

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18257

研究課題名（和文）肥満モデルマウスにおける術後認知機能障害の検討—機序およびその予防—

研究課題名（英文）Examination of postoperative cognitive dysfunction in obese model mice
-Mechanism and its prevention-

研究代表者

内田 洋介（Uchida, Yosuke）

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：00507585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：高脂肪食誘発肥満マウスモデルにおいて、手術や麻酔などが神経炎症および認知機能に及ぼす影響を検討した。結果は、高脂肪食誘発肥満マウスにおいて過去の報告通りアディポサイトカインの1種であるレプチンの増加を認めた。高脂肪食誘発肥満マウスにおいて手術によって海馬における炎症性サイトカインの上昇を認め、神経炎症が増強していた。しかし、行動学試験では術後の認知機能障害を検出することはできなかった。一方で全身麻酔のみを行った群では、神経炎症が増加する傾向を認め、行動学試験において有意な認知機能の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安全な手術医療を提供することは、周術期医療に携わる医療者にとって最大の使命である。手術後に認知機能が低下しやすい患者群として、高齢や肥満などがリスクファクターとなることが分かっているものの、その機序には不明な点が多く医療者を悩ませている現状がある。本研究は高脂肪食誘発肥満マウスを用いた基礎実験によって、そのリスクの機序を解明し、術後認知機能低下の予防や治療につながる糸口を発見することを目的とした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of surgery and anesthesia on neuroinflammation and cognitive function in the high-fat diet-induced obese mice. As a result, leptin, a type of adipocytokine, was increased in the high-fat diet-induced obese mice as previously reported. Surgery increased inflammatory cytokines in the hippocampus and enhanced neuroinflammation in the high-fat diet-induced obese mice. However, behavioral tests failed to detect postoperative cognitive impairment. On the other hand, in the group receiving only general anesthesia, neuroinflammation tended to increase, and behavioral tests showed a significant decline in cognitive function.

研究分野：麻酔学

キーワード：術後認知機能障害 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年広く認知されてきた術後認知機能障害 (Post-Operative Cognitive Decline: POCD) はおよそ 10%超の手術患者に認められると言われ、特に肥満や糖代謝異常などを有する患者では発症頻度が高いとされている。

これまでの基礎研究により POCD は、手術部位からの生体アラミン、DAMP である HMGB1 の放出、HMGB1 刺激によって末梢血液中の骨髄由来単核球から放出される様々な炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-1 β)、中枢神経でのマイクログリアの活性化など、一連の連鎖反応により引き起こされることが明らかになってきた。しかし、未だに POCD の機序には不明な点も数多く残り、またその予防法や治療に関しては未だ確立されておらず大きな課題となっている。

一方、レプチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの 1 種で様々な生理作用を持つが、免疫系に対しては、現在レプチンは炎症性サイトカインの作用を持つ分子として捉えられており、様々な病態に関与することが報告されている。

レプチンは肥満患者で増加すると言われており、肥満と高レプチン血症、肥満と POCD の間にそれぞれ内在する機序を解明することは、実臨床においても極めて有用である可能性が高い。

2. 研究の目的

高脂肪食 (High Fat Diet: HFD) に誘発された食餌誘発性肥満 (Diet Induced Obese: DIO) マウスにおいて、炎症性サイトカインの 1 種である IL - 6 が対照群と比較して海馬において手術後に優位に増加し、同一侵襲刺激に対するマイクログリアの反応性が異常亢進することが分かっている。

一方、肥満に伴う高レプチン血症が肝臓における少量のエンドトキシン刺激に過剰な反応をきたし、非アルコール性肝炎進展に関与することが DIO マウスを用いた実験で報告された。この中で、リポ多糖刺激に対する肝臓内クッパー細胞の反応性が DIO マウスと通常マウスで異なることを示し、この反応性の差異は細胞膜タンパク質 CD14 の発現亢進に起因し、高レプチン血症が CD14 の発現を制御すること示された。

中枢神経内のマイクログリアがクッパー細胞と同様の挙動を示すのではないかと推論し、高レプチン血症に起因する下流シグナルの異常がクッパー細胞において膜タンパク質の異常発現を促すのに類似する病態が、DIO マウスの POCD 発生に不可欠なマイクログリアでも生じている可能性を考えた。

そこで DIO マウスを用い、肥満状態が POCD の病態に不可欠なマイクログリアに与える影響を検証し、POCD のハイリスクである肥満症の脆弱性の下にある機序の解明を進めることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) DIO マウスの確立

DIO マウスの確立に 4 週齢のマウスに HFD (60%脂肪由来カロリー) を 12 週間与えた。対照群の確立には通常食を与えた。モデルマウス確立確認のため体重測定を施行し、血中レプチン濃度測定を行った。

(2) マウス群への介入

DIO マウスと対照群それぞれ手術を行うものを行わないものに群を分けた。手術を行わないものには全身麻酔のみを施行した。手術はこれまでの報告に倣い、脛骨手術を行った。脛骨手術はマウスの後肢脛骨内に髄内釘を挿入した後に脛骨を破砕するもので、下肢の骨折手術を模した侵襲モデルである。

脛骨手術は全身麻酔下に行うため、得られる結果に全身麻酔の作用が加味されてしまう点と、行動科学試験に影響を与える可能性が懸念された。そこで、手術侵襲を模倣する実験系として、HMGB 1 の腹腔内投与を施行した。対照群には Vehicle のみを投与した。

(3) 行動学試験

行動学試験として、電気刺激による恐怖記憶を保持できているか確認する Trace Fear Conditioning (TFC) を行った。TFC は、電気刺激による training を手術 30 分前にいき、記憶の確認として術後 3 日目に、電気刺激を行ったのと同じ環境において無刺激で観察を行う context test を行った。マウスは恐怖条件付けがない通常状態では、積極的に探索行動を行うが、電気刺激の恐怖記憶が残存すると探索行動が低下 (freezing) する。4 分の観察時間に対する freezing 時間を計測ソフトで計測し、%freezing として測定して評価した。行動学試験に関しては、脛骨手術による運動機能低下の影響を取り除くため、手術侵襲に代わって、手術侵襲により上昇するとされる HMGB1 を腹腔内投与して行動学試験も合わせて行った。

(4) 分子生物学的評価

全身炎症や神経炎症を評価するため炎症性サイトカイン濃度を、肥満に伴うレプチン変化を追跡するため、ELISA 法により血漿中や組織中の濃度測定を行った。

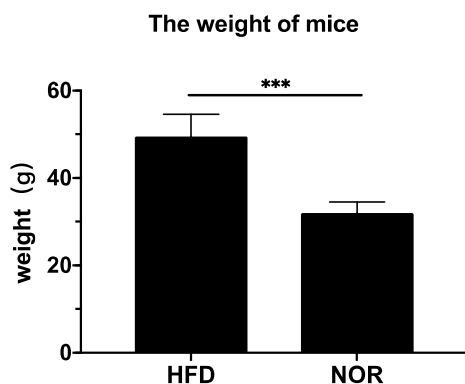
(5) 統計解析

2 群比較は t 検定を用い、3 群比較は One way ANOVA で有意であった場合 post hoc test を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) マウス体重の変化

マウスに HFD と通常食を 12 週間与えたところ、HFD 与えた群は通常食を与えた群 (NOR) と比較して有意に体重が増加し、高脂肪食誘発性肥満を達成することができた (平均体重 49.5g vs 32.0g)。

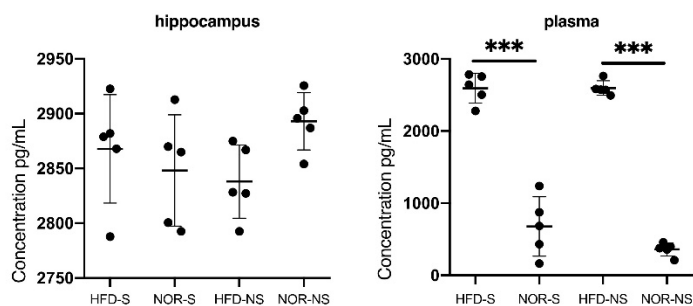


(2) レプチン濃度測定

肥満に伴うレプチン上昇を確認するため、血漿中および海馬組織中のレプチン濃度測定を行った。血漿中 (plasma) では、手術を行った HFD 群 (HFD-S) と NOR 群 (NOR-S) との比較、麻酔のみ行い手術を行わなかった HFD 群 (HFD-NS) と NOR 群 (NOR-NS) との比較においてレプチン濃度

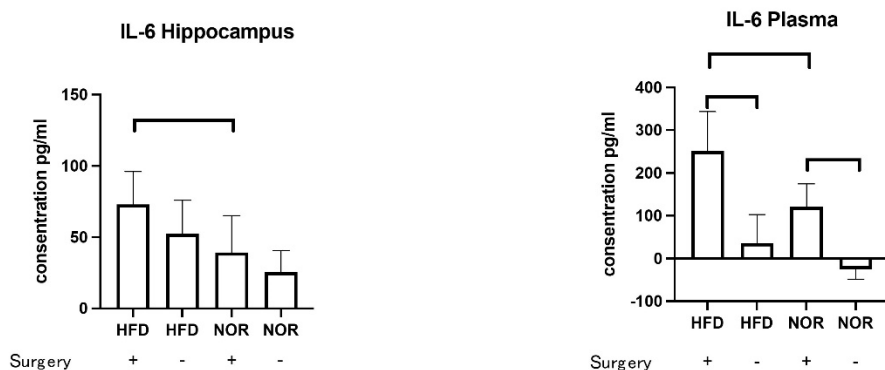
の上昇を認めた。海馬組織中 (hippocampus) では有意なレプチン濃度の差を認めなかった。

leptin



(3) 炎症性サイトカイン測定

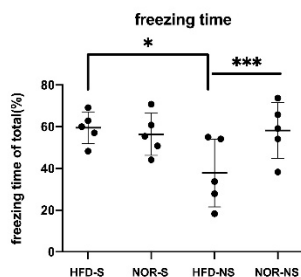
炎症性サイトカインの1種である IL-6 の測定を行った。血漿中および海馬組織において、手術侵襲は HFD 群において NOR 群と比較して有意に IL-6 上昇を引き起こすことが分かった。



(4) 行動学試験 (脛骨骨折モデル)

TFC を 4 群で行った。HFD を与えた 2 群間の比較において (HFD-S vs HFD-NS) 手術を行った群の方がすくみ時間 (freezing time) が増加し認知機能が改善するのが確認され予想とは異なる結果となった。手術を行わず全身麻酔のみ行った 2 群間の比較においては (HFD-NS vs NOR-NS) HFD を与えた群において認知機能低下を示唆する freezing time の低下を認めた。全身麻酔下での手術と全身麻酔単独では、認知機能に異なる結果をもたらすことが示唆された。

TFC

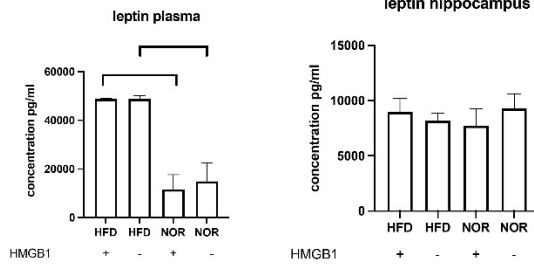


(5) HMGB1 投与

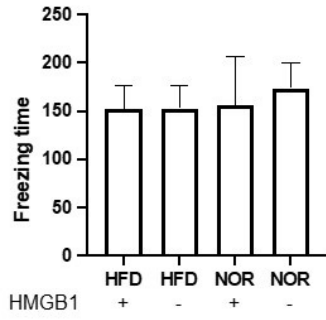
全身麻酔が実験結果にもたらす影響を排除するため HMGB1 をマウス腹腔内に投与し、脛骨手術モデルと同様にデータ收拾を行った。

レプチン濃度：HMGB1 投与は脛骨手術モデル同様に、血漿中および海馬組織においてレプチン濃度に影響を与えなかった。

LEPTIN



行動学試験：HMGB1 投与後に TFC を行ったものの、4 群間で差を認めなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	王 イ (Wang Wei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関