation, Tokyo, Japan)を用い、内部標準には anti- β -actin (13E5) (#4970, rabbit monoclonal; Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を使用し測定した。

6. 免疫染色

マウスの全脳組織を灌流固定するために、4%PFA(paraformaldehyde)を作成した。60℃～70℃に温めた DDW(double distilled water) 80 ml 程度に PFA 4 g を添加し、NaOH で pH 調整しながら溶解させた。溶解したのちに 10x PBS(Phosphate buffered saline)を 10ml 加え、DDW でメスアップし計 100 ml とした。

次にマウスを sevoflurane により麻酔し、痛み刺激に反応しなくなったら解剖台に固定した。開腹後、横隔膜を切開し剣状突起から肋骨を左右方向に展開し、心臓を露出させた。灌流ポンプを接続した穿刺針を左心室に刺し、4%PFA を十分に灌流させて全脳を取り出し、4%PFA 中で外固定を over night で行った。外固定後、サンプルを 1x PBS に移し替えた後、パラフィン包埋を行った。パラフィンブロックはロータリーマイクローム(MICROM HM355S; Microm International GmbH, Walldorf, Germany) を用い 5 μ m にスライスした。切片を載せたスライドガラスを染色カゴに立て、キシレンで脱パラフィンし、100%エタノール、95%エタノール、75%エタノールの順に 5 分ずつ浸漬し、抗原を賦活化するため Antigen unmasking solution (H-3300; Vector Laboratory,

Burlingame, CA, USA)を添加後、121°C、5 分間オートクレーブした。Nonspecific staining blocking reagent (Dako, Glostrup, Denmark)を用いブロッキングし(19)、アポトーシスの指標として 1 次抗体 Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody (#9661, rabbit polyclonal; Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)を Antibody diluent (Dako, Glostrup, Denmark)により 1:100 に希釈して添加し、4°C 加湿環境 over night で静置した。次に peroxidase conjugated secondary antibody (Dako EnVision+ system; Dako, Glostrup, Denmark)を添加した後に 3,3-diaminobenzine-tetrachloride (DAB; Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA)で発色させ、ヘマトキシリンにより後染色を行った。検鏡し Caspase-3 陽性細胞をカウントした。

蛍光免疫染色には、1次抗体にアポトーシスの指標として anti-active caspase-3 antiserum (#9661, rabbit, polyclonal; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、神経細胞のマーカーとして anti-NeuN (MAB377, mouse monoclonal; Millipore, Billerica, MA, USA)、アストロサイトのマーカーとして anti-GFAP (G3893, mouse monoclonal; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)、オリゴデンドロサイトのマーカーとして anti-CNPase (MAB326R, mouse monoclonal; Millipore, Billerica, MA, USA) を用いた。マウス由来 1 次抗体の細胞染色用蛍光色素には Alexa-Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を使用し、ラビット由来 1 次抗体の細胞染色用蛍光色素には Alexa-Fluor 546-conjugated

goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を使用した。切片は、Nikon fluorescence microscopy system (Nikon, Tokyo, Japan) with electron-multiplying (EM) CCD digital camera (ImagEM+ Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)を使用して検鏡した。

7. 動脈血ガス分析

マウスをsevofluraneにより麻酔し、痛み刺激に反応しなくなったら解剖台に固定した。開腹後、横隔膜を切開し剣状突起から肋骨を左右方向に展開し、心臓を露出させた。露出した左心室を穿刺し、血液をヘパリンコーティングさせた毛細管で55 μ l採取した(7) (20)。採取した血液はABL800 FLEXシステム(Radiometer, Copenhagen, Denmark)により分析した。

8. 統計解析

統計解析は Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。2 群間における比較には Student t 検定を用いた。SL327 各投与量による比較では、one-way ANOVA 検定及び Bonferroni's multiple comparison test を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

第3節 結果

1. ウェスタンブロット法

P6マウスにSL327を腹腔内注射し、6時間後に全脳組織を取り出し、PARP、ERK、pERK、 β -actinの発現量をウェスタンブロット法にて対照群と比較した結果をFig. 1aに示す。VehicleであるDMSOのみを腹腔内注射した対照群ではPARPは殆ど出現しないが、SL327を腹腔内注射するとアポトーシスの指標であるPARPが有意に増加した(各群n = 10)。P14マウスにおける同様の実験結果をFig. 1bに示す(各群n = 6)。P14マウスでは、SL327腹腔内注射によりpERKは阻害されているものの、アポトーシスの増加は見られない。各濃度のSL327腹腔内注射によるPARP、ERK、pERK、 β -actinの発現量をウェスタンブロット法にて対照群と比較した結果をFig. 1cに示す。この結果を解析し定量したものがFig. 1d-fである(各群n = 7、mean \pm SEM、*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 は対照群と比較した有意差を示す)。SL327投与量が10 mg/kg 以上になるとpERK1、2とも有意に減少し(Fig. 1d, pERK1: $F = 147.6$, $P < 0.0001$; Fig. 1e, pERK2: $F = 133.1$, $P < 0.0001$)、30 mg/kg以上になるとPARPの発現は対照と比較して有意に上昇する($F = 5.80$, $P = 0.011$)。

2. 免疫染色

P6 マウスに SL327 を腹腔内注射し、activated caspase-3(AC-3)による免疫染色により対照群とアポトーシスを比較した結果を Fig. 2 に示す。アポトーシスの指標である AC-3 陽性細胞は図中の茶色に染色された細胞である。対照群ではわずかしか AC-3 陽性細胞が観察されないが、SL327 を投与されたマウスでは広範なアポトーシスを認めた。

大脳皮質、海馬台、視床における強拡大像を Fig. 3 に示す。SL327 投与群では、大脳皮質第 II、V 層(Fig. 3a')、海馬台の錐体細胞層(Fig. 3b')などにアポトーシスを顕著に認めた。各群において、海馬の CA1 及び CA3 領域、歯状回(DG: Dentate gyrus)、海馬台(Sub: Subiculum)、扁桃体(Amg: Amygdala)、尾状核被殻(CP: Caudate putamen)、視床(Th: Thalamus)、脳梁膨大部皮質(RSC: Retrosplenial cortex)、大脳皮質第 II (II: cortex layer II)、V 層(V: cortex layer V)における AC-3 陽性細胞数をカウントし、定量化したものを Fig. 4 に示す(各群 n = 5、mean ± SEM、**P < 0.01, ***P < 0.001 は対照群と比較した有意差を示す)。観察した各部位において、SL327 投与群では有意なアポトーシスの増加を認めた。

AC-3 陽性細胞の局在を調べるために、蛍光波長の異なる2種類の蛍光色素を用いた二重染色を行った結果を Fig. 5 に示す。神経細胞特異的マーカーである NeuN (Neuronal nuclear antigen)を用いた蛍光二重染色により、アポトーシスは神経細胞に起こっていることがわかった(Fig. 5a, b)。しかしアストロサイト特異的マーカーである GFAP (Glial fibrillary acidic protein)を用いた二重染色により、アポトーシスはアストロサイトには起こっていないことがわかった(Fig. 5c, d)。オリゴデンドロサイト特異的マーカーである CNPase (2'3' cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase)を用いた二重染色により、皮質や白質では神経細胞と同じようにオリゴデンドロサイトにもアポトーシスが起きているが(Fig. 5e, f)、海馬台ではオリゴデンドロサイトにはアポトーシスが

起こっていないことが分かった(Fig. 5g)。

3. 動脈血ガス分析

SL327 投与直前と投与直後のマウスにおいて動脈血ガス分析を対照群と比較したところ、pH、動脈血酸素分圧(PaO₂)、動脈血二酸化炭素分圧(PaCO₂)に差を認めなかった(Table 1)。

第4節 考察

ERK1/2 の選択的阻害剤である SL327 投与により、P14 マウスではアポトーシスを生じないが、P6 マウスでは広範なアポトーシスを生じた。これらは ERK のリン酸化阻害による中枢神経系への影響は、その時期、日齢に強く依存することが示唆された。また動脈血ガス分析により、pH、PaO₂、PaCO₂ に差を認めないことから、中枢神経系に生じたアポトーシスは低酸素血症や高二酸化炭素血症によるものではないことが示唆された。

蛍光二重染色の結果によると、SL327 を投与したマウスではアポトーシスは主に神経細胞やオリゴデンドロサイトに生じており、アストロサイトには起こっていない。過去に、全身麻酔薬やアルコールは動物の中枢神経において、神経細胞やオリゴデンドロサイトにアポトーシスを引き起こすが、アストロサイトには引き起こさないとする報告がある(12, 21)。オリゴデンドロサイトが SL327 に脆弱であることは、アルコールによるアポト-

シスと同様に成熟オリゴデンドロサイトへの分化時期と関係している可能性もある(21)。

以上の結果は、臨界期において ERK が神経回路の形成において重要な役割を担っているという仮定に矛盾しない。

第2章 MEK 阻害剤による中枢神経毒性の電気生理学的検討

第1節 目的

第1章では、臨界期と考えられるマウスに SL327 を投与し、投与6時間後に中枢神経毒性を評価したが、本章では SL327 投与の長期的影響について検討するために、成長後のマウスから記憶学習に関与すると考えられている海馬を取り出し、海馬における長期増強(LTP: Long-term potentiation)を観察し、SL327 投与の長期的影響を検討することを目的とした。

第2節 方法

1. 使用動物

第1章参照。マウスは P6 あるいは P14 において薬剤投与後、母マウスに養育させ前述の環境下で 4 週齢まで飼育した。

2. 使用薬剤

第1章参照。

3. 薬剤投与方法

第1章参照。

4. 海馬スライスと電気生理学的記録

細胞外電位記録法による長期可塑性のひとつである LTP 測定を行った。またシナプスの伝達効率の指標としてシナプス応答の入出力関係(I-O: input-output relationship)を、さらに伝達物質の放出確率を反映した指標である 2 発刺激促進(PPF: paired-pulse facilitation)を比較検討した。4 週齢マウスを麻酔下に断頭、海馬を取り出した。2.5°C に冷却したスクロースリンゲル溶液(in mM: 234 sucrose, 26 NaHCO₃, 2.5 KCl, 0.5 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, and 11 glucose (pH 7.3-7.4) 95% O₂-5% CO₂ 標準ガスでバブリング)中で Vibratome 3000 (Vibratome, St. Louis, MO, USA)により 400 μm の厚さにスライスした。スライスは使用前に室温で 90 分以上人工脳脊髄液(ACSF: Artificial cerebrospinal fluid)(in mM: 26 NaHCO₃, 124 NaCl, 3.0 KCL, 2.0 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.3 MgHPO₄·7H₂O, 10 glucose (pH 7.3-7.4))中で静置した。スライスした海馬は測定チャンバー内で 95% O₂-5% CO₂ 標準ガスで持続的にバブリングした 30±2°C の ACSF で 2-3 mL/分で灌流した。海馬 CA1 領域の放線状層において、ACSF で満たしたガラスマイクロピペット(1-2 MΩ)を用いて興奮性シナプス後電位(fEPSP: field excitatory postsynaptic potentials)を記録した。電気シグナルは MultiClamp 700B アンプ(Axon Instruments, Union City, CA, USA)を用いて増幅し、Clampex software (version 9.2; Axon Instruments, Union City, CA, USA)を使用し記録、解析した。ステンレス製刺激電極をシャッフアー側枝を刺激するために放線状層に置いた。すべての実験において、刺激強度は fEPSP が最大振幅の約 40-50%となるように調整し、刺激時

間は 0.10-15 ms とした。LTP 導入前の 10 分間の fEPSP の傾きをベースラインとし、すべての測定値はこのベースライン(normalized fEPSP slope)を基準に標準化した。LTP は 100 Hz、1 秒間の高頻度刺激により誘発し、I-O は 1、2、3、4、5、6V の刺激により誘発、さらに PPF は 20、50、70、100、200 ミリ秒間隔の刺激により誘発した。

次に、パッチクランプ法によりNMDA/AMPA比の測定を行った。4週齢マウスを麻醉下に断頭、海馬を取り出した。2.5°Cに冷却したカッティング溶液(in mM: 93 NMDf-Cl, 5 sodium ascorbate, 3 sodium pyruvate and 2 thiourea (pH 7.4) 95% O₂-5% CO₂標準ガスでバブリング)中でmicroslicer (Linear Slice Pro 7, Dosaka, Kyoto, JAPAN)により350 μmの厚さにスライスした。スライスは使用前に22-24°Cで15-20分パッチクランプ用人工脳脊髄液(ACSF-P: Artificial cerebrospinal fluid for patch clamp)(in mM: 26 NaHCO₃, 124 NaCl, 3.0 KCL, 2.0 CaCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 11 glucose (pH 7.4))中で静置した。ホウケイ酸塩ガラス製ホールセル記録ピペット(4-6 MΩ)を120 Cs-gluconate, 20 CsCl, 10 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 4 MgATP, 0.3 Na₃GTP and 5 phosphocreatine-diTris, pH 7.2 (adjusted with CsOH)混合溶液(in mM)で満たした。CEZ-2400アンプ(Nihon Kohden, Tokyo, Japan)、およびA-D/D-Aコンバーターコンバーター(25 kHz/channel, 16 bit, USB-6259BNC; National Instruments, Austin, TX, USA)を用いて記録を行った。海馬CA1領域錐体細胞は40倍水浸対物レンズ付正立顕微鏡(AxioSkop 2FS; Zeiss, Jena, Germany)を使用し可視化した。スライスは測定中31±1°Cに保たれたピクトロキ

シン(50 μ M)とグリシン(M)添加ACSF-Pを2 mL/分で灌流させた。NMDA/AMPA比はNMDA受容体およびAMPA受容体シナプス応答の比から計算した。海馬CA1領域錐体細胞層のシナプス電流を発生させるため、シャッフアー側枝をツイストワイヤー電極で刺激した。Voltage clamp法により錐体細胞層を-90から+40 mVで電位を固定し、AMPA受容体由来とNMDA受容体由来の電流をそれぞれ記録した。AMPA受容体由来の電流はそのピークを記録し、NMDA受容体由来の電流は、刺激の50ミリ秒後の値を記録した。

5. 統計解析

統計解析は Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。LTP 測定における 2 群間比較には two-way repeated measures ANOVA 検定を用いた。p<0.05 を統計学的有意と判定した。NMDA/AMPA 比の 2 群間比較には Student t 検定を用いた。

第3節 結果

1. 細胞外記録法による LTP 測定

P6においてSL327を投与したマウスを4週齢まで飼育し、LTPを測定した結果をFig. 6aに示す。対照群と比較して有意にLTPが抑制されている。統計学的に、SL327投与と時間間に交互作用を認めた($F(140, 1400) = 2.61, P < 0.0001$)。時間の主効果

に有意差を認めたが($F(140, 1400) = 27.71, P < 0.0001$)、SL327 投与の主効果に有意差は認めなかった($F(1, 10) = 1.183, P = 0.2079$)。入出力関係(input-output relationship) ($F(5, 50) = 0.9802, P = 0.4391$)や PPF($F(4,40) = 1.051, P = 0.3935$)には 2 群間において交互作用は有意でなかった(Fig. 6b, c)。

一方、P14 において SL327 を投与し 4 週齢まで成長させたマウスでは、LTP は抑制されずに対照群とに交互作用は認められなかった($F(140, 1400) = 0.3025, P > 0.9999$)(Fig. 6d)。入出力関係($F(5, 50) = 0.5940, P = 0.7046$)、PPF($F(4, 40), P = 0.5833$)にも交互作用は認められない(Fig. 6e, f)。

2. パッチクランプ法による NMDA/AMPA 比の測定

P6 において SL327 を投与した 4 週齢マウスでは、NMDA/AMPA 比は対照群に比べて有意に低下した(Fig. 7; $t = 3.85, P = 0.0007$)。

第 4 節 考察

SL327 投与の長期的影響を検証するために、4 週齢マウスの海馬を用いて LTP を解析したが、P6 において SL327 を投与したマウスでは対照群と比較して LTP の有意な抑制が観察された。P14 において投与したマウスでは LTP の抑制は見られなかったことは、第 1 章と同様に、中枢神経系への影響はその日齢に強く依存することが示唆される。

fEPSP の PPF には対照群と差は見られなかったことは、SL327 投与による ERK のリン酸化抑制は、短期間のシナプス前の可塑性には影響を与えないことを示唆する。また入出力関係の解析により、刺激の強度と fEPSP の傾きの関係は、両群において差は見られないことがわかった。これらの結果は、SL327 投与がシナプス伝達自身には影響を与えていないことを示唆する。

一方、SL327 投与マウスにおいて対照群と比較して NMDA/AMPA 比が変化していることは、NMDA 受容体あるいは AMPA 受容体、もしくは双方のシナプス後膜での受容体サブユニットの機能変化が LTP の抑制に関与していることを示唆する可能性があるが、詳細なメカニズムに関しては明らかにはなっていない。NMDA/AMPA 比の変化が LTP に関わっているかに関しては更なる研究が必要であろう。

第3章 MEK 阻害剤による中枢神経毒性の行動学的検討

第1節 目的

第1、2章では、臨界期と考えられるマウスへの SL327 投与が中枢神経系にアポトーシスを来し、かつ成長後に LTP の抑制という電気生理学的異常を来していることが分かった。本章では SL327 投与が実際に表現型としてどういう異常を来すのかを評価するために、各種行動学的実験を行い解析した。

第2節 方法

1. 使用動物

第1章参照。雄マウスを P6 あるいは P14 において薬剤投与後、母マウスに養育させ前述の環境下で 9-11 週齢まで飼育した。

2. 使用薬剤

第1章参照。

3. 薬剤投与方法

第1章参照。

4. オープンフィールドテスト (Open field test)

新規の環境において自発的な活動性を測定するために、マウスを正方形の白いアク

リル製オープンフィールド(50×50×40 cm)の中に入れ、10 分間自由に行動させた。マウスの総行動距離を測定した(9)。行動距離の測定には computer-operated video tracking system (SMART, Barcelona, Spain)を用い、アクリル製オープンフィールド (O'Hara & Co., Ltd., Tokyo, Japan)は各個体測定ごとに洗浄した。

5. 高架式十字迷路テスト (EPM: Elevated plus maze test)

マウスの持つ高所を嫌い、壁際を好むという性質を利用した、不安様行動を評価するテスト。オープンアーム(25×5 cm)と15cmの透明な壁のあるクローズドアームを十字型に組み合わせた高さ50 cmの高架式迷路の中央にマウスを置き10分間観察し、マウスがオープンアームにいる時間を計測した。

6. Y 迷路テスト (Y-maze test)

3本の同じ大きさのアクリル製アーム(25×5 cm)が、その角度が120度になるように配置したY字型の迷路で、マウスの探索行動を評価する。通常、マウスは既に入ったアームを記憶しており、直近に入ったアームと異なるアームを選択し探索する傾向にある。Y迷路の中央にマウスを置き8分間観察し、3本のアームに入る順序を全て記録する。全てのアームに侵入した回数と、続けて3回異なるアームに入った回数を計測し、交替行動数をアームの総侵入回数引く2で割った値を交替行動率として評価した。

7. 社交性テスト (Sociability test)

オープンフィールド内で、カゴに入れた生きたマウスと、同様にカゴに入れたダミーのぬいぐるみマウスを置き、どちらとの接触を好むかを評価する社会性行動テスト(22)。

カゴは、高さ10cm、直径9cmの円柱形で、7mm間隔で柵が配置されており、マウスの嗅覚を遮断せずにカゴの外側から内側に接触することができる。マウスをオープンフィールドに置いて10分間観察し、それぞれのカゴに接触している時間を記録した。

8. オルファクトリーテスト (Olfactory test)

マウスの嗅覚テスト。テストの前に3日間、ブルーベリーチーズ味の餌を与え匂いを記憶させた後、4日目に禁食とする。5日目に、予めマウスケージの床材の中にブルーベリーチーズ味の餌を埋めておき、空腹状態のマウスをケージに入れてから餌を発見するまでの時間を測定した(8)。

9. ノベルティーテスト (Novelty test)

マウスケージにプラスチック製の赤いチューブを置き、マウスが10分間のうちチューブと接触している時間を測定した(8)。

10. グルーミング行動

反復性常同行動の指標として、グルーミング(毛繕い)時間を測定した(23)。床材のない空のケージにマウスを置き、10分間観察しグルーミング行動の回数、時間を測定した。

8. 統計解析

統計解析は Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。2 群間における比較には Student t 検定を用いた。Y 迷路試験では、2 群間の比較に、two-tailed one-sample t 検定を用いた。p<0.05 を統計学的有意と判定した。

第3節 結果

1. オープンフィールドテスト (Open field test)

P6においてSL327を投与したマウスと、P14において投与したマウスの両方で、対照群と比較して総行動距離に差は見られなかった(Fig. 8a,d)。

2. 高架式十字迷路テスト (EPM: Elevated plus maze test)

P14においてSL327を投与したマウスでは、open arm で過ごした時間は対照群と比較して差は見られなかったが(Fig. 8e)、P6においてSL327を投与したマウスでは、対照群よりも有意に長い時間を open arm で過ごした(Fig. 8b; t-test, $t = 2.85$, $P = 0.0087$)。

3. Y 迷路テスト (Y-maze test)

P14においてSL327を投与したマウスでは、対照群と比較して空間作業記憶に差は見られず(Fig. 8f)、P6においてSL327を投与したマウスでは、対照群よりも有意に交替行動率が低い、すなわち前に入った arm がどこかを覚えていないことが分かった(Fig. 8c; t-test, $t = 3.36$, $P = 0.0023$)。

4. 社交性テスト (Sociability test)

P6でSL327を投与したマウスでは、ぬいぐるみと接触する時間と生きたマウスと接触する時間に差はみられなかった(Fig. 9a; A two-way ANOVA, significant main effect of target, $F = 8.37$, $P = 0.0056$, significant main effect of SL327 administration, $F = 9.05$, $P = 0.0041$)。P14でSL327を投与したマウスでは、対照群と同様にぬいぐるみと接触する時間よりも生きたマウスと接触する時間が有意に長かった(Fig. 9d; A two-way ANOVA, significant main effect of target, $F = 127.6$, $P < 0.0001$)、

5. オルファクトリーテスト (Olfactory test)

P6でSL327を投与したマウスで、対照群と比較して餌を発見するまでに要した時間に差はなく(Fig. 9b, $P < 0.05$)、P14でSL327を投与したマウスでも同様であった(Fig. 9e, $P < 0.05$)。

6. ノベルティーテスト (Novelty test)

P6でSL327を投与したマウスで、対照群と比較して新規の物体と接触した時間に差はなく(Fig. 9c, $P < 0.05$)、P14でSL327を投与したマウスでも同様であった(Fig. 9f, $P < 0.05$)。

7. グルーミング行動

P14でSL327を投与したマウスでは、対照群と比較してグルーミングに費やす時間及び回数に差は見られなかったが(Fig. 10c, d; t-test, $P > 0.05$)、P6でSL327を投与したマ

ウスでは対照群と比較してグルーミングにより長い時間を費やし(Fig. 10a; t-test, $t = 2.60$, $P = 0.018$)、またその頻度も多かった(Fig. 10b; t-test, $t = 4.18$, $P = 0.0006$)。

第4節 考察

第2章までに、マウスにおいて ERK の活性化阻害が中枢神経に広汎なアポトーシスを来し、さらに LTP の抑制という長期的な影響を来すことが分かった。本章では、SL327 投与が実際に表現型としてどういう異常を来すのかを各種行動学的実験を行い解析したが、臨界期における ERK の活性化阻害により、成長後の空間作業記憶、社会性行動に異常を来すことが分かった。社会性行動の異常は、自閉症と強く関連することが知られているため(23) (24)、これらの結果は臨界期における ERK の活性化阻害が自閉症様症状を引き起こす可能性を示唆する。そのため、自閉症スペクトラム障害の症状の1つであると考えられる反復常同行動を評価するため(23)、グルーミング行動を解析したところ、臨界期における ERK の活性化阻害が反復常同行動に影響を与えることがわかった。

ヒトでは、ERK の活性化が変化すると自閉症様行動異常などを引き起こすことが知られているが、その病理学的なメカニズムに関してはあまり知られていない。例えば、RAS/ERK 経路の遺伝子異常によって起こる、発達異常などを来す疾患群の総称として NCFC(neuro-cardio-facial cutaneous)症候群などが知られているが、これらは様々な

程度の自閉症様行動異常を来す(25)。また ERK2 を支配する遺伝子は 22q11.2.染色体上に存在するが、この染色体の欠損患者には自閉症様行動異常が見られることが知られている(26)。さらに、ERK1 を支配する遺伝子は 16p11.2.染色体上に存在し、この欠損が自閉症様行動異常と関連していることも知られている(27)。

自閉症スペクトラム障害は、臨界期における神経回路の形成の異常によって起こる可能性が示唆されているが(28)、臨界期に ERK の活性化を阻害することにより自閉症様行動異常が生起されることと併せて考えると、臨界期における神経回路の形成には ERK 経路の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆される。

第4章 ノックアウトマウスにおけるアポトーシス発現経路の検討

第1節 目的

第3章までにおいて、臨界期には ERK 経路の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆されたが、ERK のアイソフォームのうち ERK1 あるいは ERK2 のどちらか、あるいは両方が関与しているのかどうかは明らかではない。SL327 は ERK1/2 のリン酸化を阻害するが、それぞれの特異的な阻害剤は存在せず、2つのアイソフォームの差を評価することは難しい。

本章では、ノックアウトマウスを用い臨界期のアポトーシスの発現に ERK1/2 経路のどちらがより関与しているかを明らかにすることを目的とした。

第2節 方法

1. 使用動物

第1章参照。Erk1 ノックアウト(KO)マウスは全身で ERK1 が欠損しているマウスで、共同研究者である Gilles Pagés, Jacques Pouyssegur より提供を受け(29)、Erk1^{+/-}同士を掛け合わせ、生まれてきた仔で Erk1^{-/-}をノックアウトマウス、Erk1^{+/+}をコントロールマウスとした。Erk2 コンディショナルノックアウト(CKO)マウスは Cre/loxP 部位特異的組換えにより作成したマウスを共同研究者である Yasushi Satoh より提供を受け(11)、

Erk2^{flox/flox};nestin-cre(+)と *Erk2*^{flox/flox};nestin-cre(-)を掛け合わせ、生まれてきた仔の *Erk2*^{flox/flox};nestin-cre(+)をコンディショナルノックアウトマウス、*Erk2*^{flox/flox};nestin-cre(-)をコントロールマウスとした。

2. 使用薬剤

第1章参照。

3. 薬剤投与方法

第1章参照。

4. サンプル調整

第1章参照。

5. ウェスタンブロット法

第1章参照。

6. 統計解析

統計解析は Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA)を用いて行った。2 群間における比較には two-way ANOVA 検定及び Bonferroni's multiple comparison test を用いた。p<0.05 を統計学的有意と判定した。

第3節 結果

Erk1 KO マウスに P6 で SL327 あるいは Vehicle を投与し対照群と比較した結果、

Erk1 KO マウスと対照群ともに、アポトーシスの指標である PARP の出現が見られた (Fig. 11a, b; two-way ANOVA, no significant main effect of *Erk1* abrogation, $F = 77.22$, $P < 0.0001$)。これは *Erk1* の欠損単独ではアポトーシスの発現を引き起こさないことを示す。

次に *Erk2* CKO マウスに P6 で SL327 あるいは Vehicle を投与し対照群と比較した結果、*Erk2* CKO マウスと対照群ともに、アポトーシスの指標である PARP の出現が見られたが、SL327 投与群において *Erk2* CKO マウスは対照群よりも有意に PARP 発現レベルは低かった (Fig. 11c, d; two-way ANOVA, SL327 投与による主効果, $F = 76.06$, $P < 0.0001$, *Erk2* ノックアウトによる主効果, $F = 7.76$, $P = 0.012$, SL327 投与と *Erk2* ノックアウトによる交互作用, $F = 4.48$, $P = 0.049$)。

第4節 考察

Erk1 KO マウスにおいて、P6 で SL327 を投与されるとアポトーシスを来すことから、中枢神経毒性発現のための責任経路は ERK2 に存在すると考えた。そのため *Erk2* CKO においては SL327 を投与してもアポトーシスが発現しないと予想したが、当初の予想に反して *Erk2* CKO マウスにおいても P6 における SL327 投与によりアポトーシスが引き起こされた。これらの結果から、臨界期に ERK1/2 の両方のアイソフォームが阻害された時にアポトーシスが引き起こされることがわかった。そのメカニズムに関しては

不明なままであるが、ERK1/2は重複してその役割を分担しており、互いに代償しあっている可能性がある。そのため臨界期におけるERK1/2の全体的なリン酸化の程度がアポトーシスの発現に関わってくることを示唆する。*Erk1* KOマウスにおいてERK2のリン酸化の程度が上昇していること、また*Erk2* CKOマウスにおいてERK1のリン酸化の程度が上昇していることは、お互いに相補的な役割を果たしている可能性がある。過去に、ERK1とERK2は異なる役割を果たしているという報告がある。例えば、ERK2欠損マウスでは重篤な神経機能障害を来す一方で*Erk1* KOマウスでは神経機能に大きな影響を来さないとするものもある(12) (30) (31) (32)。臨界期における神経回路の形成に関するERKの役割は成人とは異なる可能性もある。

Erk2 CKOマウスにおいて、SL327を投与した際に見られるアポトーシスの程度は、対照マウスにSL327を投与した際に見られるアポトーシスよりも低い。両群においてSL327によりERKのリン酸化は完全に阻害されているので、リン酸化の程度に差はない。*Erk2* CKOマウスではP6よりも前に、何らかの発達段階の変化が起き、SL327により生起されるアポトーシスの感受性に変化が生じたのではないかと推測する。実際に、*Erk2*の遺伝的欠損により発達に変化を及ぼすが(11) (33) (34)、*Erk1* KOでは変化がみられないとする報告(29)は、この推測に矛盾しない。

第5章 総括

MAPK ファミリーに属する ERK は元来、細胞増殖シグナルに反応する因子として同定され、ERK 経路が記憶、学習メカニズムに重要であることは、阻害薬を用いた研究などで示唆されてきた(35) (10)。今回、マウスに SL327 を投与し ERK の活性化を阻害することで、麻酔薬暴露と同様な中枢神経毒性を引き起こすことがわかった。またこの現象は日齢に依存することが明らかになった。これらの結果は、臨界期において ERK が神経回路の形成において重要な役割を担っている可能性を示唆する。また電気生理学的検討から、臨界期に一時的に ERK を阻害されたマウスでは成長後に LTP が抑制され、かつ自閉症様の行動異常を来すことは、ERK 経路が記憶、学習メカニズムに強く関与しており、特に臨界期の神経回路の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。さらには、社交性などの行動異常の発現経路には ERK のリン酸化異常が関与している可能性も示唆された。さらに、ノックアウトマウスを用いた研究からは、ERK のアイソフォームのうち、アポトーシスの出現には ERK1、ERK2 の両方の経路の活性化阻害が必要であることが分かった。

本研究によりアポトーシスの発現、学習や行動異常を来す機序に ERK のリン酸化阻害が関与していることが強く疑われた。臨界期における ERK 経路のリン酸化阻害を防ぐ方法に関して調査研究が進めば、症状発現を未然に防ぐことができる可能性がある。また全身麻酔薬暴露による中枢神経毒性のメカニズムがさらに解明されれば、トリガー

となる反応を引き起こさせないための予防的薬剤投与や、あるいは ERK 経路のリン酸化自身をさらに促進する方法を検討することで安全な小児麻酔管理法開発の一助になる可能性がある。本研究結果は中枢神経毒性や学習、行動異常を来す機序に ERK のリン酸化阻害が関与していることを示唆するが、ERK リン酸化阻害の前後にある現象については解明できておらず、中枢神経毒性発現の全体像は未だに明らかではない。これらの機序が少しずつ解明されていくことが、適切な治療、予防法の発見に寄与するはずである。

第6章 結論

マウスにおいて、臨界期の ERK 経路の活性化抑制が中枢神経毒性を生じ、成長後に学習、行動異常を来す。

謝 辞

論文の作成にあたり多大なる御指導を賜りました防衛医科大学校麻酔学講座教授、風間富栄先生に深謝致します。また、本研究遂行にあたり、昼夜を問わず研究構想、実験手技、研究結果の評価などに至るまで全般的な御指導を賜りました防衛医科大学校麻酔学講座講師、佐藤泰司先生に感謝申し上げます。

また動物管理、検体作成についての手技について御指導頂きました、防衛医科大学校麻酔学講座実験補助、高宮希代子様に感謝致します。

最後に、激励をいただいた多くの友人、後輩、そして研究生活を全面的にサポートしてくれた家族に感謝致します。

附 記

本研究論文の一部は、nature publishing groupが発行する学術誌*Scientific Reports*に掲載された(Yufune, S. et al. Transient Blockade of ERK Phosphorylation in the Critical Period Causes Autistic Phenotypes as an Adult in Mice. *Sci. Rep.* **5**, 10252; doi: 10.1038/srep10252 (2015))。

また、本研究は以下の学術集会においてその一部を発表した。

国際学会

- Neuroscience 2014, the 44th Annual meeting of the Society for Neuroscience
November 18th 2014, the Walter E. Washington Convention Center, Washington
DC., United states.

Symposium 《Molecular hydrogen suppresses apoptosis in neuron and oligodendrocyte caused by neonatal exposure to general anesthetics in mice》

国内学会

- 第58回埼玉麻酔科専門医会
平成26年10月18日(土) 大宮ソニックシティ

シンポジウム 《麻酔薬による発達期中枢神経毒性 I 》
- 日本臨床麻酔学会第34回大会
平成26年11月3日(月) グランドプリンスホテル新高輪

シンポジウム 《発達期能への麻酔薬暴露による行動障害発症メカニズム》

- 日本麻酔科学会第62回学術集会

平成27年5月28日(金) 神戸ポートピアホテル 神戸国際展示場

一般演題 《発達期マウスにおける、セボフルラン麻酔による中枢神経毒性と細胞外シグナル調節キナーゼのリン酸化抑制による毒性との比較》

- 日本麻酔科学会第62回学術集会

平成27年5月29日(土) 神戸ポートピアホテル 神戸国際展示場

一般演題 《発達期マウスにおける細胞外シグナル調節キナーゼのリン酸化抑制が、成長後の学習行動異常に与える影響について》

引用文献

1. Knudsen EI. Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *Journal of cognitive neuroscience*. 2004;16(8):1412-25.
2. Wiesel TN, Hubel DH. Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *Journal of neurophysiology*. 1963;26:1003-17.
3. Nelson CA, 3rd, Zeanah CH, Fox NA, Marshall PJ, Smyke AT, Guthrie D. Cognitive recovery in socially deprived young children: the Bucharest Early Intervention Project. *Science*. 2007;318(5858):1937-40.
4. Ikonomidou C, Mosinger JL, Salles KS, Labruyere J, Olney JW. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1989;9(8):2809-18.
5. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 1999;283(5398):70-4.
6. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, et al. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *The Journal of neuroscience : the*

official journal of the Society for Neuroscience. 2003;23(3):876-82.

7. Satomoto M, Satoh Y, Terui K, Miyao H, Takishima K, Ito M, et al. Neonatal exposure to sevoflurane induces abnormal social behaviors and deficits in fear conditioning in mice. *Anesthesiology*. 2009;110(3):628-37.

8. Straiko MM, Young C, Cattano D, Creeley CE, Wang H, Smith DJ, et al. Lithium protects against anesthesia-induced developmental neuroapoptosis. *Anesthesiology*. 2009;110(4):862-8.

9. Satoh Y, Endo S, Ikeda T, Yamada K, Ito M, Kuroki M, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(40):10765-76.

10. Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience*. 2004;5(3):173-83.

11. Satoh Y, Endo S, Nakata T, Kobayashi Y, Yamada K, Ikeda T, et al. ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(33):11953-67.

12. Brambrink AM, Back SA, Riddle A, Gong X, Moravec MD, Dissen GA, et al. Isoflurane-induced apoptosis of oligodendrocytes in the neonatal primate brain. *Annals of*

neurology. 2012;72(4):525-35.

13. Creeley C, Dikranian K, Dissen G, Martin L, Olney J, Brambrink A. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain. *British journal of anaesthesia*. 2013;110 Suppl 1:i29-38.

14. Paule MG, Li M, Allen RR, Liu F, Zou X, Hotchkiss C, et al. Ketamine anesthesia during the first week of life can cause long-lasting cognitive deficits in rhesus monkeys. *Neurotoxicology and teratology*. 2011;33(2):220-30.

15. Kalkman CJ, Peelen L, Moons KG, Veenhuizen M, Bruens M, Sinnema G, et al. Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. *Anesthesiology*. 2009;110(4):805-12.

16. Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, Wilder RT, Voigt RG, Olson MD, et al. Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery. *Pediatrics*. 2011;128(5):e1053-61.

17. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience*. 2005;135(3):815-27.

18. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic

neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol.* 2005;146(2):189-97.

19. Ito M, Nakashima M, Tsuchida N, Imaki J, Yoshioka M. Histogenesis of the intravitreal membrane and secondary vitreous in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2007;48(5):1923-30.

20. Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death.* 2006;11(9):1603-15.

21. Creeley CE, Dikranian KT, Johnson SA, Farber NB, Olney JW. Alcohol-induced apoptosis of oligodendrocytes in the fetal macaque brain. *Acta neuropathologica communications.* 2013;1(1):23.

22. Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, et al. Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron.* 2006;50(3):377-88.

23. Etherton MR, Blaiss CA, Powell CM, Sudhof TC. Mouse neurexin-1 alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17998-8003.

24. Crawley JN. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* 2007;17(4):448-59.

25. Bentires-Alj M, Kontaridis MI, Neel BG. Stops along the RAS pathway in human

genetic disease. *Nature medicine*. 2006;12(3):283-5.

26. Vorstman JA, Staal WG, van Daalen E, van Engeland H, Hochstenbach PF, Franke L.

Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic

abnormalities associated with autism. *Molecular psychiatry*. 2006;11(1):1, 18-28.

27. Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM. The major vault protein is a

novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth

factor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(28):29374-85.

28. LeBlanc JJ, Fagiolini M. Autism: a "critical period" disorder? *Neural Plast*.

2011;2011:921680.

29. Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte

maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*. 1999;286(5443):1374-7.

30. Otsubo Y, Satoh Y, Kodama M, Araki Y, Satomoto M, Sakamoto E, et al. Mechanical

allodynia but not thermal hyperalgesia is impaired in mice deficient for ERK2 in the central

nervous system. *Pain*. 2012;153(11):2241-52.

31. Alter BJ, Zhao C, Karim F, Landreth GE, Gereau RWt. Genetic targeting of ERK1

suggests a predominant role for ERK2 in murine pain models. *The Journal of neuroscience : the*

official journal of the Society for Neuroscience. 2010;30(34):11537-47.

32. Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, et al.

Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*. 2002;34(5):807-20.

33. Samuels IS, Karlo JC, Faruzzi AN, Pickering K, Herrup K, Sweatt JD, et al. Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(27):6983-95.

34. Pucilowska J, Puzerey PA, Karlo JC, Galan RF, Landreth GE. Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(25):8663-77.

35. Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. 2004;116(3):467-79.

Table 1

	0 h	6 h (vehicle)	6 h (SL327)
pH	7.45 ± 0.03	7.26 ± 0.04	7.32 ± 0.06
PaO ₂ (mmHg)	133.9 ± 2.7	130.7 ± 2.4	134.2 ± 1.9
PaCO ₂ (mmHg)	34.7 ± 4.9	41.7 ± 5.1	37.5 ± 5.0

Table 1 SL327 投与による動脈血液ガスに与える影響

各群間において、pH、動脈血酸素分圧(PaO₂)、動脈血二酸化炭素分圧(PaCO₂)に有意差は見られない。(one way ANOVA, 各群においてP > 0.05; 0 h and 6 h (vehicle) groupではそれぞれn = 7, 6 h (SL327) groupではn = 10. PaCO₂: partial pressure of arterial carbon dioxide, PaO₂: partial pressure of arterial oxygen)

Fig.1

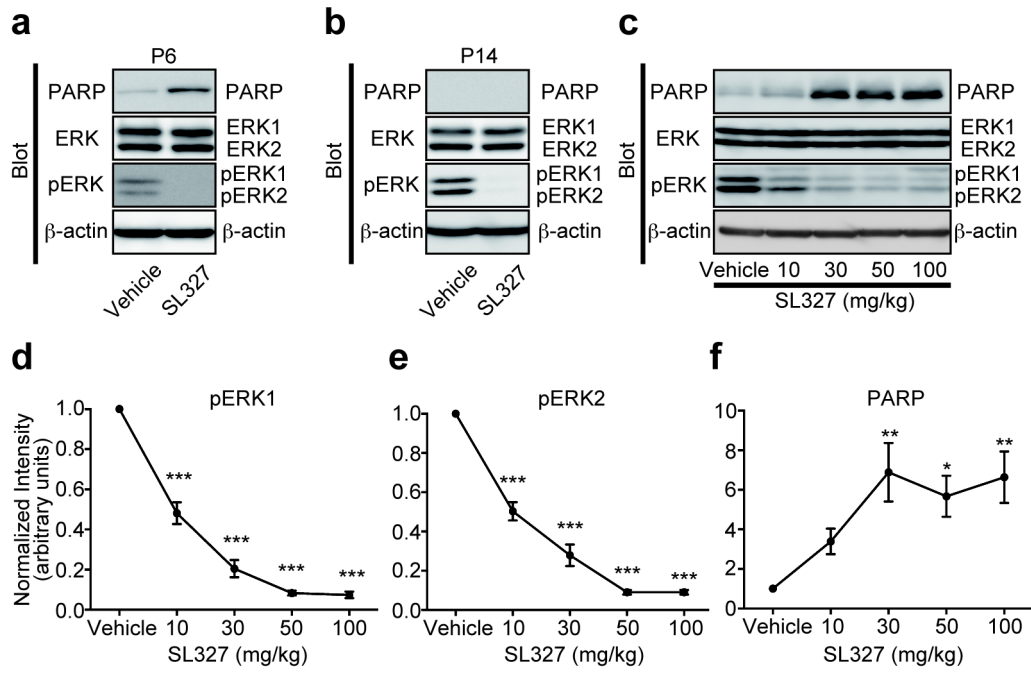


Fig.1 SL327 投与によるアポトーシスと日齢の関係及び SL327 投与量の検討

(a)ウェスタンブロット法による、P6におけるSL327腹腔内投与(50 mg/kg)群と対照(DMSO投与)群との比較。SL327投与群においてアポトーシスを認めるが、対照群では認めない(n = 10 for each)。 (b)P14におけるSL327腹腔内投与群では、アポトーシスを認めない(n = 6 for each)。 (c)P6におけるSL327各投与量(0、10、30、50、100 mg/kg)でのアポトーシス発現程度の検討。 (d)ERK1のリン酸化はSL327投与量が50 mg/kgまでは投与量に比例して減少し、50 mg/kg以上の投与量では変化しない。(e)ERK2のリン酸化はSL327投与量が50 mg/kgまでは投与量に比例して減少し、50 mg/kg以上の投与量では変化しない。(f)アポトーシスは30 mg/kgのSL327投与まで有意な上昇を認めた。内部標準として β -actinを用いた。

データの表記は mean \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (各群n = 7).

Fig.2

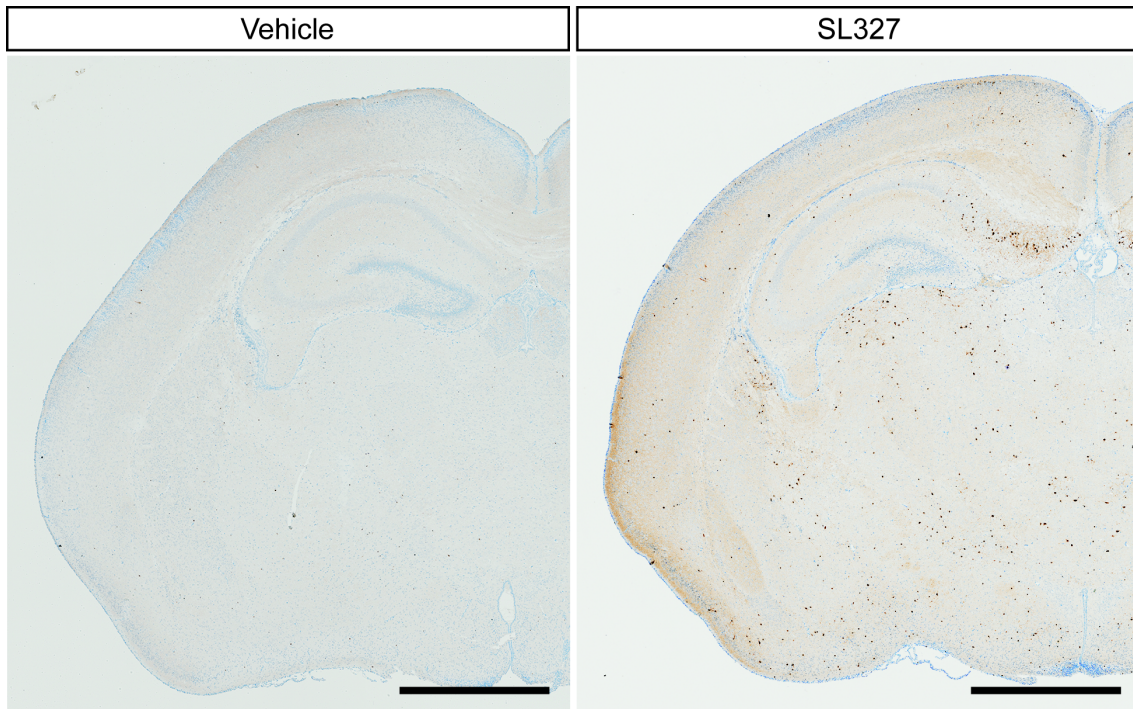


Fig.2 Activated caspase-3 による免疫組織染色像

P6でSL327(50 mg/kg)を投与されたマウスは、対照群と比較して広汎なアポトーシスを来す。茶色の点が Caspase-3 陽性細胞。マウスは薬剤投与 6 時間後に 4%PFA により灌流固定、Scale bars: 1 mm。

Fig.3

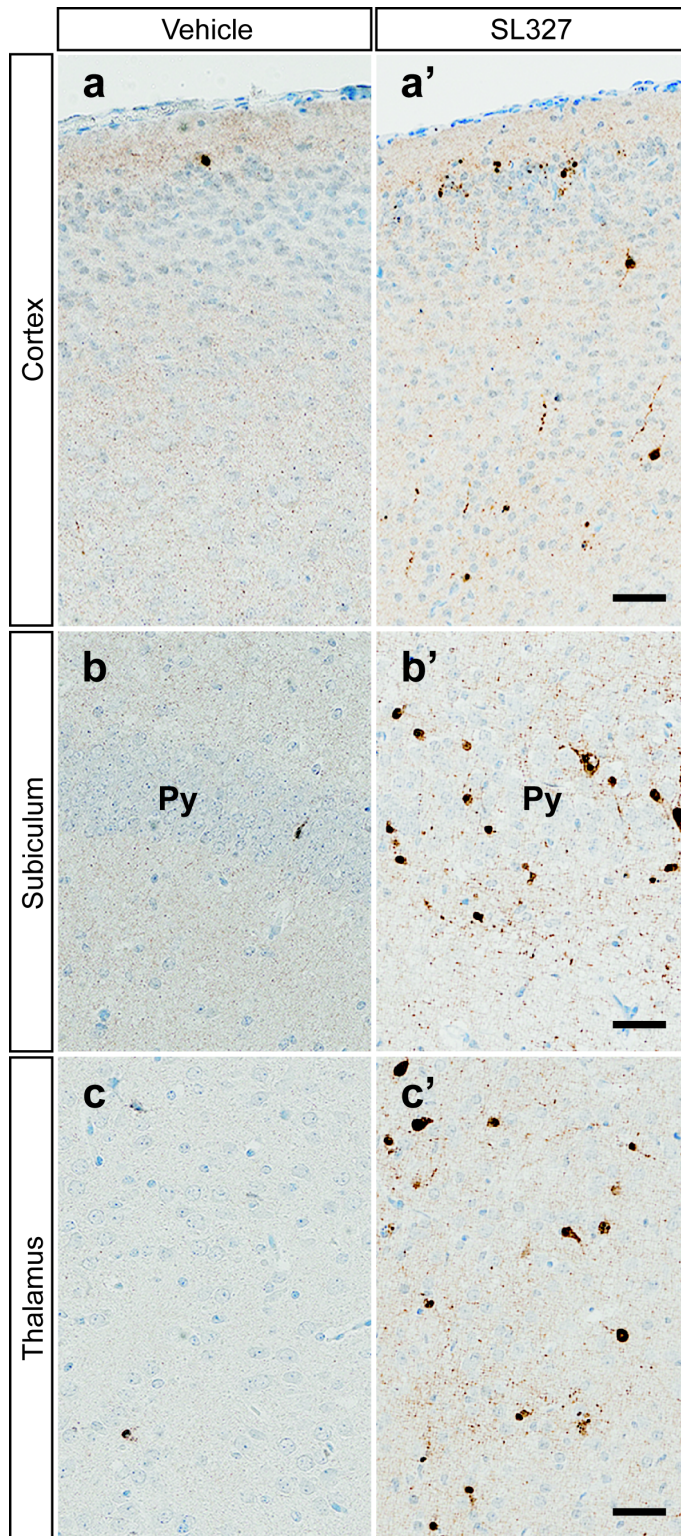


Fig.3 Activated caspase-3 による免疫組織染色像(強拡大)

(a - c) 対照群、(a' - c') SL327 投与(50 mg/kg)群における免疫組織染色拡大像。茶色の点が Caspase-3 陽性細胞。マウスは薬剤投与 6 時間後に 4%PFA により灌流固定、

Scale bars: 50 μ m。

Fig.4

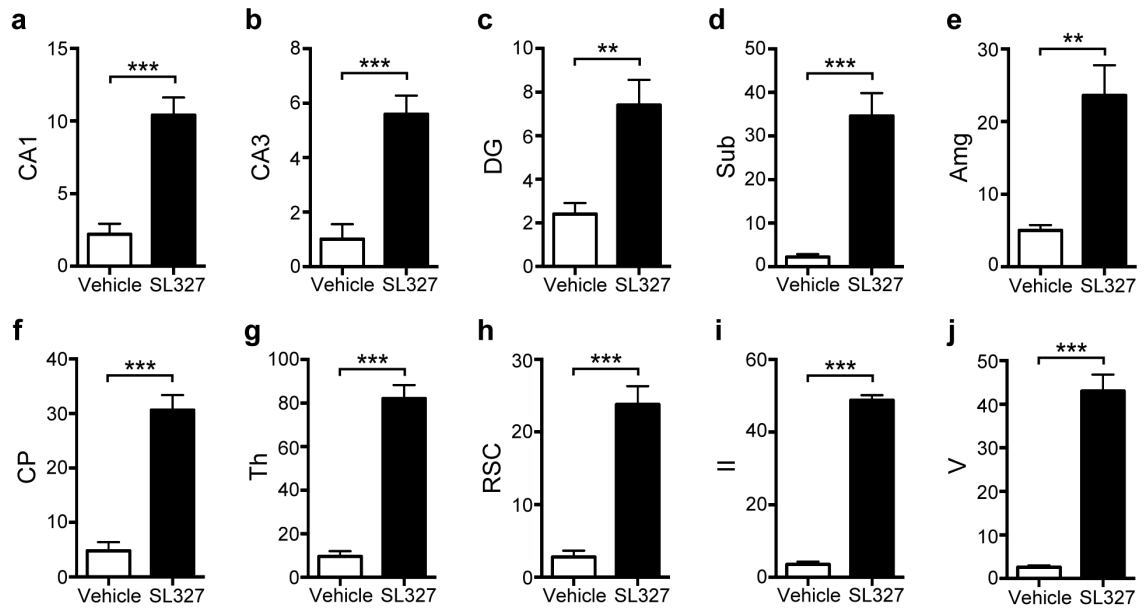


Fig.4 各部位毎の免疫組織染色によるアポトーシスの比較

各部位での caspase-3 陽性細胞数。 (a) CA1 = hippocampal CA1 region, (b) CA3 = hippocampal CA3 region, (c) DG = dentate gyrus, (d) Sub = subiculum, (e) Amg = amygdala, (f) CP = caudate/putamen, (g) Th = thalamus, (h) RSC = retrosplenial cortex, (i) II = layer II in parietal cortex, (j) V = layer V in parietal cortex. データの表記は mean \pm SEM (各群 n = 5). **P<0.01, ***P<0.001.

Fig.5

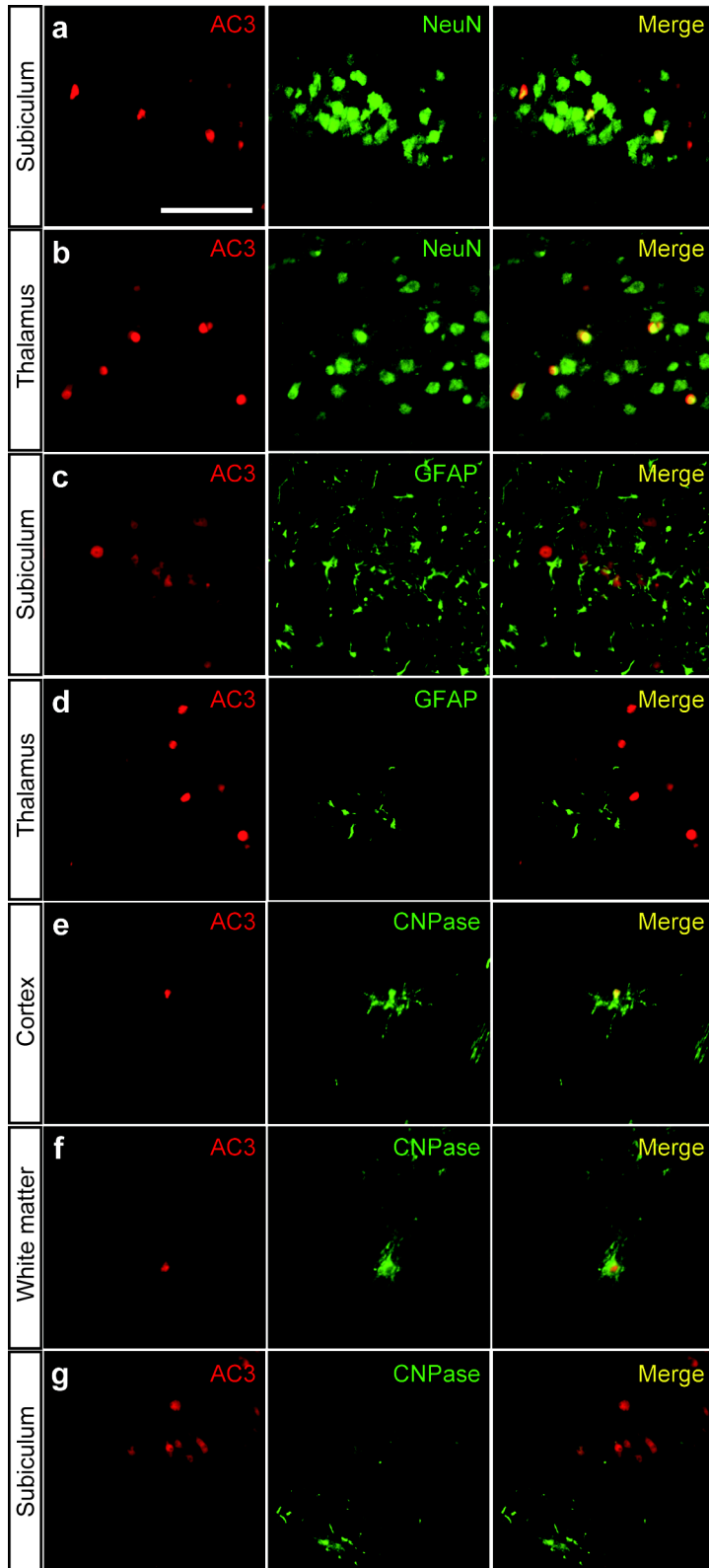


Fig.5 各部位における蛍光二重染色像

SL327投与によるアポトーシスは、主に神経細胞とオリゴデンドロサイトに起こっている。

(a-g) 神経細胞特異的マーカー(a, b), アストロサイト特異的マーカー (c, d), オリゴデンドロサイト特異的マーカー (e-g) とcaspase-3の二重染色像。

Caspase-3 陽性細胞は神経細胞に見られ(a, b)、アストロサイトには見られない(c, d)。

オリゴデンドロサイトにも皮質、白質においてアポトーシスが見られるが(e, f)、海馬台には見られない(g)。 Scale bar: 50 μ m。

Fig.6

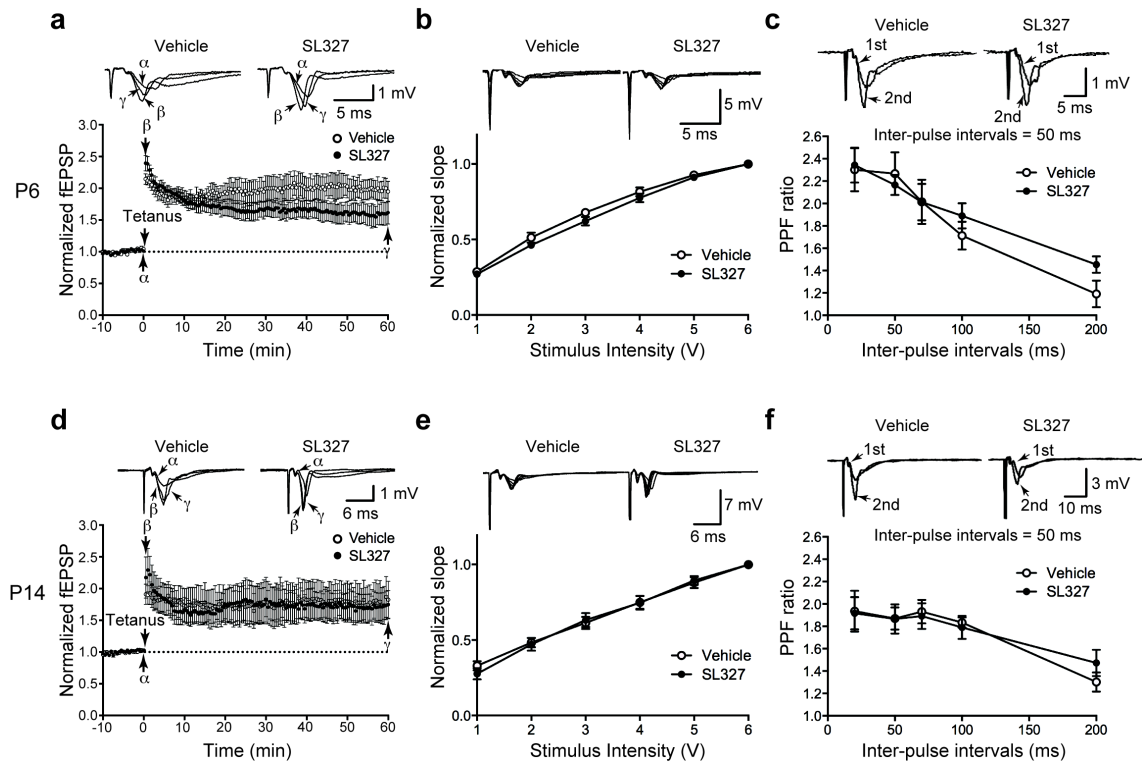


Fig.6 SL327 投与の LTP に与える影響

4週齢マウスにおいて、P6でSL327を投与されたマウスは対照群と比較してLTPの抑制が見られたが、P14で投与したマウスでは見られなかった。P6でSL327を投与すると対照群と比較してLTPが抑制される(各群n = 6) (a-c)。 (a) fEPSPの傾きの経時的変化。 α : テタヌス刺激の直前、 β : テタヌス刺激の直後、 γ : テタヌス刺激の60分後。 (b) 両群間で入出力関係に差はない。 (c) 両群間でPPFに差はない。 (d-f) P14でSL327を投与すると対照群と比較してもLTPに差はない(各群n = 6)。 (d) fEPSPの傾きの経時的変化。 α : テタヌス刺激の直前、 β : テタヌス刺激の直後、 γ : テタヌス刺激の60分後。 (e) 両群間で入出力関係に差はない。 (f) 両群間でPPFに差はない。データの表記は mean \pm SEM.

Fig.7

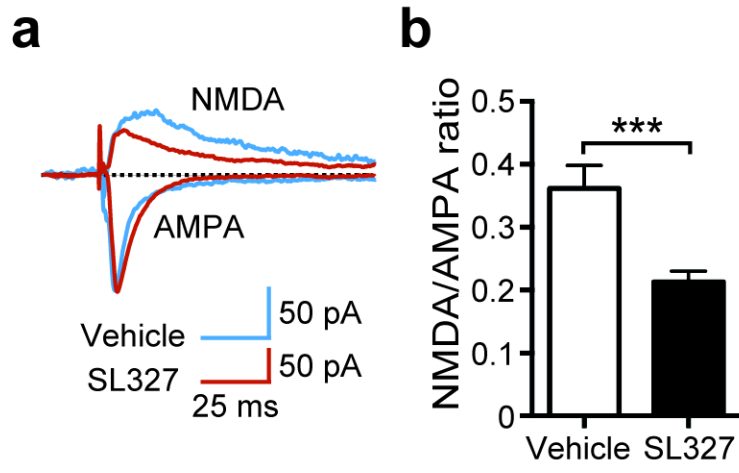


Fig.7 NMDA/AMPA 比

P6 で SL327 を投与した 4 週齢マウスでは、海馬における NMDA/AMPA 比が変化している。(a) ホールセルパッチクランプ法による、海馬 CA1 錐体細胞層での NMDA 受容体および AMPA 受容体由来の電氣的波形(赤:SL327 投与群、青:対照群)。(b) NMDA/AMPA 比。(対照群: n = 13, SL327 投与群: n = 15). データの表記は mean ± SEM. ***P < 0.001.

Fig.8

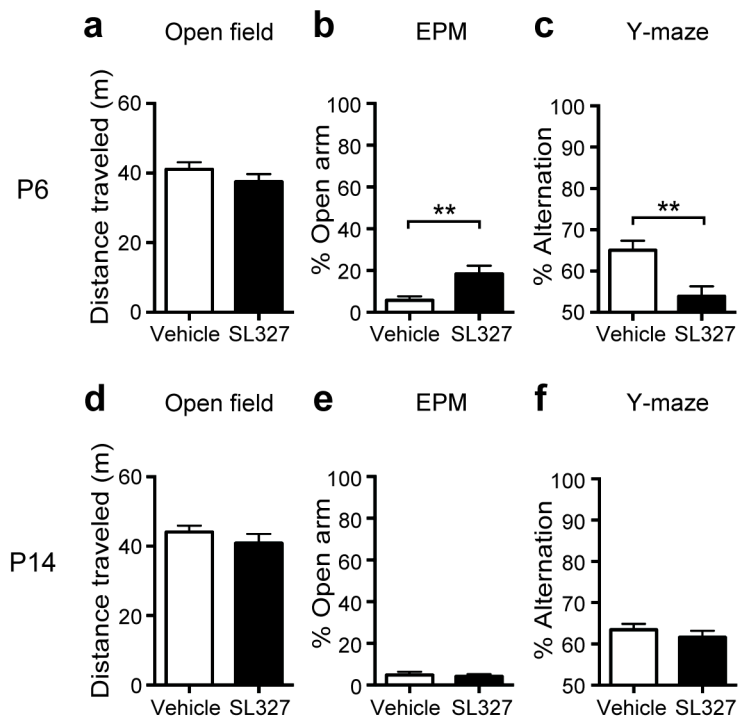


Fig.8 行動学的評価

P14 における SL327 投与は成長後のマウスの行動に影響を与えないが、P6 における SL327 投与は成長後の行動学的異常を引き起こす。(a-c) P6 において SL327 を投与したマウスは成長後に行動異常を来した。(a) オープンフィールドテスト(Open field test)。両群間に有意差は認めない(対照群: n = 14, SL327 投与群: n = 15)。(b) 高架式十字迷路テスト(EPM: Elevated plus maze test)では、SL327 投与群が open arm にいる時間が有意に長い(対照群: n = 13, SL327 投与群: n = 14)。(c) Y 迷路テスト(Y-maze test)。SL327 投与群では、空間作業記憶が障害され交替行動率が低い (対照群: n = 14, SL327 投与群: n = 15)。(d-f) P14 で SL327 を投与しても行動学的異常は来さない。(d) オープンフィールドテストで両群間に差はない (対照群: n = 12, SL327 投与群: n = 14)。(e) 高架式十字迷路テストで両群間に差はない (対照群: n = 12, SL327 投与群: n = 14)。(f) Y 迷路テストで両群間に差はない(対照群: n = 12, SL327 投与群: n = 14)。データの表記は mean ± SEM. **P < 0.01.

Fig.9

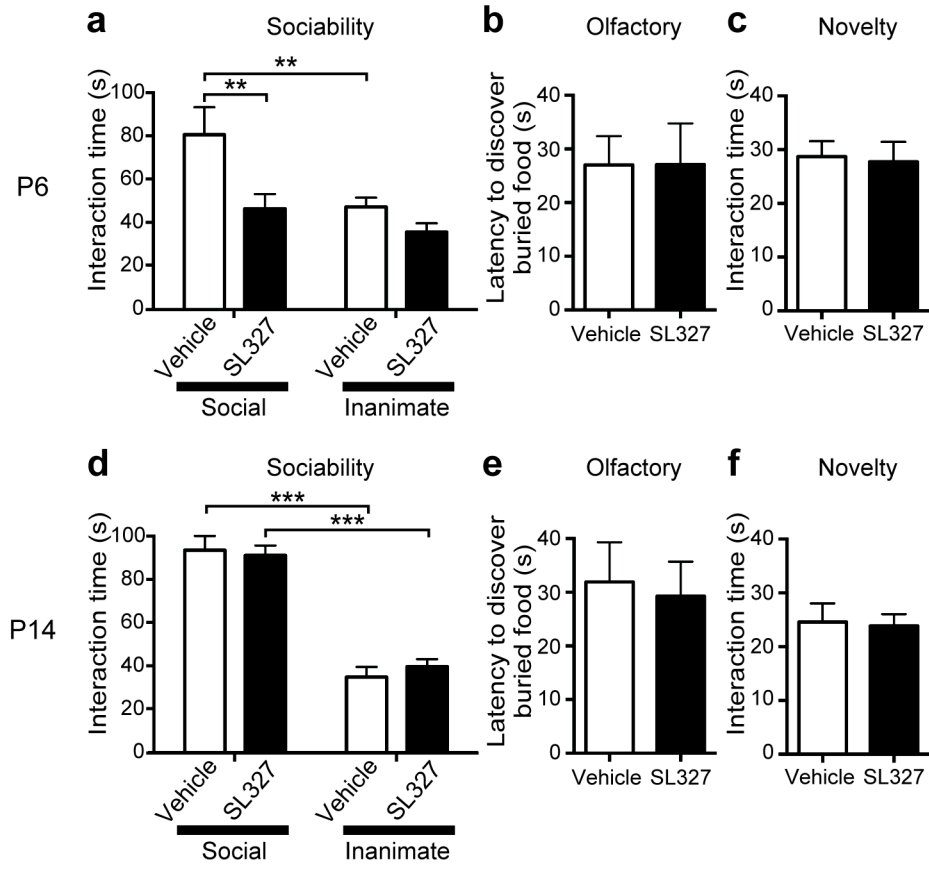


Fig.9 社交性テストによる社会性行動の評価

P14 で SL327 を投与されたマウスは、成長後の社会性行動に異常を来さないが、P6 で SL327 を投与されたマウスは社交性テストにより社会性行動の異常を認めた。(a-c)

P6 で SL327 を投与されたマウスの社交性テスト、オルファクトリーテスト、ノベルティーテストの結果(対照群: n = 13, SL327 投与群: n = 14)。(a) 通常はダミーのぬいぐるみマウスより生きている本物のマウスと長い時間接触する傾向にあるが、P6 で SL327 を投与されたマウスでは生きたマウスと過ごす時間が短い傾向にあった。

(b) オルファクトリーテストに差は見られなかった。(c) ノベルティーテストに差は見られなかった。(d-f) P14 で SL327 を投与されたマウスの社交性テスト、オル

ファクトリーテスト、ノベルティーテストの結果 SL327 (対照群: n = 12, SL327 投与群: n = 14)。(d) P14 で SL327 を投与されたマウスは、対照群と比較して傾向に差は見られなかった。(e) オルファクトリーテストに差は見られなかった。

(f) ノベルティーテストに差は見られなかった。データの表記は mean ± SEM.

P < 0.01, *P < 0.001.

Fig.10

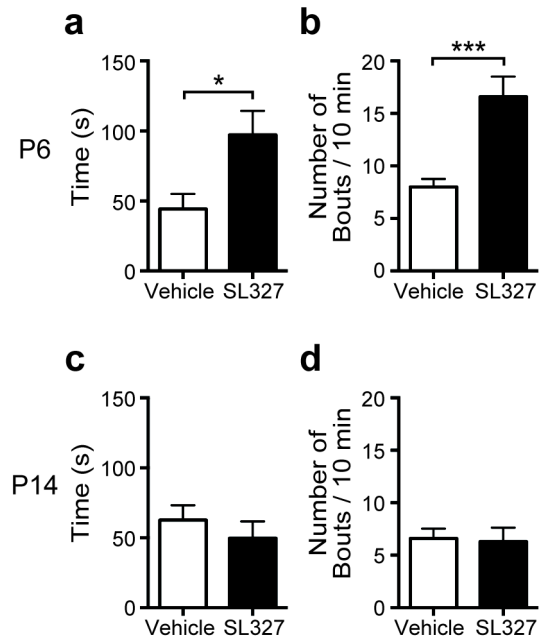


Fig.10 グルーミング行動の評価

P14 で SL327 を投与されたマウスは、対照群と比較してグルーミング行動に変化は見られないが、P6 で SL327 を投与されたマウスはグルーミング行動に費やす時間、回数が増加した。(a, b) P6 で SL327 を投与されたマウスはグルーミング行動に費やす時間、回数が増加した(対照群: n = 10, SL327 投与群: n = 10)。 (a) グルーミングに費やした時間。 (b) グルーミングの回数。 (c, d) P14 で SL327 を投与されたマウスは、対照群と比較してグルーミング行動に変化は見られない(対照群: n = 10, SL327 投与群: n = 10)。 (c) グルーミングに費やした時間。 (d) グルーミングの回数。データの表記は mean ± SEM. **P <0.01.

Fig.11

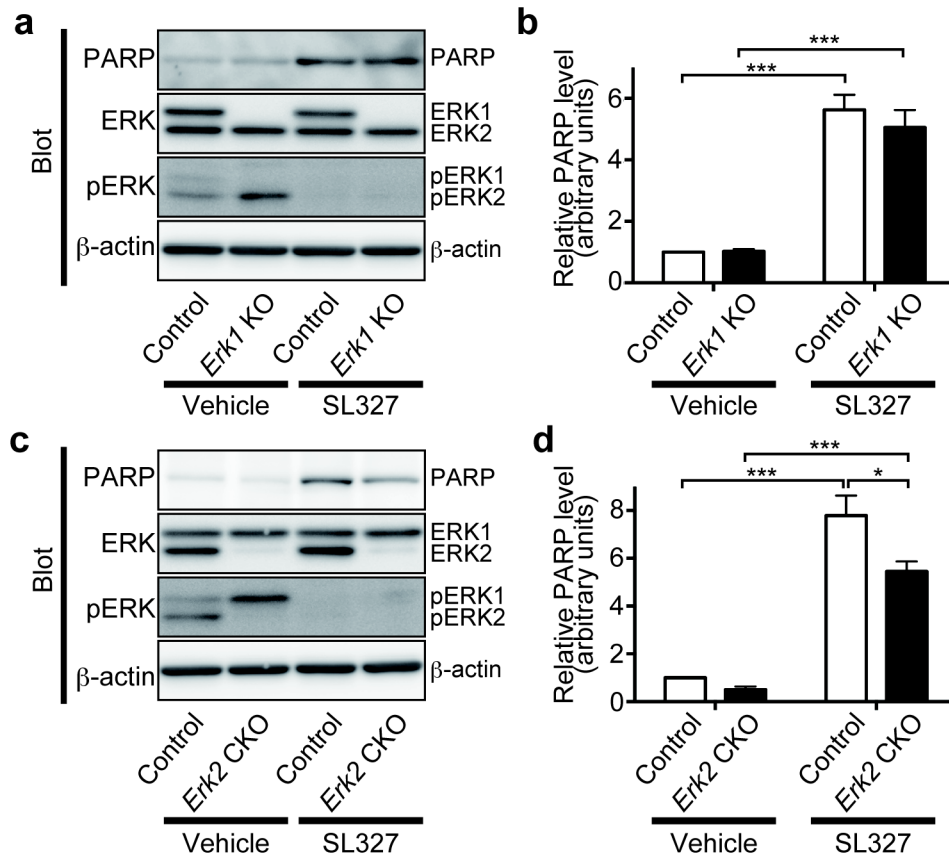


Fig.11 ノックアウトマウスによる ERK アイソフォームの評価

P6マウスでのアポトーシスの生起には、ERK1、ERK2の両方のアイソフォームの活性化阻害が必要である。(a) *Erk1* KOマウスにおけるSL327投与の影響をウェスタンブロット法で評価した結果 (b) SL327を投与した*Erk1* KOマウスと対照群の間に、PARPの程度に差は見られなかった(*Erk1* KOマウス群 (SL327): n = 4, 対照群 (SL327): n = 6)。Vehicleを投与した*Erk1* KOマウスと対照群の間に、PARPの程度に差は見られなかった(*Erk1*KOマウス (vehicle): n = 5, 対照群 (vehicle): n =5)。(c) *Erk2* CKOマウスにおけるSL327投与の影響をウェスタンブロット法で評価した結果。(d) SL327を投与した*Erk2* CKOマウスでは、対照群の間と比較して有意にPARPの程度が低かった(*Erk2* KOマウス (SL327): n = 6, 対照群 (SL327): n =6)。Vehicleを投与した*Erk2* CKOマウスと対照群の間に、PARPの程度に差は見られなかった(*Erk2* KOマウス (vehicle): n = 5, 対照群 (vehicle): n=5)。内部標準として β -actinを用いた。データ表記は mean \pm SEM. *P < 0.05; ***P < 0.001.