

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670673

研究課題名(和文) デスフルランはなぜ術後認知機能低下を防ぐのか：高齢者の細胞骨格関連遺伝子の解析

研究課題名(英文) Analysis of cytoskeleton related genes in elderly patients

研究代表者

山蔭 道明 (Yamakage, Michiaki)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70285005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：吸入麻酔薬が術後認知機能の原因となりえるか検討した。ヒトにおいてデスフルランはセボフルランと比較して術後認知機能検査所見が改善する傾向が示唆された。ニューロンの細胞骨格を維持するために重要な遺伝子であるMAPT遺伝子、APP遺伝子についてヒトでは認知機能検査所見と関連する遺伝子多型は発見できなかった。マウス海馬ニューロンにおける全mRNA解析を行った結果、幼若マウスにおいてはLhx9遺伝子の発現が最も減弱する一方で、成熟マウスにおいてはLhx9遺伝子の発現は増大する傾向が示唆された。Lhx9遺伝子の発現量は術後認知機能障害のバイオマーカーとなりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether volatile anesthetics caused postoperative cognitive dysfunction (POCD). In humans, desflurane anesthesia showed a better mini mental examination score than did sevoflurane anesthesia. However, we could not find any genetic polymorphisms associated with cognitive function in humans. To examine the association between general anesthesia and POCD, we investigated whole mRNA expression in mouse hippocampal cells by a transcriptome-wide association study. While expression of the Lhx9 gene was suppressed by exposure to volatile anesthetics in juvenile mice, expression of Lhx9 gene was greatly enhanced by exposure to volatile anesthetics in adult mice. These results suggest that volatile anesthetics affect the differentiation of stem cells in the mouse hippocampus, and the results should be useful for exploring biomarkers of POCD.

研究分野：麻酔科学

キーワード：術後認知機能障害

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔や手術を契機とする術後認知機能障害(POCD)が近年臨床的に非常に大きな問題となっている。本邦では 2001 年に新たに上市されたデスフルランを用いて、それまで臨床的に頻用されていたセボフルランと POCD に対して異なる影響を及ぼすか検討し、分子遺伝学的検討を用いてこれら吸入麻酔薬の POCD に対する影響について検討することとした。

2. 研究の目的

麻酔覚醒時の異常興奮や急性せん妄は、小児や若年男性に多く発症することが知られており、歯牙損傷や口腔内損傷、転落、術創への意図しない損傷など、重篤な合併症の原因となりえる。全身麻酔後の異常興奮は臨床的に麻酔施行前の強い不安や術後の痛みが原因として指摘されているが、分子生物学的な機序は不明である。近年幼若げっ歯類を用いた動物実験において、吸入麻酔薬の海馬ニューロンにおける炎症性サイトカインの誘導が認知機能を障害させる可能性が示唆されており、若年者における全身麻酔後の異常興奮は全身麻酔薬による海馬ニューロンへの作用が関与していると思われる。近年本邦において上市されたデスフルランを用いて異なる種類の吸入麻酔薬が異なる覚醒プロファイルを示すか、臨床的に検討することを目的として 65 歳以上の術前に認知機能障害を指摘されていない 4 時間以上の長時間手術を予定された患者を対象とし、デスフルランとセボフルランで全身麻酔を受けた患者について術前・術後に mini-mental state examination (MMSE) スコアを測定し、吸入麻酔薬ごとの差が生じるか検討する。海馬における吸入麻酔薬の影響を検討するため、マウス脳での細胞骨格の形成に参与する MAPT 遺伝子、APP 遺伝子発現について解析し、吸入麻酔薬曝露や手術侵襲によってこれらの遺伝子発現が変化するか検討する。

3. 研究の方法

1) 手術患者の白血球 DNA を抽出し、ニューロンの細胞骨格の安定化に参与する MAPT・APP 遺伝子について遺伝子多型解析・エピジェネティック解析を行い、術後認知機能障害(POCD)との関連を検討する。
80 歳以上で術前に明らかな認知症のない予定開腹術を受ける患者を対象に、デスフルランまたはセボフルランで全身麻酔を行い、術前後 24 時間、術後 1 週間、術後 3 カ月時点で神経学的テスト(MMSE, DST, TMT など)を用いて POCD の評価を行う。患者全血から抽出したゲノム DNA を用い、MAPT 遺伝子と APP 遺伝子の DNA 配列の解読を行い、遺伝子変異(SNPs や CNVs)を探索する。複数の遺伝子多型を同時に検討するハプロタイプ解析も行う。リアルタイム PCR を基盤としたメチル化特異的高感度融解曲線分析(MS-HRM)で DNA メ

チル化を検討する。

2) 生後 1 年の老年マウスを対象とし、吸入麻酔薬を曝露した開腹手術モデルを作製し、バーズ迷路による認知機能の変化を観察する。また操作前後で MAPT・APP 遺伝子の脳内 mRNA 発現解析を行う。マウスは初年度に生後 12 週で購入し、9 カ月間飼育し生後 1 年の老年マウスとする。老年マウスはセボフルランまたはデスフルラン 1MAC 下に開腹手術モデル(開腹し、10cm の腸管を 30 秒間露出する)を作製し、再度バーズ迷路により術後の認知機能を観察する。さらにタウタンパクを翻訳する MAPT 遺伝子の mRNA が強く発現している海馬のニューロンを単離して mRNA 発現量との関連を検討する。

4. 研究成果

ヒトにおいて老年期における吸入麻酔薬曝露は、術後 24 時間時点で MMSE スコアを悪化させなかったが、デスフルラン群において MMSE スコアが有意に改善した(図 1)。

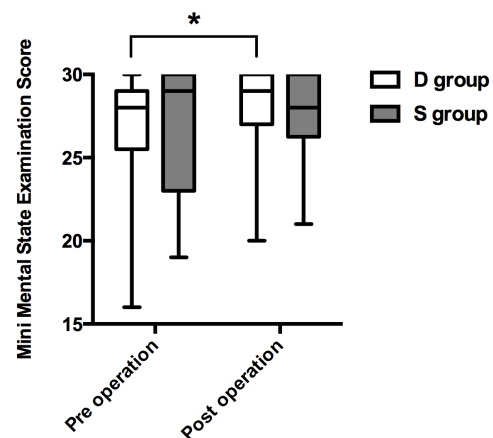


図 1 術後 24 時間時点の mini mental state examination(MMSE)スコアの比較。デスフルランで麻酔された群は術後 MMSE スコアが改善した。(D group: デスフルランで全身麻酔を受けた群、S group: セボフルランで全身麻酔を受けた群)

ヒトにおける MAPT 遺伝子、APP 遺伝子について当初予定していた次世代シーケンサーによる大量塩基配列解析はプライマーの設計が不能であり実施できず、Haploview ソフトウェアを用いてハプロタイプを作製し、MMSE スコアと関連する一塩基多型の有無について解析を行った。結果として有意な一塩基多型は見つけれなかった。また MS-HRM 法によるメチル化率解析に関しては MAPT、APP 遺伝子ともに遺伝子上流のプロモーター領域付近の融解度曲線は直線的ではなく、プライマー作製が不可能であった。マウスにおける MAPT、APP 遺伝子の海馬における発現について検討を行った結果、全身麻酔モデルおよび手術モデルマウスともに MAPT、APP 遺伝子の変化は認められなかった。

そこで新たに8週齢の幼若マウスに対して海馬における遺伝子変化を検討するため、同様のモデルマウスについて全 mRNA を網羅的に解析する(トランスクリプトーム解析)を実施した。その結果 Rtn4r12 遺伝子が最も発現が増大し、Lhx9 遺伝子の発現が最も抑制された。さらに35週齢の壮年マウスでは Lhx9 遺伝子が最も若年マウスよりも増大する結果が得られ、Lhx9 遺伝子および Lhx9 遺伝子のコードする LIM homeodomain protein family は POCD のバイオマーカーとなりえる可能性が示唆された。

表 1 若年マウスにおいて発現の増大する上位 10 遺伝子

Gene ID	Gene name	Log ₂ ratio
Rtn4r12	Reticulon 4 receptor-like 2	7.80
Mas1	MAS1 oncogene	7.76
Gpx6	Glutathione peroxidase 6	7.62
Ovo12	Ovo-like 2 (Drosophila)	7.19
Calcr	Calcitonin receptor	6.81
Impg1	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1	6.72
Neurod6	Neurogenic differentiation 6	6.33
Neurod2	Neurogenic differentiation 2	6.30
Dio3	Deiodinase, iodothyronine type III	5.91
Cd6	CD6 antigen	5.80

表 2 壮年マウスにおいて発現の増大する上位 10 遺伝子

Gene ID	Gene Name	Log ₂ ratio
Lhx9	LIM homeobox protein	9.21

	9	
Pou4f1	POU domain, class 4, transcription factor 1	8.72
Htr5b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	7.48
Cbln3	Cerebellin 3 precursor protein	7.33
Gpr151	G protein-coupled receptor 151	7.08
Irx3	Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)	6.84
Umod1	Uromodulin-like 1	6.72
Slc5a1	Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	6.71
Irx2	Iroquois related homeobox 2 (Drosophila)	6.48
lyd	Iodotyrosine deiodinase	6.41

よってわれわれの研究結果をまとめると、
 1) ヒトにおいて吸入麻酔薬の認知機能に対する影響が異なる可能性が示唆された。これらの結果は MAPT 遺伝子、APP 遺伝子多型との関連は指摘されなかった。
 2) マウスにおいて Mapt 遺伝子、App 遺伝子の発現は吸入麻酔薬曝露・手術侵襲によって増大しなかった。Lhx9 遺伝子は週齢によって大きく発現様式が異なり、POCD のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 28 件)

1. Hayase T, Tachibana S, Yamakage M. Effect of sevoflurane anesthesia on the comprehensive mRNA expression profile of the mouse hippocampus. Med Gas Res. 2016; 6(1): (in press, peer-reviewed)
2. Takahashi K, Niiya T, Takada Y, Narimatsu E, Yamakage M. Severity of Myasthenia Gravis Influences the Relationship between Train-of-four Ratio and Twitch Tension and Run-down of Rat Endplate Potentials. Anesthesiology. 2016; 124(2): 369-77. (peer-reviewed)
3. Hayase T, Sugino S, Moriya H, Yamakage M. TACR1 gene polymorphism and sex differences in postoperative nausea and vomiting. Anaesthesia. 2015; 70(10): 1148-59. (peer-reviewed)
4. Tachibana S, Hayase T, Osuda M, Kazuma S, Yamakage M. Recovery of postoperative cognitive function in elderly patients after a long duration of desflurane anesthesia: a pilot study. J Anesth. 2015; 29(4): 627-30. (peer-reviewed)
5. Chaki T, Sugino S, Janicki PK, Ishioka Y, Hatakeyama Y, Hayase T, Kaneuchi-Yamashita M, Kohri N, Yamakage M. Efficacy and Safety of a Lidocaine and Ropivacaine Mixture for Scalp Nerve Block and Local Infiltration Anesthesia in Patients Undergoing Awake Craniotomy. J Neurosurg Anesthesiol. 2016 ; 28(1): 1-5. (peer-reviewed)

ほか 23 件

〔学会発表〕(計 82 件)

1. Tachibana S, Hayase T, Yamakage M. Possible Mechanism of Neuroinflammation Induced by Surgical Procedure in the Mouse Hippocampus Determined by Using Transcriptome Analysis. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市
2. Hayase T, Tachibana S, Yamakage M. Prediction of the Molecular Mechanism of Postoperative Nausea and Vomiting Using Transcriptome Analysis. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市
3. Takada Y, Narimatsu E, Takahashi K, Niiya T, Yamakage M. Elevation and Suppression of Paraoxon-induced Epileptic Activity in the Rat Hippocampus. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市

4. Kazuma S, Tokinaga Y, Takada Y, Hayashi S, Azumaguchi R, Kimizuka M, Yamakage M. Both Desflurane and Sevoflurane Inhibit Endothelium-dependent Vasodilation By Different Mechanisms. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市

5. Kumita S, Tachibana S, Hayase T, Yamakage M. Usefulness of Self-made Genetic Testing in Malignant Hyperthermia Patients. The Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2015 年 10 月 24 日~28 日、米国 San Diego 市
他 77 件

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山蔭 道明 (YAMAKAGE MICHIAKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70285005

(2) 研究分担者

早瀬 知 (HAYASE TOMO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：20579007

(3) 連携研究者

()

研究者番号：