

令和元年6月4日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10969

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of postoperative cognitive dysfunction in diabetic patients and establishment of a preventive method

研究代表者

森島 徹朗 (MORISHIMA, Tetsuro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10448714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者の麻酔件数の増加に伴い、術後認知機能障害(POCD)が問題となっている。また、POCDの発症因子として考えられている糖尿病の有病率も増加している。本研究では、アジア系の糖尿病に類似した症状を呈するTSODマウスを用いて、糖尿病マウスにおけるPOCDモデル(DM-POCDモデル)を作成し、麻酔薬によるPOCDの発症機序の解明等を目的とした。

研究の途中でマウスの供給元の飼育条件に変更があり、マウスの状態が変化したため、再度基礎データを取り直し、DM-POCDモデルの再確立が必要となった。再確立とともに、同一個体で客観的に麻酔前後の認知機能を評価できる手法を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急速な高齢化により、高齢者に対する麻酔件数は年々増加している。それに伴い、高齢者で発生率が高いPOCDが問題となっている。長期のPOCDは退院後のQOLの低下や就労困難だけでなく、死亡率の増加にも関連している。また、POCDの発症因子として挙げられる糖尿病は、アジア系人種での有病率が増加しており、今後ますますPOCDは問題化していく可能性が高い。よって、本研究で検討したPOCDの発症機序の解明と予防法の確立は急務である。

研究成果の概要(英文)：Postoperative cognitive impairment (POCD) has become a problem with the increasing number of anesthesia in the elderly. In addition, the prevalence of diabetes, which is considered to be a cause of POCD, is also increasing. In this study, we created a POCD model in diabetic mice(DM-POCD model) using TSOD mice that show symptoms similar to those of Asian diabetes and aimed at elucidating the pathogenesis of POCD with anesthetics. During the study, there were changes in the breeding conditions of the mouse supply source, and the condition of the mice changed, so it was necessary to re-establish basic data and re-establish the DM-POCD model. As well as reestablishment, we examined a method that can objectively evaluate cognitive function before and after anesthesia in the same individual.

研究分野：麻酔科学

キーワード：術後認知機能障害 糖尿病 麻酔

1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化により、高齢者に対する麻酔件数は年々増加している。周術期管理の質は向上しているが、術後認知機能障害(postoperative cognitive dysfunction: POCD)を発症する場合がある。術後3ヶ月でのPOCD発生率は10~15%で、高齢者が大多数を占める(Crosby G, et al. Anesth Analg. 2011;112:999-1001)との報告がある。また、長期のPOCDは、退院後のQOLの低下や就労困難だけでなく、死亡率の増加にも関連しているが(Deiner S, et al. Br J Anaesth. 2009;103:i41-6)、POCDの全体像は依然明らかではなく、有効な予防法の確立には至っていない。

POCDの発症因子として、糖尿病が臨床的に指摘されている(Kadoi Y, et al. Surg Today 2006;36:1053-7)。米国民を対象とした健康・栄養調査であるNational Health and Nutrition Examination Survey(NHANES)の2011~12年のデータ解析から、初めてアジア系米国人における有病率が推計されたが、アジア系では糖尿病の有病率が20.6%と白人のほぼ2倍だった(Menke A, et al. JAMA 2015;314:1021-9)。アジア系では白人・黒人・ヒスパニック系と比べ、内臓脂肪型肥満になりやすく、BMIが低くても糖尿病を発症しやすいことが知られている。今後、高齢化により糖尿病が増加すると、POCDも増加する可能性があるため、POCDの予防法の確立が急務である。しかしながら、POCDで糖尿病が発症因子となっている原因は依然として不明であり、糖尿病マウスのPOCDモデルはない。

そこで本研究計画では、アジア系の糖尿病に近い特徴を持つTSOD(Tsumura Suzuki Obese Diabetes)マウスを採用し、各種麻酔薬を投与することによりPOCDモデルを作成し、その発症機序の解明を目指した。TSODマウスは1992年に作成された2型糖尿病モデルであり、アジア系の肥満に類似した内臓脂肪型肥満で、高血糖、高インスリン血症、耐糖能異常、尿糖を呈し、ヒトの糖尿病合併症と類似した症状も出現する(腎障害、脂肪肝、運動異常・知覚異常・疼痛閾値の低下などの末梢神経障害)。

発症機序に基づいた予防法を確立することが重要と考え、抗酸化物質に注目した。POCDにおいても脳内の抗酸化作用が予防に関与している例としては、TSODマウスに抗酸化作用のあるオレウロペインを投与したところ、不安行動が抑制されたという報告(Murotomi K, et al. J Agric Food Chem. 2015;63:6715-22)がある。そこで本研究計画では、申請者らが中枢神経保護作用を確認している抗酸化栄養素であるホエイペプチド(Takayanagi T, et al. JPEN J Parenter Enteral Nutr 2011;35:516-22)を糖尿病におけるPOCDモデルに経口投与し、その後、各種麻酔薬を投与して予防効果の検討を予定した。

さらに、ホエイペプチドにPOCD予防効果があれば、患者のQOLや死亡率の改善のほか、総合的には入院期間が短縮し、医療費抑制にも役立つと考え、手術前の糖尿病患者にホエイペプチド添加栄養剤を投与し、その効果を確認する臨床研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、アジア系の糖尿病に類似した症状を呈するTSODマウスを使用し、麻酔薬によるPOCDの発症機序の確認を予定した。また、POCD予防法として、申請者らが中枢神経保護作用を確認している抗酸化栄養素の投与による簡便な方法を確立し、臨床応用を目指した。

次の4点を本研究の目標とした。

- (1)TSODマウスを用いた「糖尿病におけるPOCD(DM-POCD)モデル」の確立
- (2)DM-POCDモデルにおけるPOCD発症機序の解明
- (3)ホエイペプチドのDM-POCDモデルマウスにおけるPOCD予防効果の確認
- (4)糖尿病患者におけるホエイペプチドのPOCD予防効果の確認

3. 研究の方法

(1)TSODマウスとTSNOマウスの状態確認

TSODマウスと、対照群としてTSNO(Tsumura Suzuki Non Obesity)マウスを用いた。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ない。いずれも7週齢で入荷し、行動試験実施まで毎週、体重、随時血糖値、尿糖を測定した。

(2)麻酔実施前の行動試験

糖尿病の症状が出てくる11~12週齢または症状が著明となる16~17週齢のオスのTSODマウス(以下すべて対照群はTSNOマウス)を使用した(n=6~7)。

麻酔実施前に、オープンフィールドテスト、新規物体認識試験、明暗箱テスト等を実施し、行動の変化を確認した。

(3) DM-POCD モデルの確立

(2)のマウスにイソフルランを投与し、高次脳機能障害(主に認知機能障害)の発症を検討した。

麻酔条件は過去の報告(Wang HL et al. J Cell Death 2015;8:9-19)を参考にした。すなわち、チャンバーにイソフルランを1.4%、吸入酸素濃度50%を充満させ、2時間麻酔を行い、終了後は回復のために吸入酸素濃度50%のみで20分間置いた。麻酔中はマウス用のパルスオキシメーター(PowerOxy900、バイオリサーチセンター株式会社)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。次の行動試験まで48時間以上空けることで、麻酔薬の認知機能に与える影響を回避した。

予備実験では1匹ずつチャンバーに入れて麻酔をかけていたが、時間がかかりすぎること、麻酔時間が個体ごとに異なるなどの問題があるため、3~4匹まとめて1つのチャンバーで同時に麻酔を実施し、そのうち1匹をモニタリングした。自発呼吸下の麻酔のため、呼気二酸化炭素濃度(EtCO₂)が上昇する可能性があったが、流量を多く(3L/min)することでチャンバー内の二酸化炭素の排気を促した。

麻酔投与後に、オープンフィールドテスト、新規物体認識試験、明暗箱テスト等を再度実施し、麻酔前の行動と比較検討した。

また、POCDの発症メカニズムの仮説として、海馬におけるミクログリア活性化がある(Hovens IB, et al. Brain Behav Immun 2012;26:1169-79)ので、11~12週齢のTSOD/TSNOマウス(n=4)について、まずは形態的な変化が麻酔後の海馬に出ているか、HE染色で確認した。

(4)飼育条件の変更によるマウスの状態変化の確認

2017年10月にTSODマウスとTSNOマウスの供給元の飼育条件の変更(離乳時期の変更)があり、体重増加、血糖値の上昇、尿糖出現時期に変化がみられた。このため、基礎データから取り直す必要が出てきた。7週齢で入荷し、行動試験実施まで毎週、体重、随時血糖値、尿糖を再度測定した。

(5) DM-POCD モデルの再確立

比較的安定して高血糖・尿糖陽性を呈する16~17週齢のTSODマウスで、再度POCDモデルの確立を行った。麻酔条件はひとまず(3)と同様に設定した。

(6)同一個体で麻酔前後の新規物体認識試験を実施し、客観的に評価できる方法の確立

麻酔と行動試験の条件の再設定にあたり、以前は麻酔前後で別個体を使用していたが、同一個体で麻酔前後の新規物体認識試験を実施できる方法を検討した。

マウスが同程度の嗜好性を持つ物体(木製玩具)を複数作成し、麻酔前後用の2組を揃え、マウスが物体を問題なく認識することを確認した。また、新規物体認識試験の測定は、以前は目視で測定を行っていたため、測定が手動で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。

4. 研究成果

(1)TSODマウスとTSNOマウスの状態確認

TSODマウスは遺伝子組換えマウスではなく、自然発症の2型糖尿病モデルマウスであるため、週齢を重ねてもすべての動物が高血糖状態や尿糖陽性にはならない。また、飼育環境によっても糖尿病の状態が変化するマウスでもあるため、研究開始初期にはマウスの血糖値と尿糖の出現が安定せず、目的の状態(随時血糖値で250mg/dL以上で尿糖陽性)になる個体が少なく、次の行動試験の実施が難しかった。

(2)麻酔実施前の行動試験

11~12週齢での検討結果

n=7で麻酔実施前に行ったオープンフィールドテストの結果、TSODマウスの方がcenter zone滞在期間が有意差はないものの短い傾向にあった。明暗箱でも明室滞在時間が有意に短かったため、不安傾向にある可能性があった。新規物体認識試験では、認知機能障害を認めなかった。

16~17週齢での検討結果

n=6~7で麻酔実施前に行ったオープンフィールドテストの結果、TSODマウスの方がcenter zone滞在期間が有意に短く、明暗箱でも明室滞在時間が有意に短かったため、不安傾向と考えられた。新規物体認識試験では、TSODマウスで高血糖による認知機能障害が発症している可能性があった。

とから、認知機能が正常な11~12週齢で麻酔を実施してDM-POCDモデルを作成することにした。

麻酔実施

11~12 週齢 (n=4~7) の TSOD/TSNO マウスを 3~4 匹ずつチャンバーに入れ、イソフルランを 1.4%、吸入酸素濃度 50%を充満させ、2 時間麻酔を行い、終了後は回復のために吸入酸素濃度 50%のみで 20 分間置いた。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、酸素飽和度 80%以上、吸入酸素濃度は 50%前後であることを確認した。麻酔後 48 時間以上空けて、次の行動試験を行った。

麻酔後の行動試験結果 (DM-POCD モデルの確立)

のマウスで麻酔前と同様の行動試験を実施した。オープンフィールドテストでは、麻酔前後の TSOD マウスで center zone 滞在時間が有意に短かったり、変化がなかったりなど安定した結果とならなかった。一方、明暗箱では、TSOD マウスは麻酔後に明室滞在時間に有意差がなくなり、不安傾向でなくなっている可能性があった。

新規物体認識試験では、TSOD マウスで認知機能障害を発症し、DM-POCD モデルを作成できたが、再現性を確認する必要があった。

海馬の形態学的変化の確認

のマウスの麻酔後に海馬に形態的な変化が出ていないか、HE 染色で確認をした (n=4)。その結果、歯状回の顆粒細胞に乏血性変化が見られ、海馬 CA3/4 の錐体細胞にも同様の変化が見られたが、これらの変化はむしろ TSNO マウスに顕著で、系統間および個体間で出現状況が異なり、標本作製部位の違いに起因する可能性があった。マウスの数を増やして再検する必要があった。

(4) 飼育条件の変更による TSOD マウスの状態変化の確認

サンプル数を増やして DM-POCD モデルの確立の再現性を確認しようとしていたところ、飼育条件が変更されたため、マウスの状態に変化が出た。

TSNO マウスでは、体重の平均値は、12 週齢程度で以前は 30g 程度だったのが、35g 程度になった。血糖値には大きな変化はなかった。

TSOD マウスは、これまでは 16 週齢まで体重増加が継続的に認められていた。飼育条件変更後は 11~12 週齢で一度体重増加が止まり、再度増加傾向になった。また、随時血糖値は最高でも 300mg/dL 程度だったものが、500mg/dL 以上になる個体も出現し、尿糖も早いものは 9 週齢で陽性となるなど、糖尿病の進行速度が上がり重症度も高くなった。

以上のマウスの状態は、これまでのものと大きく異なるため、再度、DM-POCD モデルを確立する必要が出てきた。そこで、安定して高血糖・尿糖陽性を呈することが多い 16~17 週齢の TSOD マウスを用いることにした。

(5) 麻酔実施前の TSOD マウスの行動試験

今回から、認知機能に集中して試験を行うため、不安行動を評価できるオープンフィールドや明暗箱を省略し、新規物体認識試験のみを行うことにした。その結果、16 週齢、n=6 で新規物体認識試験では、TSNO マウスと TSOD マウスともに認知機能障害は認められなかった。

このため、認知機能が正常な 16 週齢前後で麻酔を実施して DM-POCD モデルを再度作成することにした。

(6) 同一個体で麻酔前後の新規物体認識試験を実施し、客観的に評価できる方法の確立

麻酔と行動試験の条件の再設定にあたり、以前は麻酔前後で別個体を使用していたが、同一個体で麻酔前後の新規物体認識試験を実施できる方法を確立した。

この方法により、手動では限りのあった同日測定可能サンプル数の増加 (最大 n=6 から n=8 へ) ができ、結果の精度の向上も見込まれる。現在、麻酔前後の動画の解析を行っている。

本研究で TSOD マウスを用いた DM-POCD モデルの再確立には至らなかったが、今回確立した客観的な評価方法を用いて、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 2 件)

- (1) Yamamoto N, Ishikuro R, Tanida M, Suzuki K, Ikeda-Matsuo Y, Sobue K.
Insulin-signaling Pathway Regulates the Degradation of Amyloid β -protein via Astrocytes.
Neuroscience. 2018;385:227-36. 査読有
- (2) Yamamoto N, Shibata M, Ishikuro R, Tanida M, Taniguchi Y, Ikeda-Matsuo Y, Sobue K.
Epigallocatechin gallate induces extracellular degradation of amyloid β -protein by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of ERK and PI3K pathways.

〔学会発表〕(計6件)

- (1)志田恭子、大澤匡弘、太田晴子、田村哲也、祖父江和哉
2型糖尿病モデルマウス(TSODマウス)を用いた耐糖能異常ニューロパチーの発症機序の検討
第22回日本神経麻酔集中治療学会 2018年
- (2)山本直樹、谷田守、鈴木健二、祖父江和哉
レプチンは初代培養アストロサイトのネプリライシンとインスリン分解酵素発現を調節する
第61回日本神経化学会大会合同年会 2018年
- (3)山本直樹、祖父江和哉
PKAおよびPKC経路とアストロサイトのネプリライシンとインスリン分解酵素発現検討
第37回日本認知症学会学術集会 2018年
- (4)山本直樹、谷田守、石黒凌、祖父江和哉
培養アストロサイト発現ネプリライシンとインスリン分解酵素のインスリンによる発現調節の検討
日本薬学会第138回年会 2018年
- (5)山本直樹、谷田守、石黒凌、祖父江和哉
インスリンによるアストロサイトのネプリライシンとインスリン分解酵素の発現調節の検討
第36回日本認知症学会学術集会 2017年
- (6)丸岡純也、志田恭子、平手博之、石倉啓一郎、飯尾彩加、桑和彦、祖父江和哉、大澤匡弘
TSODマウスにおける痛み閾値の変化とTRPV1の関与
平成29年度日本薬学会東海支部例会 2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大澤 匡弘

ローマ字氏名：OHSAWA Masahiro

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80369173

研究分担者氏名：祖父江 和哉

ローマ字氏名：SOBUE Kazuya

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：90264738

(2)研究協力者

なし