

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16533

研究課題名（和文）単一前脳基底細胞のゲノム網羅的遺伝子発現解析から迫る手術後せん妄の機序解明

研究課題名（英文）Single-cell Whole-transcriptome Analysis in Rat Basal Forebrain for Elucidating the Molecular Mechanism in Postoperative Delirium

研究代表者

紺野 大輔（Konno, Daisuke）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20876479

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：手術後せん妄の発症機序は未だ不明である。本研究では、前脳基底細胞(BFB: basal forebrain)に着目し、BFBの遺伝子発現変化を捉えることで手術後せん妄の分子機序を解明する。全身麻酔下腹部手術を施行したマウス(S群)、全身麻酔のみのマウス(A群)、無処置のマウス(N群)において、高架式十字迷路を用いた行動実験を行い、S群とA群でせん妄様の行動変容を認めた。3群のBFBからmRNAを抽出、遺伝子発現解析を行い、147遺伝子で有意な発現変化を確認した。特に中枢型アセチルコリン性受容体をコードするchrna3遺伝子の発現は、せん妄様行動後にBFB内で5.3倍に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術後せん妄は、入院期間の延長・認知機能障害の残存・死亡の増加に繋がる。もっとも研究されてきた仮説は海馬での炎症モデルであるが、分子レベルでの詳細な脳内機序は現在、ほとんど明らかになっていない。本研究の独自の点は、BFBに着目したことであり、BFBにおける遺伝子発現変化を観察した研究は皆無であった。本研究は、せん妄様行動を呈したマウスのBFBにおける全遺伝子発現量を観察した初の研究であり、147遺伝子の有意な発現変化を確認できた。申請者は継続して研究を続けており、本研究が手術後の認知機能の維持および健康寿命の延長とともに、本邦の手術医療の長期成績の向上に繋がると確信している。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of postoperative delirium remains unknown, and no effective preventive or curative treatment is available. To elucidate the molecular mechanism of postoperative delirium, we focused on the basal forebrain (BFB), which cholinergically projects to the cerebral cortex, thalamus, hippocampus, and hypothalamus, and examined the changes in BFB gene expression.

We observed that mice undergoing abdominal surgery under general anesthesia (group S), those under general anesthesia only (group A), and untreated mice (group N) exhibited delirium-like behavioral changes in the S and A groups compared with those in the N group in an elevated plus-maze behavioral experiment. mRNA was extracted from the BFB of the three groups and gene expression was analyzed. Notably, the expression of Chrna3, which encodes a central acetylcholine receptor distributed across the synapses, increased 5.3-fold in the BFB following delirium-like behavior (adjusted  $p < 0.001$ ).

研究分野：せん妄

キーワード：せん妄 術後せん妄 遺伝子解析 前脳基底細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

術後せん妄(POD: postoperative delirium)とは精神の動揺, 注意力障害, 幻覚, 妄想, 錯覚, 無秩序思考などで特徴づけられ, 外科領域では手術後の患者でしばしば遭遇する. POD はとくに ICU で患者の 10-50% に発症するとされ, たとえば東北大学病院では 2020 年, 261 例の心臓血管外科症例のうち 117 例(45%)が CAM-ICU 陽性となり, POD と診断されている. POD には有効な予防や根治的な治療はなく, 現状ではハロペリドールやデクスメトミジンなどの静脈麻酔薬を用いた短期間の鎮痛・鎮静が対症療法として行われているのみである (Crit Care Med 2018). この POD を発症すると, 短期的には離床の遅れ, 入院期間の延長, 入院時死亡の増加に繋がり, 中長期的には認知機能障害の原因となり, 最終的に社会復帰にも影響を及ぼしてしまう (Am J Surg 2017).

これまでせん妄の脳内機序は基礎研究では神経炎症が病態の基盤ではないかと考えられてきた (Anesth Analg 2019). もっとも研究されてきた仮説は海馬での炎症モデルで, 遺伝子発現変化から惹起されるマイクログリアの活性化が有力な POD の機序として報告されている (Front Aging Neurosci 2019). しかし海馬での炎症モデルだけでは POD の理解には程遠く, POD の分子レベルでの詳細な脳内機序は現在, ほとんど明らかになっていない.

集中治療領域でよく用いられるステロイド, ジゴキシン, フロセミド, 硝酸イソソルビドなどは強い抗コリン作用を有し, これらの薬剤はせん妄の発症や重症化に関与することが古くから知られている (Am J Psychiatry 1992). そこで本研究では, 認知機能や情動記憶に関与する大脳皮質, 視床, 海馬, 視床下部へコリン作動性に投射している前脳基底部(BFB: basal forebrain) (図 1) (Front Aging Neurosci 2015)に着目し, BFB のブローカ対角帯やマイネルト基底核に豊富に存在するコリン作動性ニューロンが POD の Key Regulator であるという独自の仮説を想起した. このコリン作動性神経系は睡眠からの覚醒に関与していることも報告されており, 麻酔覚醒の変容にも影響を及ぼしている可能性がある (Pharmacol Res 2019). そこで BFB におけるすべての遺伝子発現変化を捉えることこそが, POD の分子機序を解明する契機になると考えた.

### 2. 研究の目的

本研究の目的は POD の脳内機序の遺伝子発現レベルでの解明である. まずは BFB 内のコリン作動性ニューロンとその支持細胞のゲノム網羅的な遺伝子発現変化と, マウス POD 様行動の関連を明らかにする. 本研究により, POD の詳細な機序を明らかにすることで, その予防と根治的な治療に繋がる. 本研究により申請者は手術患者の手術後の認知機能の維持および健康寿命の延長とともに, 本邦の手術医療の長期成績の向上に繋がると確信している.

### 3. 研究の方法

#### 1) マウス POD モデルの確立

本研究は C57Bl/6 系雄性マウスを用いて行う. イソフルラン吸入麻酔下に下腹部を手術したマウス(POD マウス群: S 群)で, 高架式十字迷路試験により, せん妄様行動を定量評価する. 比較対照群として無処置のマウス(無処置群: N 群), イソフルラン曝露のみを施したマウス(麻酔群: A 群)を設定する. マウスの処置への割り付けは無作為化する.

#### 2) マウス BFB における遺伝子発現解析

行動実験の結果, せん妄行動を強く呈した時点で, それぞれの前脳基底部(BFB)の脳切片を切り出す. その後, キットを用いて全 mRNA を抽出, シークエンスを行い, 得られた FASTQ ファイルをクオリティチェックして問題ないことを確認する. 続いて HISAT2 で mapping し, String Tie で発現量解析を行う.

### 4. 研究成果

#### 1) マウス POD モデルの確立に関して

当初, 比較的若年(7-10 週齢)のマウスを用いて行動実験を行った, 行動実験 1 日目から行動変容を確認することが出来た. よってマウス POD モデルを確立することが出来たと考えた.

更なる精度の高い POD モデルを確立するために, POD の危険因子として最も知られている高齢というファクターを追加するべきと考え, 24 週齢以上の壮年~老齢のマウスを用いて同様の実験を行ったところ, 仮説通り行動実験 3-5 日目に非常に強い行動変容を呈することを確認できた. 比較的高週齢マウスを用いることで, 精度の高いマウス POD モデルを確立することが出来た.

#### 2) マウス BFB における遺伝子発現解析に関して

比較的若年齢マウスの行動実験 1 日目に, BFB の脳切片を切り出し, 全量 mRNA を抽出した. 得られた全遺伝子発現特性のうち, 統計学的に有意に変化していたのは 147 遺伝子で, とくにシナプスに分布する中枢型アセチルコリン性受容体をコードする chrna3 遺伝子の発現は, せん妄様行動後に BFB 内で 5.3 倍に増加していた(adjusted  $p < 0.001$ ). ただし, 他の遺伝子の変容は大きくなく, 想定していた遺伝子変容は得られない事が分かった.

更なる検討を加えるにあたり、改めて高週数（24 週以上）の高齢マウスを用いて再度行動実験を行うと、A 群、S 群ともにせん妄様行動の変容が若年マウスに比べて大きいことが分かったため、最も行動変容が大きかった行動実験 4 日目に改めて BFB 脳切片を切り出し、全 mRNA を抽出し、現在シーケンス提出した段階である。本追実験を行う事で、新たな見地を得られると考えている。

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〕

研究担当者は集中治療医として東北大学病院集中治療室に勤務している。本研究期間はコロナウイルス感染症の蔓延の時期に重なっており、集中治療室におけるコロナ患者対応に追われ、十分な研究時間を確保することができなかった。  
また、東北大学医学部附属動物実験施設は、2021度より2023年度まで改修工事期間となっていたため実験自体を途中、中断しなければならなかった。

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------