

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08949

研究課題名（和文）不眠に伴う恐怖記憶定着と循環障害への免疫監視機構関与と麻酔薬修飾効果に関する研究

研究課題名（英文）The role of immune surveillance system in fear memory constitution and circulatory disturbance according to sleeplessness, and the effects of anesthetics

研究代表者

木下 浩之（Kinoshita, Hiroyuki）

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70291490

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）：思春期マウスでの恐怖記憶定着が体血管の血管内皮機能障害を引き起こす機序と妊娠高血圧患者と正常妊産婦の抱く不安が、血管内情報として何らかの物質の血中レベルを上昇させるかを明らかにすることを目的とした。当初は、その機序に及ぼす免疫監視機構と麻酔薬の修飾効果を検証する計画であった。しかしながら、恐怖記憶定着マウスの大動脈での内皮機能障害を結論するまでの十分なデータは最終的には取得できていない。一方、正常妊婦と妊娠高血圧合併妊婦で、それぞれの血中オレキシンレベルを測定したところ、妊娠高血圧妊婦ではオレキシンレベルが有意に上昇していることが明らかとなった。しかしその発生機序については不明なままである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

恐怖記憶がある時間窓、すなわちある年齢層の動物モデルで心血管ストレスを発生するかを明らかにする重要性を提案した点、さらに、不安を合併する妊産婦、特に、高血圧合併妊婦で発生する血管内異常である物質の関与を示唆した点は意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：The current study was designed to examine whether fear memory constitution in mice of early adolescence induces disturbed endothelial function in the systemic artery, and if anxiety in pregnant women with and without cardiovascular stress (hypertension) cause intravascular changes in levels of certain substances in clinical practice. Initially, we conducted whether immune surveillance system and anesthesia affect the above results. However, we could not conclude the fear memory constitution induces endothelial dysfunction in the systemic arteries. We only noted in pregnant women with hypertension have increased levels of orexin although the mechanistic insight into the increment was unclear.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：恐怖記憶 血管内皮機能 妊産婦

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

思春期マウスでは、吸入麻酔薬で恐怖記憶定着(心的外傷後ストレス障害 = PTSD)が増強することを申請者らは明らかにした(PLoS ONE 2016)。しかし、これら麻酔薬によるPTSD発症がどのような細胞内機序で思春期というライフサイクルで発生するかは、依然不明である。疾患に関する不安をはじめ種々の精神的ストレスに曝されている術前患者は、不眠に陥ることも稀でない。しかし、麻酔前の不眠が、PTSD発症や心血管機能に及ぼす影響やその機序は未知である。さらに、麻酔薬投与が、不眠により修飾を受けたPTSDや心血管機能異常にどのように影響するかについても知見がない。T細胞Th17サブセットで産生されるIL-17は、細菌感染防御に役割を果たす免疫監視機構の一つである。しかし、IL-17は、予想外に酸化ストレスを発生させて血管内皮機能を障害し、心血管病態発症の因子となる可能性が示唆された(Circ Res 2016)。申請者らも、生体内局所の炎症が、体血管で酸化ストレスを発生させて内皮機能障害を引き起こすことを報告した(Int J Cardiol 2016)。T細胞上のProgrammed Cell Death 1 (PD-1)膜タンパクは過剰なT細胞活性化を抑制するが、PD-1遺伝子をノックアウトすると、IL-17活性化と同時に恐怖記憶定着が強まるのが偶然発見された(Nature Immunol 2017)。PD-1は、IL-17抑制の一方で、過剰な記憶定着阻止で不安を和らげる機能を持つと思われる。しかし、IL-17免疫監視機構とPTSD発症あるいは心血管機能障害の相互関連及び、これらに対するPD-1作用の意義は、未知である。さらに、これら連関での不眠や麻酔薬の修飾作用に関する知見もない。妊婦は出産への不安など精神的ストレスに曝されていることから一種のPTSDモデルとみなされる(J Jpn Acad Midwif 2017)。一方、申請者らが報告したように、妊婦では酸化ストレス増大に伴う内皮機能障害を発生する可能性がある(Heliyon 2017)。しかし、ヒトの恐怖記憶や不安の構築、心血管機能障害におけるIL-17免疫監視機構の関与についての知見はなく、これらの連関における不眠や麻酔薬の修飾作用も未知である

### 2. 研究の目的

(1)申請者らの発見した麻酔薬による恐怖記憶定着(PTSDモデル)がライフサイクルで異なるのは、IL-17免疫監視機構の活性化(IL-17)あるいは抑制(PD-1)の脳内レベルが思春期、成体あるいは高齢で相違することで説明可能か、これら恐怖記憶定着が不眠で修飾されその作用に各ライフサイクル間での違いはあるか、その相違はIL-17免疫監視機構の活性化あるいは抑制の程度やバランスで説明できるか、を明らかにする。

(2)PTSDモデル動物の体循環で発生する内皮機能障害に対し不眠の修飾作用が認められるか、その機序に脳内および体循環内IL-17免疫監視機構の関与はあるか、この内皮機能障害を惹起するストレス信号を脳から体循環への伝達する機序にエンドセリン1などの内皮機能抑制物質や血管内皮機能を制御するmiRNAの関与はあるか、を明らかにする。

(3)IL-17免疫監視機構の活性化あるいは抑制が、不眠や麻酔薬で修飾された恐怖や不安、血管内皮機能や心機能異常に関与するかを、周術期を中心に臨床的に明らかにする。特に、各ライフサイクルの産婦人科病態、すなわち、思春期の卵巣腫瘍手術、妊娠期の帝王切開術、閉経後の子宮ガン手術などを受ける周術期患者を対象とする。

### 3. 当初の研究の方法

(1)生後3週(思春期)、20週(成体)、1年(高齢)の雌C57BL6マウスを、単に1週間飼育した対照マウスと睡眠障害作製装置内(今回申請)で1週間かけて不眠状態にしたマウスに振り分ける。申請者らが確立した現有の行動解析システムで、これらマウスの恐怖記憶定着を3日間連続で観察する(PLoS ONE 2016)。初日、暗室を連結した明室に各マウスを入れ順化、2日目、マ

ウスが明室から暗室に入室するまでを獲得時間とし暗室内で電気ショックを加えて直ちに空気2 L/分（対照群）あるいはそれにセボフルラン2.5%（セボフルラン群）を混じり2時間吸入させる。3日目、マウスが明室から暗室に入る潜時を保持時間（恐怖記憶が強力な個体は延長）とする。ELISA法を用いて、実験終了後に各個体の脳室より採取した脳脊髄液(CSF)でIL-17、摘出した海馬ライセートでPD-1レベル測定する。一部の固定脳スライス標本では、海馬でのIL-17およびPD-1分布を免疫染色で検討する。また、IL-17、IL-17モノクローナル抗体およびPD-1 inhibitor 1の全身投与は、これらの個体の恐怖記憶定着や脳内IL-17およびPD-1レベルや分布に影響するかを調べる。さらに、生後3週（思春期）では、PD-1ノックアウトマウス（恐怖記憶定着増強モデル）でも麻酔薬と不眠が恐怖記憶定着に及ぼす作用と脳内IL-17およびPD-1レベルと分布について、上述と同様な検討を行う。

(2)(1)での検討と同様に、生後3週（思春期）、20週（成体）、1年（高齢）の雌マウスを、対照マウスと不眠状態マウスに振り分け、記憶実験終了後に大動脈を摘出する。申請者らの方法論（Int J Cardiol 2016）で、この血管の内皮機能（等尺性張力変化、アセチルコリン）、活性酸素種レベル、活性酸素種産生酵素NADPHオキシダーゼ発現を評価する。また、各個体からの採取血清中IL-17および摘出大動脈ライセートPD-1レベルを測定し、固定大動脈スライス標本でのIL-17およびPD-1分布を調べる。また、IL-17、IL-17モノクローナル抗体およびPD-1 inhibitor 1の全身投与が、これら個体の大動脈内皮機能や血清IL-17あるいは血管内PD-1レベルや分布に影響するかを調べる。さらに、生後3週（思春期）では、PD-1ノックアウトマウスでも上述と同様な比較検討を行う。次いで、(1)で作成した各PTSDモデルマウスの海馬および血管で、各ライセートを用いエンドセリン1をELISA法で、循環を制御するmiRNA（miRNA-99aなど）レベルをRT-PCRで調べる。海馬と血管でのレベル上昇あるいは低下傾向が同一の物質について血清中又はリンパ球中レベルを測定し、IL-17やPD-1の他に恐怖記憶定着に派生し血管へ伝播する血管障害惹起物質やその抑制因子を推測する。さらに、上述の検討で内皮機能を改善した物質が、この血管障害惹起物質あるいはその抑制因子の海馬、血清あるいはリンパ球中、血管中レベルや分布を低下もしくは上昇させるかを明らかにする。

(3) 思春期の卵巣腫瘍手術、正常および病的妊娠の帝王切開術、閉経後の子宮ガン手術などの各ライフサイクルの患者で以下を検討する。DSM-5での不眠およびPsychological function test（Arch Womens Ment Health 2013）での恐怖や不安の周術期評価、臨床的血管内皮機能検査および血中酸化ストレスマーカー（d-ROM）レベル（Heliyon 2017 で申請者が報告）、血清でのIL-17 および摘出血管（腫瘍血管、胎盤血管、子宮血管）ライセートでのPD-1 レベルとの相関を麻酔前後の差を含め検討する。可能であれば研究期間中に、すでに基礎研究でIL-17を抑制する物質として示唆されているエイコサペンタエン酸投与が、これらの対象患者の不眠、精神ストレスや血管機能異常を改善するか否かも明らかにし、現状で患者投与可能な物質が患者予後を改善する治療戦略の一部となりうるかについても調べる。以上より、不眠、精神ストレスが血管機能異常に及ぼす作用が、ライフサイクル間で異なり、また、それが麻酔による影響を受けるか、を臨床的に明らかにする。

#### 4. 研究成果

研究代表者 木下浩之の科学研究費に関わる主たる研究施設を徳島大学医学部から浜松医科大学医学部へ移行し、移行手続きと機器のセッティングを行うのに時間を要した。申請者が確立した現在の行動解析システムで、これまで行ってこなかった生後3週（思春期）のC57BL6マウスの麻酔薬が関与しない恐怖記憶定着を3日間連続で観察した。すなわち、初日、暗室を連結した明室に各マウスを入れ順化、2日目、マウスが明室から暗室に入室するまでを獲得時間とし、恐

怖記憶定着群では暗室内で電気ショックを加える。3日目、マウスが明室から暗室に入る潜時を  
保続時間（恐怖記憶が強力な個体は延長）とした。これにより、麻酔薬を追加吸入させない場合  
でも本週齢の個体でも恐怖記憶は確実に定着することが明らかとなった。また、これに関連して  
搬入した行動解析システム使用時の明室の照度を変更し修正した。さらに、これら個体の記憶実  
験終了後に、大動脈を摘出しこれまでの我々のpreliminary dataと合致して、内皮機能障害が実  
際に発生しているかをまず検証する試みを行った。結果として、過去の研究結果を反映するデー  
タが約半数えられるにとどまっており、これについては追加実験が必要と判断している。一方、  
婦人科患者での臨床研究では、まず正常妊婦と妊娠高血圧合併妊婦で、それぞれの血中オレキシ  
ンレベルを測定したところ、妊娠高血圧妊婦ではオレキシシンレベルが有意に上昇していること  
が明らかとなった。本データと血管内酸化ストレスとの関係や血管内皮機能の相関を交えて追  
加データを取得し、本研究に関する論文を執筆する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaishi K, Kinoshita H, Kawashima S, Kawahito S	4. 巻 10
2. 論文標題 Human vascular smooth muscle function and oxidative stress induced by NADPH oxidase with the clinical implications.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1947-1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10081947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitou, T, Watanabe K, Kinoshita H, Iwasaki A, Owaki Y, Matsushita H, Wakatsuki A	4. 巻 83
2. 論文標題 Hypoalbuminemia is related to endothelial dysfunction resulting from oxidative stress in parturients with preeclampsia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nagoya J Med Sci	6. 最初と最後の頁 741-748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18999/nagjms.83.4.741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	中島 芳樹 (Nakajima Yoshiki) (00252198)	浜松医科大学・医学部・教授  (13802)	
研究分担者	川人 伸次 (Kawahito Shinji) (60284296)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯科麻酔科学分野）・教授  (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	渡辺 員支  (Watanabe Kazushi)  (80281187)	愛知医科大学・医学部・教授     (33920)	

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