

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18247

研究課題名（和文）麻酔手術侵襲による腸内フローラ環境変容と認知機能低下との連動解明

研究課題名（英文）Elucidation of the link between the environmental change in the intestinal flora and cognitive decline due to anesthetic surgery

研究代表者

立花 俊祐（Tachibana, Shunsuke）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30737309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、周術期の腸内フローラを介した認知機能への影響とその機序解明を最大の目的とした。周術期を想定するマウス群を用いて、腸内フローラ多様性の変動を解析した。同様のマウス群を用いて、麻酔下に海馬組織の切除を行い血漿サイトカイン濃度を測定し、同時にRNAを抽出した。RNAはcDNAに変換したのち、先行研究でトランスクリプトーム解析にて選定された候補遺伝子を参考にして、qRT-PCRを施行し個別に発現解析した。高齢のマウスに対する手術麻酔侵襲は、脳内におけるRNA発現変化に影響する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの高齢者が手術麻酔を受ける現代において、周術期の認知機能低下、行動異常などを発症する原因を同定する可能性がある。また、これらの脳内での微細な変化は、事前にこれら現象発症を予測するためのマーカーともなりうるだろう。

研究成果の概要（英文）：The primary objective of this study was to elucidate the mechanisms and effects on cognitive function mediated by intestinal flora during the perioperative period. Using a group of mice that were assumed to be in the perioperative period, we analyzed the variation in intestinal flora diversity. The RNA was converted to cDNA and then analyzed individually by qRT-PCR with reference to candidate genes selected by transcriptome analysis in our previous study. Surgical and/or anesthetic invasions on older mice may affect changes in RNA expression in the brain.

研究分野：神経麻酔

キーワード：腸内フローラ 術後認知機能障害 dysbiosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症の制御は周術期を乗り越える上で重要な要素である。最近では、生体内の免疫を担う器官として、腸内フローラの存在が知られるようになった。腸内フローラは腸管免疫に深く関与し、広く生体内での免疫にも関わるといふ学説がコンセンサスを得つつある。腸内フローラを構成する菌種やバランスが変化する (dysbiosis) と腸管免疫の恒常性は破綻し、免疫代謝機構に異常をきたすことで炎症の波及の原因となる。

術後認知機能障害 (POCD) は術後亜急性に発症する認知機能低下を定義とし、臨床的には高齢者や当初から認知機能に低下がある患者において発症しやすいとされている。脳内における病態の機序は徐々に明らかになってきており、手術侵襲が TNF- α や IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインを誘導し、血液脳関門を脆弱化させることに端を発するとされている。したがって POCD を予防するために、腸管フローラの調整を介した炎症の抑制を検討することが本研究の学術的背景である。また、dysbiosis という現象が精神・神経疾患 (i.e. パーキンソン病、多発性硬化症、自閉症) に関連するのではないかという報告が散見されており、腸管免疫と脳神経機能に関する何らかの連動機序があるということが研究の学術的背景である。

2. 研究の目的

生体内における炎症を制御する器官のひとつが腸管であり、腸内フローラの構成の変化が大きく免疫機構に関与することを考慮するならば、麻酔・手術侵襲によって腸内環境が変化して脳神経機能に影響を与えることは間違いないだろう。よって本研究では、周術期の腸内フローラを介した認知機能への影響とその機序解明を最大の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高齢者における POCD の病態を解明するために、週齢が 78 週 (1 年 6 ヶ月) まで当施設で育成された C57/BL6 マウスを使用する。これらのマウスを、通常群 (麻酔や手術侵襲を与えていないもの)、セボフルラン曝露群、手術群 (セボフルラン曝露下に開腹手術を受けたもの)、抗生剤投与群 (手術群に抗生剤を与えたもの) に分類する。

(2) 上記のマウス群を用いて、処置介入後に麻酔下に盲腸内容物を回収し、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を行い、腸内フローラ多様性の変動を解析する。

(3) 上記のマウス群を用いて、麻酔下に採血と海馬組織の切除を行い、各種血漿サイトカイン濃度を ELISA 法 (細胞シグナリング関連 ELISA キット: PromoCell 社) を利用して解析する。海馬は単離したのち RNeasy plus micro キット (QIAGEN 社) を用いて RNA を抽出する。

(4) RNAi は cDNA に変換したのち、先行研究でトランスクリプトーム解析にて選定された候補遺伝子を参考にして、qRT-PCR を施行し個別に発現解析する。

【次年度】

腸内フローラの多様性の変容と炎症性サイトカインの変化、海馬での mRNA の変動を比較検討、パスウェイ解析を施行し腸脳関連の詳細を明らかにする。またバーンズメイズ試験を用い、目的地点までの行動速度や距離を測定することで、実際の認知機能を測定する。

【次々年度】

腸内フローラの安定化や脳内炎症の予防目的に、抗炎症性サイトカインである IL-10 を投与する。また、海馬における遺伝子発現を減弱させる miRNA を、*in silico* に Block-iT デザイナー

で作成し投与する。これらアンタゴニストを投与することにより、認知機能低下を抑制できるかをバーンズメイズ試験で確認する。次年度に向けて、ヒトを対象とする POCD 予防に向けての足掛かりとなるかどうかを検討する。

4. 研究成果

処置介入後に麻酔下に盲腸内容物を回収し、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を行ったところ、腸内フローラ多様性の変動を見いだすことはできなかった。本実験系で腸内細菌叢の変容を確認するには、計画した時間よりも長い時間が必要であることが示唆された。

海馬組織の切除を行いサイトカイン濃度をELISA法で計測したところ、こちらに関しても濃度の上昇は見られなかった。

候補遺伝子に関しても、過去の結果より注目したものに関して検討を加えた。Rtn4rl2 についてはセボフルラン曝露群、手術群とともに発現量が上昇した。シナプトタグミン1についても過去の報告通りセボフルラン曝露群、手術群とともに発現量が上昇する傾向にあった。シナプトタグミン9については、どの群についても発現量に有意差がなかった。炎症に至る前の発現遺伝子の変化が確認できたものとする。

バーンズメイズ試験に関しては、コロナ流行下での研究遂行遅延により達成することができなかった。

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〕

論文発表を含めての発表は、今後行う予定です。

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