

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11091

研究課題名(和文) がん患者における術後認知機能障害の発症機序の解明と予防法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanism of postoperative cognitive dysfunction in cancer patients and establishment of prevention method

研究代表者

佐野 文昭 (Sano, Fumiaki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：10752826

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)：高齢者のがん患者への麻酔症例数の増加により、術後認知機能障害(POCD)は喫緊の課題である。本研究では、がんにおける吸入麻酔薬によるPOCDの発症機序を動物モデルにより解明し、ヒトでの予防法を確立することを目的とした。

メラノーマ細胞をC57BL/6Jマウスに接種し、6日目に新規物体認識試験で認知機能障害を認めた。がん細胞接種のみにより認知機能障害が発症したため、これをがんの認知機能障害モデルとし、サイトカインを検討したが明らかな上昇を認めず、発症機序は今後の課題となった。POCDを糖尿病モデルマウス(TSODマウス)で検討したところ、麻酔後2日目に発症し、麻酔後7日目でも確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究では、POCDの発症を基礎疾患ではなく手術侵襲の程度や麻酔深度などで解析しており、がんとPOCDの相関は不明であった。高齢のがん患者の増加が予想されるため、がん患者におけるPOCDについては今後重要性を増してくると思われる。

本研究ではマウスががんの接種のみで認知機能障害を認めたため、ヒトでもがん患者での認知機能障害を評価・対応する必要があると思われる。また、糖尿病モデルマウスではPOCDが持続することも確認できたため、同じく高齢者に多い糖尿病でもPOCDについての検討が急務である。

研究成果の概要(英文)：With the increase in the number of anesthesia cases for elderly cancer patients, elucidation of the cause of postoperative cognitive dysfunction (POCD) and establishment of preventive measures are urgent issues. The purpose of this study was to elucidate the pathogenesis of POCD by inhalational anesthetics in cancer using an animal model and to establish a preventive method in humans.

When C57BL / 6J mice were inoculated with melanoma cells and confirmed by novel object recognition tests, cognitive dysfunction was recognized 6 days after the inoculation. Since cognitive dysfunction developed only by inoculation of cancer cells, we used this model as a model of cognitive dysfunction in cancer, and examined inflammatory cytokines, but no clear increase was observed. Then, POCD was examined in diabetic model mice (TSOD mice), and POCD that developed on the second day after anesthesia was confirmed on the seventh day after anesthesia.

研究分野：麻酔科学、集中治療医学

キーワード：術後認知機能障害 がん 麻酔

1. 研究開始当初の背景

高齢者に対する麻酔件数は増加している。周術期管理の質は向上しているが、高齢者では術後高次脳機能障害 (postoperative cognitive dysfunction: POCD) を発症する場合がある。POCD は、糖尿病や老化など中枢神経系機能低下が発症因子として知られており (Crosby, et al. 2011)、高齢者や糖尿病患者の麻酔の際には細心の注意が必要である。しかし、POCD の発症機序や予防法は未だ不明なため、今後高齢化が進むにあたり、それらの解明は喫緊の課題である。

また、本邦では、がん罹患する人が国民の 1/3 から 1/2 に到達しており、がんは一般的な疾患となっている。がんは全身の機能に影響を与えるが、特に認知機能障害やせん妄などの高次脳機能障害が臨床上、大きな問題となっている。ところが、がんの POCD への影響を検討した研究はほとんどなかった。

これまでの研究では、POCD の発症を基礎疾患ではなく、手術侵襲の程度や麻酔深度などで解析しており、がんと POCD 発症の相関は不明である。高齢のがん患者の増加が予想されるため、がん患者における POCD 発症率の調査は、今後の術後管理において重要である。

POCD 発症のメカニズムについては、様々な検討が行われている。認知機能には、アストロサイトが重要な役割を果たすことが知られている。また、アストロサイトは吸入麻酔薬の作用点の候補として知られていることから、POCD は麻酔薬によるアストロサイトの機能抑制により生じる可能性がある。糖尿病、加齢、認知症により、海馬のアストロサイト機能が脆弱となり、さらに吸入麻酔薬による機能の破綻が POCD 発症に関与すると想定でき、がん患者でも同様の現象が生じる可能性があると考えた。

そこで本研究では、がん患者において吸入麻酔薬が POCD を誘発するか検討を行い、そのメカニズムにアストロサイトの機能変化が関与するかを明らかにするため、まず、がんモデル動物の認知機能に対する吸入麻酔薬の影響を、行動学的・生化学的・免疫組織化学的・電気生理学的手法を用いて検証し、POCD モデルとなりうるか確認することとした。

また、アデノ随伴ウイルスベクターを特定の薬物 (クロザピン N-オキシド ; CNO) のみで細胞を活性化または抑制する受容体 (DREADDS) を海馬アストロサイトに導入し、人為的にその機能を調節した際のがんモデル動物の POCD 発現を検討する。さらに、*in vitro* において、がん病態 (炎症) を模倣する。アストロサイトを培養した際も吸入麻酔薬による細胞内情報伝達系の活性化変化を検討し、POCD 発症の分子メカニズムを明らかにすることを予定した。

最終的に、手術を受けたがん患者の POCD 発症率を調査し、吸入麻酔薬に POCD 発症の危険性があるかどうかを明らかにし、POCD を発症しない麻酔法の開発のための基礎的根拠の確立につながるよう研究計画を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、がん患者において吸入麻酔薬が POCD を誘発するか検討を行い、そのメカニズムにアストロサイトの機能変化が関与することを明らかにするために、以下の検討を予定した。

次の 4 点を本研究の目標とした。

- ・がんモデルマウスの認知機能への吸入麻酔薬の影響の検討
- ・海馬アストロサイト機能調節によるがん POCD 発症への影響の解析
- ・培養アストロサイトを用いたがん病態下での吸入麻酔薬の細胞障害性の検討
- ・吸入麻酔薬を用いた手術を行ったがん患者における POCD 発症リスクの臨床的評価

3. 研究の方法

(1) 新規物体認識試験の条件決定と解析方法の検討

コントロール群である通常の C57BL/6 マウス (6 週齢、オス) を用い、マウスが同程度の嗜好性を持つ物体 (木製玩具) を物体 A~D の 4 種類作成し、麻酔前後の 2 セット (A と B、C と D) について、マウスが物体を問題なく、同程度の嗜好性で認識するか確認した。また、同一個体で物体 A と B、C と D の 2 回の新規物体認識試験を実施した。

これまで目視で新規物体認識試験の測定を行っていたが、手動測定で 1 回限りであるという正確性の問題と、観察者の主観が入る可能性があった。そこで、マウスの動きを録画し、本学で導入された統計ソフトの MATLAB を用いて動画解析を行うことで、正確性と客観性を高める方法を検討した。

(2) メラノーマ細胞接種マウスにおける認知機能の確認

C57BL6/J マウス (6 週齢、オス、n=6) の右背側部皮下へ、マウスメラノーマ細胞を接種し、モデルを作製した。コントロール群として C57BL6/J マウス (6 週齢、オス、n=4) に、メラノーマ細胞の代わりに細胞培養の培地のみを皮下投与した。

以上のマウスについて、がん接種後 3 日目と 6 日目に新規物体認識試験を行った。また、がん

接種後 10 日目に血清を採取し、ELISA で炎症性サイトカインを確認した。

(3) 糖尿病モデルマウスでの PCOD の確認と発症メカニズムの解明

2016-2019 年度の基盤研究 C「糖尿病患者における術後認知機能障害の発症機序の解明と予防法の確立」(16K10969)で、TSOD (Tsumura Suzuki Obese Diabetes) マウスを用い、糖尿病モデルマウスの PCOD について検討していた。しかし、研究期間中にマウスの供給元の飼育条件の変更により、マウスの状態が変化し、十分な検討ができていなかった。これを引き継ぎ、今回、PCOD について TSOD マウスでの検討を実施した。

糖尿病の症状が著明となる 17 週齢の TSOD マウスとコントロール群として TSNO (Tsumura Suzuki Non Obesity) マウスを用いた (n=7-8)。TSOD マウスは ddY マウス由来の自然発生の 2 型糖尿病モデルマウスで、内臓脂肪型肥満のアジア系人種の糖尿病に近い特徴を持つ。TSNO マウスは TSOD マウスと同じく ddY マウス由来であるが、肥満も高血糖も呈さず、TSOD マウスのコントロール群として使用されている。いずれも 7 週齢で入荷し、17 週齢になるまで体重、随時血糖値、尿糖を測定した。

マウスが 17 週齢になったら、まず麻酔前の新規物体認識試験を実施した。その後、麻酔は過去の報告(Wang HL et al. J Cell Death 2015;8:9-19)を参考にし、チャンバーに吸入麻酔薬であるイソフルランを 1.4%、酸素を 50% 充満させ、マウスを投入後 2 時間吸入させた。麻酔中はマウス用のパルスオキシメーターで酸素飽和度を、酸素濃度計で吸入酸素濃度をモニターした。麻酔中は自発呼吸のため、呼気二酸化炭素濃度 (EtCO₂) が上昇する可能性があったが、流量を 3L/min と流量を上げることで、チャンバー内の二酸化炭素の排出を促した。次の行動試験の実施までは 48 時間以上空けることで、麻酔による認知機能への影響を回避した。そこで、麻酔から 2 日後に、新規物体認識試験を再度実施し、麻酔前の結果と比較した。

また、PCOD がどの程度遷延するのか、あるいは回復するのかを検討するため、麻酔後 2 回目の検討時期を 7 日目に変更して新規物体認識試験を実施することで、病状の変化を確認した。

すべての試験が終了後に各マウスから血清と全脳の採取をした。

4. 研究成果

(1) 新規物体認識試験の条件決定と解析方法の検討

条件決定

無処置の C57BL/6 マウス (6 週齢、オス、n=4) を用い、物体 A と B、C と D の嗜好性試験を行った。物体 A と B、C と D いずれもマウスは物体の探索を一定時間行い、同程度の嗜好性を示した。また同一個体で物体 A と B の新規物体認識試験を実施した後、C と D についても同試験を実施し、2 回とも問題ない結果を得た (n=5)。

以上から、同一個体で 2 回の新規物体認識試験を行う条件を確立できた。

解析方法の検討結果

以前の研究で検討していた統計ソフトによる新規物体認識試験結果の解析方法も検討した。新規物体認識試験を録画した動画について、MATLAB のオープンソースプログラムの Optimouse を用いて解析を実施した。Optimouse では、マウスの鼻や体の方向、軌跡等の解析ができるが、マウスが試験中に物体を噛んでいる状態 (biting 時間) については自動で排除することは困難だった。biting 時間は新規物体認識試験では探索時間に計上しないことになっているが、試験中に biting を頻繁に起こす個体も多くいるため、これを排除できないと結果への影響が大きいので、やむを得ず biting 時間の排除は手動で行うこととした。

結局、全自動での動画解析が難しかったため、Optimouse での動画解析はあくまで手動測定の補助として用いることにした。手動測定で判断が極めて難しい場合に、補助的にでも Optimouse を使用することで、これまでの手動のみの状態よりは客観性を高めることができたと考える。

(2) メラノーマ細胞接種マウスにおける認知機能の確認

がん細胞の接種

C57BL/6/J マウス (6 週齢、オス、n=6) の右背側部皮下へメラノーマ細胞を接種した。コントロール群としては、C57BL/6/J マウス (6 週齢、オス、n=4) に培地のみを皮下投与した。メラノーマ細胞は問題なくマウスに生着し、皮下に黒色腫を形成したが、接種後 10 日目まではマウスの衰弱もなく、また、がん細胞も皮膚を破って増殖することはなかったため、新規物体認識試験の実施に影響はなかった。

認知機能の評価結果

がん細胞接種後 3-4 日と 6-7 日の認知機能障害を確認するため、新規物体認識試験を実施した。3-4 日ではコントロール群とがん細胞接種群のいずれも認知機能障害を認めなかった (がん接種群の識別率の平均値 57.8-58.1%)。しかし、6-7 日でがん接種群の識別率が 50.8-51.3% まで低下し、認知機能障害が出現した。以上の実験を 2 回実施したが、再現性がみられた。

本研究では、がん細胞を接種した後に麻酔を実施し、POCDを確認する予定だったが、過去の報告(Wang HL et al. J Cell Death 2015;8:9-19)に基づき、麻酔の影響を除くために麻酔後48時間(がん細胞接種後5-6日)を無処置とし、7日目以降の認知機能を確認しようとしても、すでにがん細胞による認知機能障害が6日後に出現しているため、POCDの評価は不可能であった。

このため、POCDの研究は(3)の糖尿病モデルマウスに移行し、このメラノーマ細胞接種マウスを「中枢神経以外の担がんマウスの認知機能障害モデル」として「メラノーマ細胞接種マウスで認知機能障害の発症機序を解明する研究」を実施することにした。

生化学的検討結果

メラノーマ細胞接種マウスの血清サイトカインの上昇を検討した。で実施したメラノーマ細胞接種後10日目のマウスの血清を採取し、ELISAでTNF- α 、IL-6を確認したが、いずれも上昇を認めなかったため、認知機能障害の発症メカニズムに炎症性サイトカインの上昇が関与しているのかは不明だった。

本研究ではここまでの検討となり、海馬の形態学的変化の確認や海馬アストロサイトの機能調節による認知機能障害への影響は今後の課題となった。

(3)糖尿病モデルマウスでのPOCDの確認と発症メカニズムの解明

麻酔後2日目のPOCD発症の検討結果

TSOD/TSNOマウス(17週齢、オス、n=7-8)で、新規物体認識試験を実施したところ、TSNOマウス、TSODマウスともに認知機能障害は認めなかった。

チャンパーにイソフルランを1.4%、酸素を50%充満させ、1チャンパーに4匹ずつマウスを入れ、2時間吸入させた。酸素濃度計で吸入酸素濃度が50%前後であることを確認した。チャンパー内の任意の1匹を用いて、麻酔中の酸素飽和度が80%以下とならないことも確認した。麻酔終了後には、酸素50%のみを20分間吸入させて回復させた。48時間後空けて、次の試験を実施した。

麻酔から2日後に、新規物体認識試験を再度実施した。麻酔後のTSODマウスの識別率の平均値は48.9-52.9%となり、認知機能障害つまりPOCDを起こしたと考えられた。

以上をn=7-8の3グループで実施し、再現性を得た。

麻酔後7日目のPOCDの状態確認結果

の認知機能障害が一時的なものなのか、持続性のものなのかを確認するため、麻酔後7日目の検討をとは別のグループのマウスで実施した。

麻酔実施まではと同様の手法で行い、麻酔後7日目に新規物体認識試験を実施した。麻酔後のTSODマウスの識別率の平均値は50.3-51.5%となり、認知機能障害が継続していると考えられた。

以上から、麻酔後7日目まで、TSODマウスでPOCDが継続していると考えられた。

血清の炎症性サイトカインのELISAによる検討と、全脳のWestern blotによる検討を行っているところである。

本研究により、メラノーマ細胞接種における認知機能障害モデルが確立できた。また糖尿病モデルマウスのPOCDモデルも作成し、POCDが麻酔後7日目まで継続していることも確認した。これらを用いて、認知機能障害の発症のメカニズムの解明について、今後も検討を進める予定である。

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〕

-

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 | 大澤 匡弘 (Ohsawa Masahiro) (80369173) | 名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授 (23903) | |
| 研究分担者 | 祖父江 和哉 (Sobue Kazuya) (90264738) | 名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903) | |