

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11068

研究課題名(和文) GSK-3 に焦点をあてた術後の高次機能障害の発症機序の解明とその予防法の検討

研究課題名(英文) The effect of Tideglusib on postoperative cognitive dysfunction through GSK-3beta inhibition and hippocampal dendritic spine morphological change

研究代表者

山下 創一郎 (YAMASHITA, Soichiro)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10455933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高齢ラットを用いて、手術前からGSK-3 阻害薬であるTideglusib 5 mg/kgを投与し、手術後の学習・記憶障害が軽減するかを検討し、さらに海馬のGSK-3 レベルと神経細胞の樹状突起のスパインの形態学的変化との関連を調べた。その結果、Tideglusibは手術に伴う学習・記憶障害に対する予防効果を持ち、それは海馬のGSK-3 活性の増加の抑制と神経細胞の樹状突起のスパインの形態学的変化が関与していると考えられた。一方で、正常なラットに対するTideglusibの投与は精神神経学的な異常を引き起こし、GSK-3 阻害薬の術後認知機能障害への応用はさらなる研究が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術後の認知機能障害は高齢患者に特有の周術期合併症であり、今後ますます高齢化社会を迎える我が国にとってその予防は重大なテーマの一つである。Tideglusibはアルツハイマー病の臨床開発においてすでに臨床試験が行われたGSK-3 阻害薬である。今回、Tideglusibに術後の認知機能障害への効果が明らかになったことで、今後の臨床応用が期待される。一方で、Tideglusibを投与した正常なラットに精神神経学的な異常が認められており、GSK-3 阻害薬の術後認知機能障害への応用のために解決が必要な課題が提示できたと考える。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to evaluate the effect of preoperative 5 mg/kg of Tideglusib, which was a GSK-3 inhibitor, on the postoperative cognitive dysfunction in aged rats, and investigate whether the the GSK-3 levels and neuronal dendritic spine morphological changes in the hippocampus was related with the effect of preoperative Tideglusib. We found that Tideglusib had a protective effect on the postoperative cognitive dysfunction, which was thought to be related to the inhibition of increased GSK-3 activity and neuronal dendritic spine morphological changes in the hippocampus. On the other hand, administration of Tideglusib to normal rats caused neuropsychiatric abnormalities, and the application of GSK-3 inhibitors against the postoperative cognitive dysfunction may require further study.

研究分野：周術期管理学

キーワード：術後認知機能障害 高齢 グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 海馬 樹状突起 Morris water maze

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

術後の高次機能障害 (postoperative cognitive dysfunction: POCD) は高齢患者に特有の周術期合併症の一つである。POCD の発症機序については未だ不明であるが、原因は multifactorial であるとともに、その発症機序についての説明は十分でなく、今後も様々な研究が必要である。

認知機能障害には神経細胞の樹状突起の形態学的変化が関与しているおり、アルツハイマー病や加齢により樹状突起のスパインが減少する。手術侵襲の影響に関しては、高齢ラットにおいて手術後の海馬における炎症性サイトカインが上昇と CA1 と歯状回における樹状突起のスパイン密度の減少が認められたとの報告がある。この神経細胞の樹状突起の形態学的変化はいくつかの因子によって制御されるが、この中でも特に重要なのが Glycogen Synthase kinase-3 (GSK-3) シグナル経路である。今回、GSK-3 を抑制することにより、手術侵襲によってもたらされる海馬における樹状突起のスパインの減少を抑制できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

高齢ラットを用いて、海馬の神経細胞の樹状突起の形態学的変化をターゲットにした POCD 予防薬の検討を行う。手術前に GSK-3 阻害薬である Tideglusib を投与し、手術後の海馬の神経細胞の樹状突起のスパインの形態学的変化や学習・記憶障害が軽減するかを検討した。

### 3. 研究の方法

15 ヶ月のオスの Fisher344 ラットを、コントロール群 (C 群)、Tideglusib 投与のみ群 (T 群)、手術のみ群 (Op 群)、手術 + Tideglusib 投与群 (Op + T 群) の 4 群に分けた (各群 n=12)。Op 群では Tideglusib を溶解するための溶媒のみを、Op + T 群では Tideglusib 5mg/kg を手術 2 日前に腹腔内投与し、開腹手術を行った。T 群は、Op + T 群と同じ時系列で Tideglusib 5mg/kg の腹腔内投与のみを行った。Op 群、Op + T 投与群は 2% イソフルラン吸入による全身麻酔を 12 分間行い、その間に開腹手術を実施した。手術は腹部正中を 3cm 切開し腸を腹腔外に出した後、親指と人差し指で 3 分間腸管を擦った。その後腹壁を縫合・閉鎖。鎮痛は創部に 0.2% ロピバカインを 0.5cc 皮下注した。Tideglusib の溶媒は 5% DMSO と 5% Tween-80 を含んだ生理食塩水を用いた。

術後 3 日目から Morris Water Maze (MWM) を施行し、手術後の学習・記憶障害を測定した。Training phase を 5 日間行った翌日に Probe phase を行った。Training phase は、直径 180cm のプールの中に直径 20cm の円形のプラットフォームを水面より隠れるようにして置き、水面に放たれたラットがそこに泳いでたどりつくまでの時間と距離を測定した。1 分以内にたどりつかない場合はプラットフォームまで誘導した。プラットフォーム上で 20 秒間置いた後、プールから回収した。1 日 2 回施行し、2 回目の Training までは 1 分間あけた。Probe phase は、プールからプラットフォームを取り除いた後、ラットを水面に放ち 1 分間プラットフォームを探索させたときにプラットフォームが置いてあったプールの 1/4 の区域を探索する時間の割合を測定した。

海馬 CA1 領域における神経細胞の樹状突起のスパインの形態学的変化を調べるため、Probe phase の翌日に安楽死させて、脳を摘出し、Golgi 染色を行った。その後切片を作成し、海馬 CA1 領域における神経細胞の樹状突起の多焦点撮影を行い、樹状突起の apical 部分 50 μm 毎のスパインの形態を観察した。

さらに、Tideglusib 投与による GSK-3 のリン酸化を調べるため、別のラットを用い (各群 n=5) 術後 3 日目 (T 群、Op 群、Op + T 群では薬物の腹腔内投与後 5 日目) に安楽死させて、脳を摘出し、海馬のタンパク抽出液を作成。ELISA で total GSK-3 およびリン酸化 GSK-3 を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) Morris Water Maze

5 日目 (術後 3 日目) から開始した 5 日間の Training phase における、プラットフォームまでの到達時間 (図 1)、到達距離 (図 2)、遊泳速度 (図 3) を示す。Training phase における、プラットフォームまでの到達時間と到達距離は、Training を重ねていくうちにプラットフォームの場所を覚えるようになるため、4 群とも日を重ねるごとに時間、距離ともに短くなっていった。Probe phase では (図 4) Op 群が C 群に比べてプラットフォームが置いてあった区域を探索した時間の割合が有意に低かった。また、Op + T 群は Op 群に比べて、プラットフォームが置いてあった区域を探索した時間の割合が有意に高かった。一方で、遊泳速度は T 群が他の群に比べて有意に早かった (図 5)。また、1 分間の移動距離に対する、プールの壁沿い 20cm 幅の辺縁域を走行する距離の割合が (Thigmotaxis) T 群が他の群に比べて有意に高かった (図 6)。

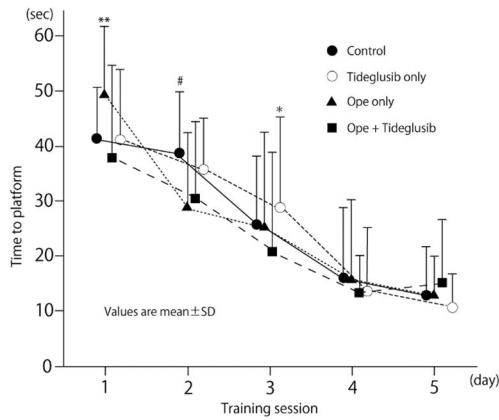


図1 プラットフォームまでの到達時間  
 \* P<0.05 vs. Ope + T 群  
 \*\* P<0.05 vs. C 群、Ope + T 群  
 # P<0.05 vs. Ope 群、Ope + T 群

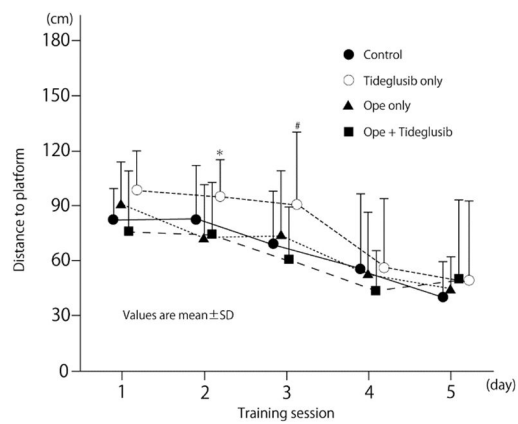


図2 プラットフォームまでの到達距離  
 \* P<0.05 vs. Ope 群、Ope + T 群  
 # P<0.05 vs. C 群、Ope + T 群

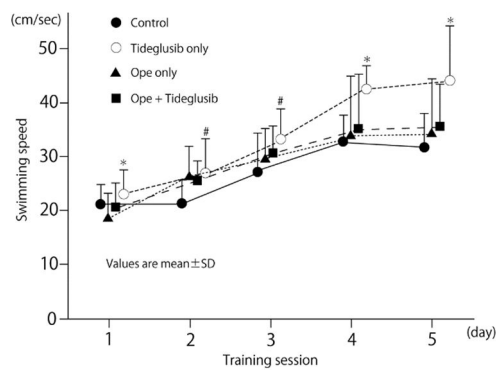


図3 遊泳速度  
 \* P<0.05 vs. C 群、Ope 群、Ope + T 群  
 # P<0.05 vs. C 群

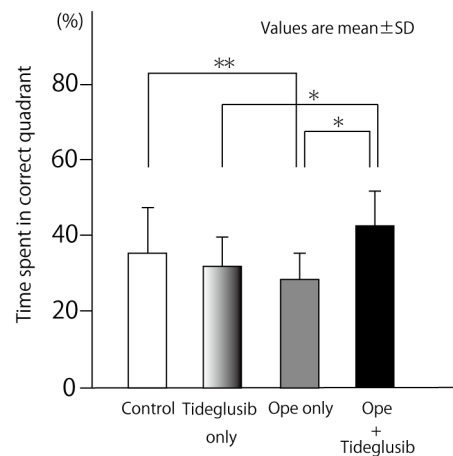


図4 Probe phase においてプラットフォームが置いてあったプールの1/4の区域を探索した時間の割合  
 \* P<0.01、\*\* P<0.05

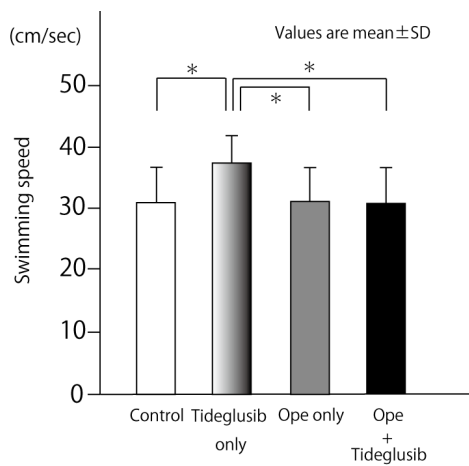


図5 Probe phase における遊泳速度  
 \* P<0.01

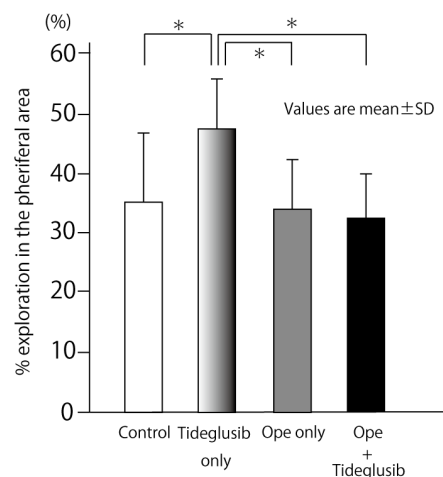


図6 Probe phase における Thigmotaxis  
 \* P<0.01

## (2) 海馬 CA1 領域における神経細胞の樹状突起のスパインの密度と形態

11 日目 (術後 9 日目) の、海馬 CA1 領域における神経細胞の樹状突起のスパインの密度および形態を図 7 に示す。樹状突起の apical 部分 50 μm 毎のスパインの密度の平均値を比較したところ、4 群間に差は認められなかった。続いて、スパインの形態を mushroom 型、stubby 型、thin 型の 3 つに分類し、その割合を比較したところ、mushroom 型の割合は Ope + T 群が C 群、T 群に比べて有意に高かった。また、stubby 型の割合は Ope 群が C 群、T 群に比べて有意に低かったの

に対し、thin 型は Ope 群が C 群に比べて有意に高かった。

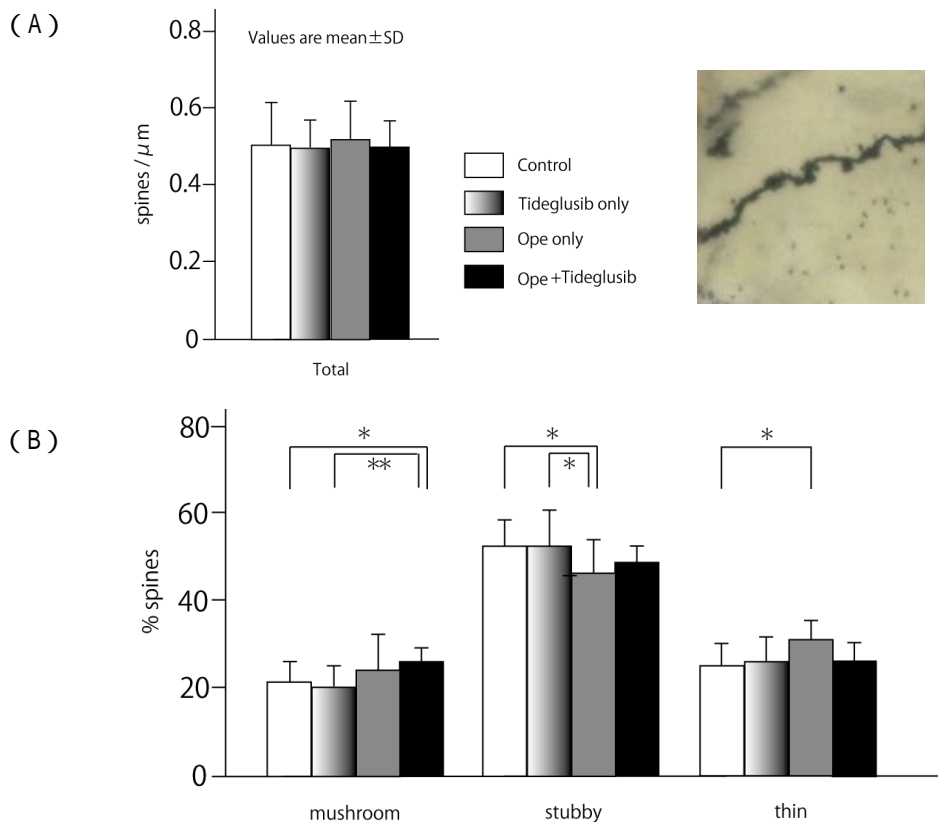


図7 海馬 CA1 領域における神経細胞の樹状突起のスパインの密度および形態

(A) 樹状突起の apical 部分のスパインの密度

(B) 樹状突起の apical 部分のスパインの各形態の割合

\* P<0.05, \*\* P<0.01

### (3) 海馬の GSK-3 およびリン酸化 GSK-3 レベル

5 日目 (術後 3 日目) の海馬の GSK-3 およびリン酸化 GSK-3 レベルを図 8 に示す。海馬の GSK-3 レベルは 4 群で差はなかった。一方、リン酸化 GSK-3 レベルは Ope + T 群が C 群、T 群に比べて有意に高かった。

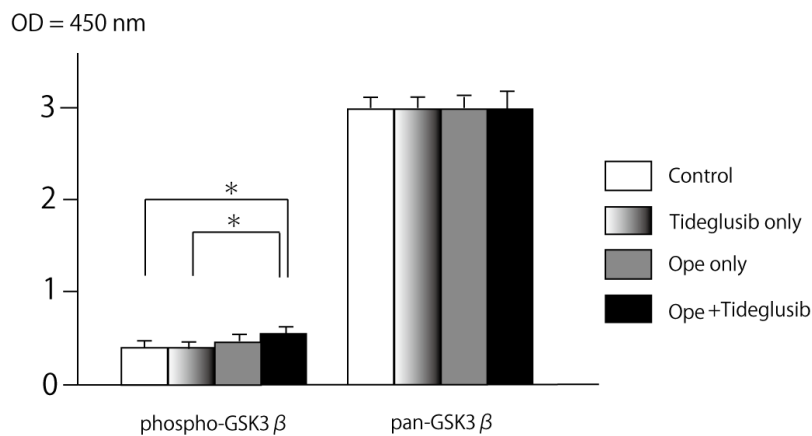


図8 海馬の total GSK-3 およびリン酸化 GSK-3 レベル

\* P<0.05

### (4) まとめ

Morris water maze の Probe phase において、Ope 群が C 群に比べてプラットフォームが置いてあったプールの 1/4 の区域を探索した時間の割合が有意に低く、手術によって学習・記憶障害が起こることが示された。また、Ope + T 群は Ope 群に比べて、プラットフォームが置いてあった区域を探索した時間の割合が有意に高く、術前の Tideglusib の投与が手術による学習・記憶障害を予防する効果があることが示された。Zhao らは、18 カ月のラットに開腹手術前に GSK-3 阻害薬でもあるリチウムの腹腔内投与を 7 日間行ったところ、開腹手術によって引き起こされた学習・記憶障害と海馬のリン酸化 GSK-3 レベルの低下が軽減したことを報告している。

本研究でも、リン酸化 GSK-3 レベルは Ope + T 群が C 群に比べて有意に高く、Tideglusib の手術に伴う学習・記憶障害の予防効果は GSK-3 活性の増加の抑制によるものと考えられた。

海馬 CA1 領域における神経細胞の樹状突起のスパインの密度は 4 群間で差はなかったが、mushroom 型のスパインの割合は Ope + T 群が C 群と T 群よりも有意に高く、thin 型のスパインの割合は Ope 群が C 群に比べて有意に高かった。デキストラン硫酸ナトリウムを用いた大腸炎モデルで、海馬の神経細胞の樹状突起における immature スパイン (明らかな頭部を有するもの以外のスパイン; thin 型) の割合が大腸の炎症が強いほど高かったことが報告されており、本研究において Ope 群で有意に thin 型のスパインの割合が高かったという結果と一致している。immature スパインは mature スパイン (明らかな頭部を有するスパイン; mushroom 型) に比べて post-synaptic current が生成しにくいと言われており、Ope 群における手術後の学習・記憶障害はスパインの形態学的変化が関与していると考えられた。GSK-3 は樹状突起のスパインの構造的なバランスを immature スパインが増加する方向にスイッチさせることが示唆されている。本研究において Ope + T 群で有意に mushroom 型のスパインの割合が高かったが、これは Tideglusib の投与により GSK-3 活性の増加が抑制されたことによると思われる。

一方、T 群は他の群と比べ Probe phase での遊泳速度が有意に早かった。また、1 分間の移動距離に対する、プールの壁沿い 20cm 幅の辺縁域を走行する距離の割合が (Thigmotaxis) T 群が有意に高かった。つまり、Tideglusib のみ投与したラットは、他の群より速いスピードでプールの辺縁域を走行していたことになる。過去の報告では、ストレスを受けているラットはそうでないラットに比べて、移動速度が速いことが報告されている。また、Thigmotaxis は不安の強さを表していると言われており、神経機能の維持には GSK-3 の恒常的活性が必要であり、T 群におけるラットの異常行動は Tideglusib の GSK-3 への作用と考えられる。

以上、Tideglusib の投与は、手術に伴う学習・記憶障害に対して予防効果を持つ。それは海馬の GSK-3 活性の増加の抑制と、海馬 CA1 領域における神経細胞の樹状突起のスパインの形態学的変化が関与していると考えられた。一方で、正常なラットに対する Tideglusib の投与は精神神経学的異常を引き起こす可能性があり、術後認知機能障害への GSK-3 阻害薬の応用にはさらなる研究が必要である。

#### < 引用文献 >

Fiala, et al. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Rev* 2002; 39: 29-54.

Le Y, et al. Aging differentially affects the loss of neuronal dendritic spine, neuroinflammation and memory impairment at rats after surgery. *PLoS One* 2014; 9: e106837.

Zhao L, et al. Prophylactic lithium alleviates postoperative cognition impairment by phosphorylating hippocampal glycogen synthase kinase-3 (Ser9) in aged rats. *Exp Gerontol* 2011; 46: 1031-6.

Matisz CE, et al. Acute gut inflammation reduces neural activity and spine maturity in hippocampus but not basolateral amygdala. *Sci Rep* 2022;12: 20169.

Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 647-58.

Kondratiuk I, et al. GSK-3 and MMP-9 Cooperate in the Control of Dendritic Spine Morphology. *Mol Neurobiol* 2017; 54 :20011.

Gehring TV, et al. Detailed classification of swimming paths in the Morris Water Maze: multiple strategies within one trial. *Sci Rep* 2015; 5: 14562.

Murayama MA, et al. Female dominance of both spatial cognitive dysfunction and neuropsychiatric symptoms in a mouse model of Alzheimer's disease. *N.Exp Anim* 2021; 70: 398-405.

Hu S, et al. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals.

*Neurobiol Dis* 2009; 33: 193-206.

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

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