

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16737

研究課題名(和文) PGC-1 およびmicroRNAを用いた術後認知機能障害に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy for postoperative cognitive dysfunction by PGC-1a and microRNA

研究代表者

立岩 浩規(Tateiwa, Hiroki)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：90614397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：術後認知機能障害(POCD)は、手術侵襲による脳内炎症が原因の一つとされており、術後QOL低下などと関連し問題となっている。POCDに対して術前の運動が有効である可能性が示唆されているが、困難な患者も多い。本研究では、運動で増加する蛋白PGC-1を誘導する物質ALAを投与することで、運動と同等の効果をもたらすPOCDを予防出来るかを検討した。結果、高齢ラットで術前にALAを投与することで、PGC-1増加および海馬BDNF増加を認めた。さらに術後7日目で認知機能保持、海馬TNF- α の低下を認めた。以上よりALA投与により脳内炎症を抑制し、POCDを予防することが出来ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の進行および手術技術の向上に伴い、高齢患者が手術を受ける機会が増加している。それに伴い術後認知機能障害(POCD)などの合併症が社会的にも大きな問題となっている。POCDに対して術前の運動が有効である可能性は示唆されているものの、特に高齢患者では困難な場合も少なくない。それに対して、リポ酸の投与により、運動と同等の効果をもたらす可能性がある。本研究結果がもたらす意味は大きいと思われる。また、リポ酸はサプリメントとしてもヒトでも使用されているものであり、今後、臨床への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Postoperative cognitive dysfunction (POCD) is caused by the neuroinflammation due to surgical invasion. This condition is generally associated with postoperative QOL deterioration. Recent research suggested that preoperative exercise may be an effective preventive strategy. However, the preoperative exercise approach is often difficult to implement in elderly patients. In this study, we examined whether POCD could be prevented by administering ALA, a substance that induces the protein PGC-1 expressed during exercise. As a result, PGC-1 and hippocampal BDNF levels increased by preoperatively administering ALA to aged rats. In addition, the novel object cognitive test on POD7 showed that cognitive function was maintained. Furthermore, hippocampal TNF- α levels decreased. ALA administration suppressed neuroinflammation and prevented the development of POCD.

研究分野：麻酔

キーワード：術後認知機能障害 neuroinflammation リポ酸 BDNF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

術後認知機能障害 (POCD ; Post-operative Cognitive Dysfunction) は、手術後において認知機能が術前よりも低下した状態と定義されている。重要な術後合併症の1つで、術後 QOL 低下や死亡率の増加などと関連すると報告されている (Anesthesiology 2009;110:548-55)。POCD の危険因子として高齢であることが挙げられるが、高齢化の進行および医療進歩による高齢者の手術件数の増加に伴い、POCD は今後さらに増加することが予測される。しかし、未だに有効な予防・治療方法は確立されていない。

POCD の発症機序としては、手術侵襲が脳内のマイクログリアに影響を及ぼし、海馬での炎症反応を惹起することが考えられている。

また、海馬内の炎症の程度と POCD の程度には相関関係があることが基礎研究で分かっている。これに対してラットを用いた研究で、術前の運動によって、術後海馬での炎症反応を抑制することができることを我々の研究グループでも報告している (Anesthesiology. 2015 Jul;123(1):160-70)。しかし、高齢者は術前に運動を行うことが困難であることも少なくない。

その問題に対して、本研究では運動の代わりに、運動で誘導される物質を投与することで、運動と同等の効果をもたらす POCD を予防することができるかを検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動によって誘導もしくは抑制される蛋白などの因子を術前に調整することで、術後認知機能障害 (POCD ; Post-operative Cognitive Dysfunction) を予防することができるかを検討することである。

現時点で POCD の有効な予防・治療法は確立されていないが、術前の運動が有用である可能性が示唆されている。しかし、POCD を発症するのは多くが高齢者であり、術前運動が困難であることも少なくない。そこで、術前に運動によって誘導される蛋白を投与することで、運動と同等の効果をもたらす、POCD を予防することができるかを、高齢ラットを用いて検討する。

3. 研究の方法

本研究において、運動により誘発される蛋白として PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor- co-activator-1) に注目した。PGC-1 は、運動によって骨格筋などで誘導される転写コアクチベーターである。ミトコンドリアの生合成増加、骨格筋の赤筋化、脂肪酸利用増加などに関与し、代謝に影響を与えられると考えられている。また近年、脳内の PGC-1

が神経保護作用をもたらすことが、基礎研究レベルで報告されている (Neuroscience 2014. Dec 5;281:251-7)。その機序としては、SIRT1 遺伝子の誘導や酸化ストレスの軽減が示されているが、他にも神経栄養因子である BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) を誘導し神経保護作用を有することが示されている (Neuromol Med (2016)18:1-15)。これらを踏まえ、運動が POCD を抑制する機序として、運動による PGC-1 増加 脳内 BDNF の増加 脳内炎症抑制 POCD 抑制という仮説を立てた。

そして、本研究で最も重要な薬剤的な PGC-1 の発現については、ALA (Alpha-Lipoic Acid) が知られている。投与方法や量については様々 (経口摂取、腹腔内投与、静脈投与など) であるが、基礎研究レベルで PGC-1 の発現を増加し、糖尿病などに有効であることが示されている。

ALA 投与に伴う血中 PGC-1 および脳内 BDNF 濃度の推移の評価

本研究では、まず ALA の投与方法および量、またそれによる血中の PGC-1 および脳内 BDNF の時間推移について評価した。

過去の報告から経口摂取はかなり期間を要する (2-3 週間) ことが報告されており、手術と POCD を実臨床で考慮した時に、現実的ではないと判断し、最も簡便な腹腔内投与を選択した。ここで問題となったのが、ALA の溶媒である。報告によっては生理食塩水を用いたものもあるが、溶解することは非常に困難であった。腹腔内投与のため容量の限界もあるため、様々な溶媒を用いて検討を行った。その結果、hydroxypropyl-β-cyclodextrin 溶解液を溶媒として用いたとき、最も効率よく溶解することが出来たため、この溶液を用いて ALA を溶解し腹腔内投与を行った。量は過去の報告を元に 50mg/kg を単回投与とした。

() 非投与群、() 投与後 1 時間群、() 投与後 2 時間群、() 投与後 6 時間群、() 投与後 12 時間群、() 投与後 24 時間群の 6 グループに分けて、ALA 投与後各時間で、Isoflurane 深麻酔下に採血および断頭 海馬および前頭前皮質を摘出した。なお断頭時には開胸の上、心臓より細胞外液注入 + 脱血操作を行うことで脳内血液を washout した。

血液は遠心分離の上、血清のみ抽出し ELISA 法 (MY BioSource 社) を用いて PGC-1 濃度を測定した。海馬および前頭前皮質は PBS 液中に保存、Lysis Buffer に移してホモジナイゼーションを施行、遠心分離の上、上清を取り出し、こちらも ELISA 法 (R&D SYSTEMS 社) を用いて、BDNF を測定した。

ALA 投与による POCD 抑制効果の検証

上記、検証の結果、ALA 投与 6 時間で海馬 BDNF の増加が認められたことから、ALA 投与 6 時間後に、開腹手術を行い、術後 7 日目に新奇物体認識試験による認知機能の評価および断頭後、海馬を摘出し、炎症サイトカインである TNF- α を脳内炎症の指標として ELISA 法 (LEGEND MAX 社) を用いて評価した。

上記群を () ALA 群とし、() 対照群には溶媒である hydroxypropyl- β -cyclodextrin 溶解液のみを投与し、以降同プロトコールで検証した。

開腹手術は Isoflurane 麻酔下に、腹部 2 cm の正中切開、小腸を約 10cm 腹腔から引き出し、3 分間指で伸長させる方法を用いた。術後痛に対して閉腹時に 0.2% ロピバカインの浸潤麻酔を行う。手術 (麻酔) 時間は 15 分間とし、対照群では麻酔・術後鎮痛のみを行う。本モデルを用いた予備的研究において、海馬サイトカインの上昇が確認されている。

新奇物体認識試験は、ラットの新奇物体への嗜好性を用いた認知機能評価方法である (図 1)。まず、試験 3 日前から、試験を行うボックスに慣れさせるために、1 日 30 分間ボックス内で過ごさせる。試験当日もまずボックス内に 1 時間過ごさせた後、1 時間空けて、ボックス内に 2 つの同一物質 (ブロック) を置いた上で、5 分間自由に探索させる。その後、再び 1 時間空けて、今度は先ほど置いた物質のうちどちらか一つを別の物質にすり替えた上で、5 分間探索させる。この時、ラットの認知機能が保持されていれば、新奇性を好むという特性から、すり替えた物質への探索時間が増加する、即ち先ほどはなかった新しい物質であることを認識することが出来る。

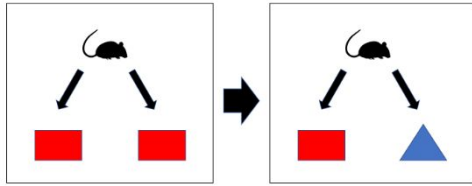


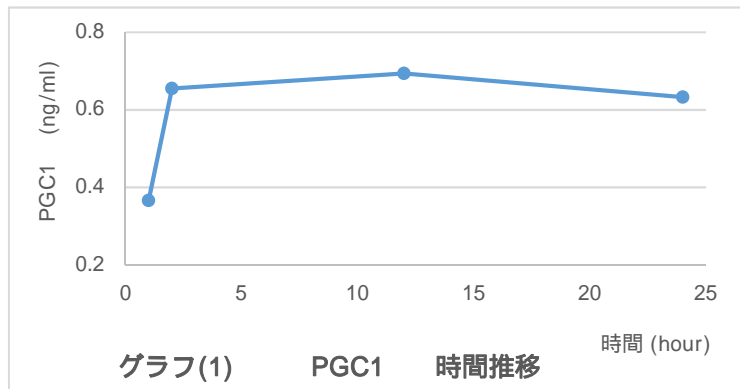
図 1 新奇物体認識試験

4. 研究成果

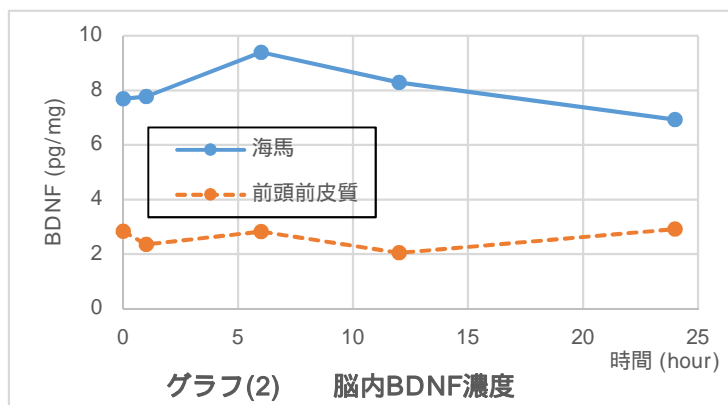
ALA 投与に伴う血中 PGC-1 および脳内 BDNF 濃度の推移の評価

ALA 投与後の血中 PGC-1 濃度の時間推移をグラフ (1) に、脳内 BDNF 濃度の時間推移をグラフ (2) に示す。

血中の PGC-1 においては、ALA 投与 2 時間後より優位に血中濃度の上昇を認め、その効果は 24 時間後でも持続していることが示された ($p=0.0281$, Kruskal-Wallis)。また、ALA 50mg/kg の単回腹腔内投与でも PGC-1 増加効果があることが実証された。



次に脳内 BDNF 濃度の推移であるが、まず海馬においては、術後 6 時間をピークとした推移を認めた。前頭前皮質においては、BDNF の濃度変化を認めなかった (海馬: $p=0.238$, 前頭前皮質: $p=0.362$, Kruskal-Wallis)。過去の我々の研究グループの報告でも、POCD における脳内炎症の首座は海馬であることを報告しており、また BDNF は海馬において活性が高いことが知られており、海馬の BDNF 上昇だけでも、脳内炎症抑制効果が期待されるため、前頭前皮質の BDNF 濃度推移についてはある程度想定範囲内であり問題としなかった。

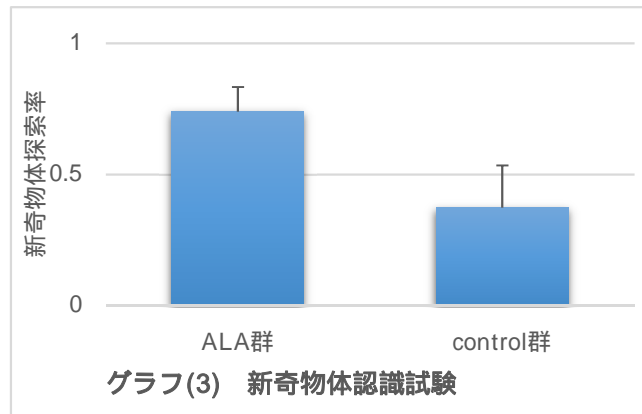


ALA 投与による POCD 抑制効果の検証

上記の結果を踏まえて、ALA 投与 6 時間後に開腹手術を行った。対照群には溶媒である hydroxypropyl-β-cyclodextrin 溶解液を腹腔内投与した。

まず、新奇物体認識試験の結果をグラフ (3) に示す。

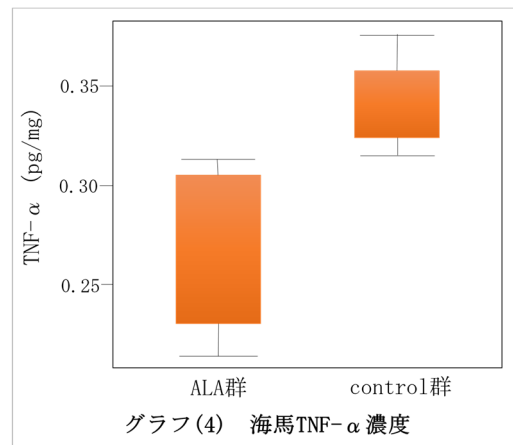
この結果、新奇物体探索率は、ALA 群で 74.0%、対照群で 37.4% となり、ALA 群において新奇物体への嗜好性、即ち認知機能が有意に保たれることが示された ($p=0.02$, Mann-Whitney U test)。



脳内炎症を示す TNF- α を調べた結果をグラフ (4) に示す。

この結果、海馬 TNF- α 濃度は、ALA 群で 0.27pg/mg に対して、対照群で 0.34pg/mg となり、有意に ALA 群で海馬 TNF- α の濃度低下を認めた ($p=0.01$, Mann-Whitney U test)。

これらの結果から、**開腹手術前に ALA を腹腔内投与することで、脳内 BDNF が増加し、脳内炎症を抑制することで、POCD の発症を予防することが出来る可能性が示唆された。**



近年、BDNF による神経保護作用は様々な領域で注目を浴びており、研究も進んでいる。BDNF アナログ自体を投与することで神経保護作用が認められることとは、我々の研究チームでも報告している (Life Sciences 197 (2018) 56-66) が、非常に高価であることが問題のひとつとして挙げられる。そうした現状の中で、比較的安価で、またサプリメントなどとしても市場に出ている ALA を用いて BDNF の発現を増加させることが実データで証明できたこと、また投与経路や時間推移をデータとして得ることが出来た意義は非常に大きく、BDNF が病態の要因と考えられるような領域でも今後生かしていくことができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立岩浩規、河野崇、横山正尚
2. 発表標題 高齢者の術後認知機能障害：防止対策 基礎研究からのアプローチ
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第65回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立岩浩規
2. 発表標題 神経麻酔アップデート：術後認知異常.
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会 第38回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立岩浩規
2. 発表標題 高次脳機能に対する周術期アプローチ - 最新ガイドラインから読み解く予防・治療法.
3. 学会等名 日本区域麻酔学会第 6 回学術集会.（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----