

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09240

研究課題名（和文）認知予備力とミトコンドリア機能の脆弱性との関連を探る

研究課題名（英文）Exploring the relationship between cognitive reserve and vulnerability of mitochondrial function

研究代表者

三澤 知子（Misawa, Tomoko）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20831390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、イソフルラン全身麻酔下で開腹手術（「麻酔+開腹手術」）処置したP8系統の老化促進モデルマウス（SAM-P8）を利用し、術後せん妄様行動変化や神経伝達変化の解析とミトコンドリア機能異常発現の有無から、認知の予備力の解明を目指した。「麻酔+開腹手術」処置6時間後のSAM-P8は、認知機能異常様の行動変化発現傾向を示したが、統計学的な有意差はなかった。前頭皮質と海馬の両方において、セロトニン代謝に関与するA型モノアミン酸化酵素の発現量と活性に有意な変化が観察された。脳内ミトコンドリア機能解析は検討途中となり、研究期間中に行うことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外科治療を受ける高齢患者に好発する術後せん妄（POD）は、術後急性に発症する精神症状および意識障害を呈する一般的な術後合併症である。現状、POD予防・治療のための薬物療法は十分ではない状況にある。この発症にミトコンドリア機能の脆弱性が関与することを示すことができれば、ミトコンドリアに作用するPOD発症予防法・治療法の開発が期待される。また、そのような薬剤は、神経変性疾患治療薬への応用も考えられる。本研究では神経特異的なミトコンドリア機能評価系構築が途中までとなり、研究目的は達成できなかったが、本研究を継続することに価値と意義はあると思われる。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to elucidate cognitive reserve using the P8 strain of Senescence-Accelerated Mouse (SAM-P8) and the laparotomy under isoflurane general anesthesia (Iso/Ope) treatment. We attempted to analyze postoperative delirium-like behavioral changes and neurotransmission changes, as well as the presence or absence of mitochondrial dysfunction.

Six hours after the Iso/Ope treatment, the SAM-P8 showed a tendency to develop cognitive disorder-like behavior, but there was no statistically significant as compared with intact. Significant changes were observed in the monoamine oxidase type A protein level and its activity, which is involved in serotonin metabolism, in both the frontal cortex and hippocampus. Brain mitochondrial function analysis was still under consideration and could not be performed during the research period.

研究分野：医歯薬学、外科系臨床医学、麻酔科学

キーワード：術後せん妄 老化促進モデルマウス 神経伝達物質 モノアミン酸化酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周術期中枢神経合併症である術後せん妄(POD)と術後認知機能障害(POCD)の発症率の高さと発症後の回復率の低さは高齢患者で著しい。その理由の一つとして、「認知予備力(Cognitive Reserve)の低下」が推測されている。「認知予備力」は、一般的に、「脳の加齢変化や病理に拮抗して認知機能を維持することのできる能力」で、「若い時の教育、仕事の複雑さ、中年期以降の精神活動により規定される」と言われている。近年、脳イメージング技法を用いて、脳の大きさ、脳の微細構造、シナプスやニューロンの数など、客観的な指標による神経学的測定が試みられているが、実際には何のどのような機能のことを示すのか未だ不明なままである。

認知症を予防できる9つの要因を示す論文が発表されている¹⁾。9つの要因をまとめると、脳の認知予備力を増やすこと(中等教育の未修了)、孤立しないこと(中年期の聴力低下、うつ、社会的孤立)、生活習慣を改善すること(喫煙、運動不足、高血圧、肥満、2型糖尿病)が重要であった。我々は、ここに挙げられた疾患や症状から、細胞の活性化と細胞の十分なエネルギー産生能力が重要であると考え、細胞小器官「ミトコンドリア」の関与を考えた。既に、認知症とミトコンドリア機能障害の関連性は、脳の老化や神経変性疾患を中心として、さまざまな報告がなされている²⁾。このような背景の下、我々は、「認知予備力の大小は、認知機能に關与する神経細胞が細胞障害性刺激を受けた際のミトコンドリア機能の脆弱性の度合いである」という仮説をたてた。

我々はこれまでに、イソフルラン全身麻酔下で開腹手術(「麻酔+開腹手術」)処置した若齢マウスが手術4時間後に、新奇物体認識試験で認知機能異常様行動変化を示すこと³⁾と水探索試験で注意障害様の行動変化を示すこと⁴⁾など、せん妄様の行動変化を示すことを見出した。さらに、上記行動変化発現時に、マウス前頭皮質や海馬においてセロトニン代謝回転の有意な上昇が生じていることも観察した⁵⁾。このことから、「麻酔+開腹手術」処置4時間後のマウスは、神経伝達変化を伴ってPOD様行動変化も示す、「PODモデル動物」になりうると考えていた。また同様に他のグループにおいても「麻酔+開腹手術」を行った若齢マウスが、処置6-9時間後にY迷路試験で認知機能異常様の行動変化を引き起こすことが観察されている⁶⁾。そこで我々は、早期に加齢症状を呈する老化促進モデルマウス(Senescence-Accelerated Mouse: SAM)や「麻酔+開腹手術」手技を利用することで、上記仮説を検証できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、「認知予備力の大小は、認知機能に關与する神経細胞が細胞障害性刺激を受けた際のミトコンドリア機能の脆弱性の度合いである」という独自に立てた仮説を非臨床レベルで検証することを目的とした。具体的には、早期の加齢で学習・記憶障害を示すP8系統のSAM(SAM-P8)と、P系統の対照とされているR1系統(SAM-R1)に、SAM-P8が認知機能異常を発症するとされる少し前のタイミングで「麻酔+開腹手術」を行い、両系統間でのPOD様の行動変化や脳内神経伝達変化を確認した上で、目的とする神経特異的なシナプトソームの単離とその精製画分のミトコンドリア機能評価を行うことにした。SAM-P8が老化に伴い、POD様症状誘発刺激に対して脆弱となることで発現症状の悪化を示し、伝達変化を示す神経においてミトコンドリア機能が低下していることを確認できれば仮説立証とした。

最初に、SAM-P8に「麻酔+開腹手術」処置前を行い、若齢マウスに見られるような認知機能異常様の行動変化と神経伝達変化が見られるかどうかの検討を行った。併せて、SAM-R1の対照動物としての妥当性の検討をおこなった。また、PODの誘発因子となる心理的ストレスの影響を検討する目的で、SAM-P8の「麻酔+開腹手術」処置前に拘束ストレスを負荷する群も設けた。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と群構成

11週齢の雄性SAM-P8とSAM-R1を購入した(日本SLC株式会社)。SAM-P8は、一般的に24週齢くらいから学習・記憶障害を呈するといわれていることから、障害を発症する少し前の21週齢まで飼育したマウスを実験に用いた。また、SAMは他個体への激しい攻撃行動を示すため、仕切りを設けたケージ内で個別に入れた。これらを制御された環境下(室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、点灯7:00の12時間明暗サイクル)で、市販の飼料および水を自由に与えて飼育した。

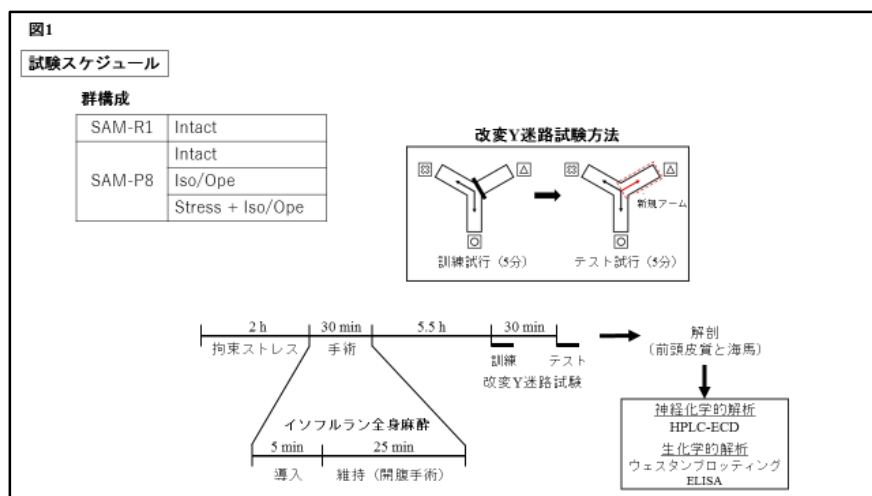
SAM-R1は無処置(SAM-R1-Intact)のみで、SAM-P8は試験開始時に無処置群(SAM-P8-Intact)、「麻酔+開腹手術」群(SAM-P8-Iso/Ope)、「拘束ストレス負荷+麻酔+開腹手術」群(SAM-P8-Stress+Iso/Ope)に無作為に割り当てた(図1)。

(2) ストレス負荷、麻酔+開腹手術処置

拘束ストレス負荷は、マウスを換気シリンダーチューブ($\phi 3.6 \times 10 \text{ cm}$)内に保定した後、マウスの頭を上にしてチューブを垂直位置に置き、2時間放置した。

全身麻酔は、透明なアクリルチャンパー内で2.5-3%のイソフルランで5分間麻酔導入した後、マウスをチャンパーの外に移動し、麻酔マスクを装着して1.4-1.6%イソフルランで25分間麻酔

維持した。開腹手術は、25 分間の麻酔維持中にマウス下腹部を 1.5 cm 程度正中切開し、取り出した小腸を指先で 1 分間軽く擦って元に戻した。閉腹の際、腹筋縫合後には、EMLA クリーム (2.5% リドカインおよび 2.5% プリロカイン) を切開創に塗布し、その後皮膚を縫合した。手術後のマウスは麻酔維持時間終了後にホームケージに戻した。



(3) 行動評価

マウスの認知機能は変更 Y 迷路試験で評価した。試験装置は、それぞれ長さ 40 cm、上部の幅 12 cm、下部の幅 3 cm、高さ 15cm の 3 本のアームを備えた灰色のポリプロピレン製のものを使用した。試験は、「麻酔+開腹手術」終了後 3 時間 30 分後に行う訓練試行と、その 30 分後に行うテスト試行の 2 つを行った。訓練試行では、3 本のアームのうちの 1 つを閉じた状態でマウスを迷路内に置き、2 本のアームを 5 分間自由に探索させた。テスト試行では 3 本のアームすべてを開いた状態で再び迷路に置き、自由に探索させた。この時、訓練試行時に閉じたアームを新規アームと定義した。マウスの軌跡はビデオ行動解析システム EthoVision (Noldus) に取り込み、テスト試行時に全アーム進入回数に対する新規アームに進入した回数の割合と、新規アームに滞在した時間の割合について解析した (図 1)。

(4) 脳内神経伝達物質濃度測定

行動評価後のマウスを二酸化炭素で安楽死させた後、速やかにマイクロ波に曝露した。頭蓋骨から脳全体を取り出した後、前頭皮質と海馬を採取した。採取した脳組織の重量を測定し、解析時まで -80°C で保存した。

各組織サンプルを、氷冷下、超音波破砕機 (VP-050N, TAITEC) を使用して、内部標準であるイソプロテレノールを含む 0.1 N 過塩素酸溶液中でモノジナイズした。ホモジネート後の組織を氷冷下で 30 分放置し、その後 4°C 、 $18,000 \times g$ で 15 分間遠心分離して上清を分取した。上清中のアセチルコリン (Ach) 含量、モノアミン (ノルエピネフリン: NE, ドパミン: DA, セロトニン: 5-HT) およびそれらの代謝物含量 (NE: MHPG, DA: DOPAC と HVA, 5-HT: 5-HIAA) は、電気化学検出器を備えた HPLC システム (HPLC-ECD、EICOM) で測定した。

HPLC-ECD は、データプロセッサおよび自動インジェクタ (EICOM M-510) を装備した EICOM HTEC-500 を使用した。Ach 測定の分離カラムには、EICOMPAK AC-GEL ($4.6 \times 150 \text{ mm}$ 、EICOM) を使用し、カラム温度 33°C 、12% メタノール、400 mg/l 1-デカンスルホン酸ナトリウムおよび 50 mg/l EDTA-2Na を含む 50 mM 炭酸水素カリウム溶液からなる移動相を流速 0.45 ml/min で流して分離した。電気化学検出器には白金作用電極を用い、印加電位は Ag/AgCl 参照電極上で $+450 \text{ mV}$ とした。モノアミン測定の分離カラムには、EICOMPAK SC-5ODS ($3.0 \times 150 \text{ mm}$ 、EICOM) を使用し、カラム温度 25°C 、16% メタノール、190 mg/l 1-オクタンスルホン酸ナトリウムおよび 5 mg/l EDTA-2Na を含む 0.1 M 酢酸-クエン酸緩衝液 (pH 3.5) からなる移動相を流速 0.45 ml/min で流して分離した。電気化学検出器には炭素作用電極を用い、印加電位は Ag/AgCl 参照電極上で $+750 \text{ mV}$ とした。各含有量は、組織湿重量 1 グラムあたりのナノグラムとして計算し、モノアミンについては代謝物との比率から代謝回転率の算出も行った。

(5) ウェスタンブロッティング

行動評価後のマウスを二酸化炭素で安楽死させた後、氷冷下で速やかに前頭皮質と海馬を採取した。組織にプロテアーゼ阻害剤を含む HEPES 緩衝スクロース溶液を添加し、ホモジナイズした後、 4°C 、 $500 \times g$ で 5 分間遠心分離して上清を分取した。上清の蛋白質濃度は、BCA キット (PIERCE) を使用して測定し、Laemmli サンプルバッファーで可溶化した。各調製サンプルからのタンパク質 10 μg を電気泳動により 10% SDS-PAGE ゲル上で分離した。分離したタンパク質を、セミドライブロッティングシステムを使用して、ポリニフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore) に転写した。PVDF 膜を、0.1% Tween 20 (TBST) および 5% スキムミルクを含有するトリス緩衝生理食塩水とともに室温で 1 時間インキュベートし、続いて目的の抗体とともに 4°C で一晩インキュベートした。A 型モノアミン酸化酵素 (MAO-A、ab126751、Abcam)、セロトニ

ントランスポーター (5-HTT、29186-1-AP、Proteintech)、小胞モノアミントランスポーター2 (vesicular monoamine transporter 2: VMAT2、sc-374079、Santa Cruz Biotechnology)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH、#2118、Cell Signaling Technology) 抗体を抗体希釈液 (Can Get Signal solution 1、TOYOBO) を用いて希釈した(すべての一次抗体について 1:1000)。膜を洗浄後、3% スキムミルクを含む TBST で二次抗体とともに1時間インキュベートした。目的の蛋白質バンドを化学発光オートラジオグラフィ (ECL キット、Cytiva) で検出し、Amersham Imager 600 (Cytiva) でデジタル画像を取得した後、免疫反応性バンドの密度を画像解析ソフトウェア(Image J)で解析した。目的タンパク質の発現レベルは、同一膜上のハウスキーピングタンパク質 GAPDH の発現量との比率として計算した。

(6) 組織中モノアミン酸化酵素活性測定

前頭皮質におけるモノアミン活性の測定は、ウェスタンブロットティングのサンプル調製において蛋白質濃度を測定したホモジネート遠心分離後の上清を用いて、市販のアッセイキット (BioAssay Systems) で行った。

(7) 統計解析

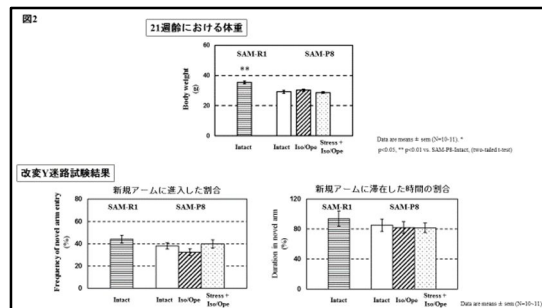
データは全て平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析はすべて SPSS ソフトウェア (IBM) を用い、両側 t 検定により解析した。P 値が 0.05 より小さい場合に統計学的に有意とした。

4. 研究成果

(1) 行動解析

実験は 21 週齢のマウスを用いて行なった。正常老化を示す SAM-R1-Intact は SAM-P8-Intact に比べ体重が有意に大きかった (データ未掲載)。改変 Y 迷路試験では、新規アームに進入した回数の割合と新規アームに滞在した時間の割合共に両者間に有意な差は認められなかった (図 2)。また、試験中の総移動距離や総進入回数を指標とした自発運動量においても両者間に差は無かった (データ未掲載)。

SAM-P8 において、Iso/Ope および Stress + Iso/Ope 群と Intact 群の間に有意な差はなく、本試験系で Iso/Ope 処置による認知機能異常様の行動変は検出できなかった (図 2)。



(2) 神経化学的解析

HPLC-ECD によるモノアミンおよびそれらの代謝物濃度測定において、SAM-R1-Intact と SAM-P8-Intact の間に、前頭皮質 5-HIAA、5-HT 代謝回転率、海馬 5-HIAA (図 3) の他、前頭皮質 NE、MHPG、海馬 MHPG、NE 代謝回転率 (データ未掲載) に有意な差が観察された。

SAM-P8 における群間比較では、5-HT 神経伝達に顕著な変化が観察され (図 3) Iso/Ope 処置による 5-HT 代謝回転率の増加、さらにはストレス負荷による 5-HT 代謝回転率増加の助長現象が見られた (表)。その他、前頭皮質においてストレスによる DA 代謝回転の増加が認められたが、Iso/Ope 処置による NE や DA の神経伝達変化は認められなかった。また、Ach 含量においても前頭皮質と海馬の両部位で Iso/Ope やストレス負荷による変化は認められなかった (表)。

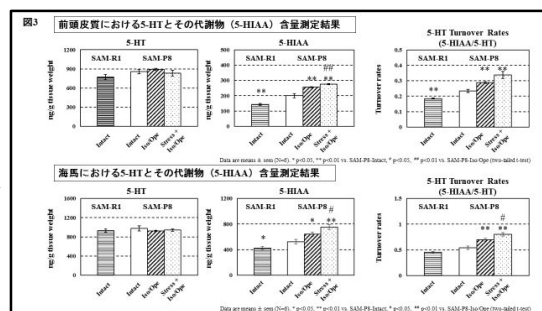


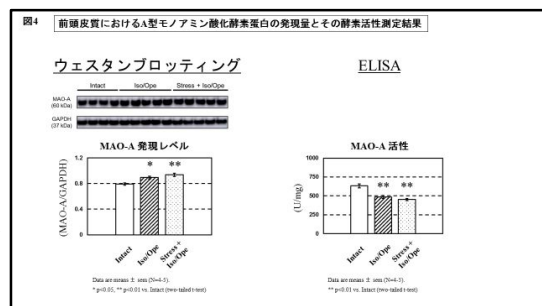
表: SAM-P8マウスにおける前頭皮質 (FC) と海馬 (Hp) の神経伝達変化

	FC		Hp	
	Intact vs. Iso/Ope	Iso/Ope vs. Stress + Iso/Ope	Intact vs. Iso/Ope	Iso/Ope vs. Stress + Iso/Ope
Norepinephrine (NE) turnover	NS	NS	NS	NS
Dopamine (DA) turnover	NS	↑	—	—
Serotonin (5-HT) turnover	↑↑	↑ (p = 0.06)	↑↑	↑
Acetylcholine	NS	NS	NS	NS

↑ p < 0.05, †† p < 0.01 (two-tailed t-test)

(3) 生化学的解析

神経化学的解析において、顕著な変化が見られた 5-HT 神経伝達に關する蛋白についてウェスタンブロットティングによる発現量解析を行った。前頭皮質組織から調製したサンプルを用いて、MAO-A、5-HTT、VMAT2 の発現について検討したところ、MAO-A においてのみ Iso/Ope 処置による発現上昇が観察された。しかしながら Stress 負荷によるさらなる発現上昇は認められなかった (図 4)。



また、市販の ELISA キットによる前頭皮質ホモジネートを用いた MAO-A 活性測定では、Iso/Ope 処置群の有意な MAO-A 活性低下が認められた (図 4)。

(4) 研究結果の考察および今後の検討課題

本研究において、SAM-P8-Intact 群の対照として同週齢の SAM-R1-Intact 群を設定した。当初は SAM-R1 と SAM-P8 に行動や神経伝達に差がないことを示したうえで、両者の Iso/Ope 処置により発現する変化が異なることを見出し、仮説証明への道筋を作ることを考えていた。実験に用いた 21 週齢において、両者間の自発運動量に差は無いものの、体重および NE や 5-HT 神経伝達に明らかな差があることが判明し、我々の研究で SAM-R1 を SAM-P8 の対象動物とすることは不適切であると思われた。このため実験計画変更が必要となった。

SAM-P8 において、Iso/Ope 処置 6 時間後に、改変 Y 迷路で有意な認知機能の低下は認められなかったが、若齢マウスで観察された⁵⁾と同様の 5-HT 代謝回転率の増加が観察された。MAO-A の発現量増加とその活性減少結果から、Iso/Ope 処置によりセロトニン神経伝達が活性化し、MAO-A の発現の上昇と、活性のフィードバック阻害が起こっていることが示唆され、この現象が、POD の病態生理の一面を示すのではないかと考えた。また、拘束ストレス負荷による、セロトニン代謝回転率上昇は、ストレスが POD 誘発因子であり、拘束ストレス負荷が POD モデル作製に有用なツールになりうると考えられた。

今回、想定外の SAM-R1 の特性から仮説検証試験を実施するには至らなかった。今後は試験デザインを再構築することと並行して、未だ途上にある神経特異的シナプトソーム精製に利用する抗体の選定の検討を継続して行う予定である。

<参考文献>

- 1) Livingston G, et al. Lancet. 2017; S0140-6736: 31363-31366.
- 2) Grimm A, et al. J Neurochem. 2017; 91: 1262-1268.
- 3) 青山正、科研費報告書 (研究課題/領域番号 26861228)
- 4) 森厚詞 ANESTHESIOLOGY® 2018 学会発表データ
- 5) 森厚詞、科研費報告書 (研究課題/領域番号 21K08967) .
- 6) Peng M, et al. Sci Rep. 2016 Jul 20;6:29874.

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
研究分担者	森 厚詞 (Mori Atsushi) (80771980)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	

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