

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462350

研究課題名(和文) Neurogenesisに焦点をあてた術後の認知機能障害の発症機序と予防法の解明

研究課題名(英文) Postoperative impairment of cognitive function in rats: A possible role of hippocampal neurogenesis

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：手術侵襲が海馬歯状回におけるneurogenesisにどのような影響を与え、それが手術後の学習・記憶障害とどのような関わりを持つか、また手術前からフルオキシセチンを投与してneurogenesisを促進すると手術後の学習・記憶障害が軽減するかを調べた。その結果、3か月ラットでは手術侵襲によって海馬歯状回のneurogenesisは低下するとともに、学習・記憶能力が低下したが、フルオキシセチンを手術前に投与すると、海馬歯状回のneurogenesisの低下が軽減されるとともに、学習・記憶能力が改善した。これらは、海馬の脳由来神経栄養因子(BDNF)濃度と関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： This study was conducted to evaluate the effects of surgery on hippocampal neurogenesis and postoperative learning and memory function. In addition, preoperative prophylactic treatment of fluoxetine for the surgery-induced decrease of hippocampal neurogenesis and postoperative learning and memory dysfunction were determined. Hippocampal neurogenesis and postoperative learning and memory function were affected after surgery in 3 months rats. Preoperative fluoxetine administration reduced the surgery-induced decrease of hippocampal neurogenesis and postoperative learning and memory dysfunction. These results were related with the concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus.

研究分野：周術期管理学

キーワード：神経新生 術後高次機能障害 手術 全身麻酔 海馬歯状回

1. 研究開始当初の背景

我が国は現在、人口の高齢化という問題を抱えており、高齢者の手術は増加の一途をたどっている。しかし、様々な合併症を有し予備能が低下している高齢患者は、周術期に高い確率で合併症を起こす。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が、ひとたびそれが起これば、例えば手術が成功したとしても患者の生活の質を落とし、入院中や退院後のケアに多くの費用と時間を費やすことになる。よって、高齢者の POCD 対策は、安全な医療の提供という観点からだけでなく、医療経済という観点からみても極めて重要である。

POCD の発症機序については未だ不明であるが、近年の動物を用いた研究により、麻酔薬や手術侵襲、加齢などが脳内の炎症反応 (neuroinflammation) を惹起し、高次機能障害を引き起こすことが明らかにされている。また、neuroinflammation を抑制する作用をもつミノサイクリンやインターロイキン-1 受容体拮抗薬、シクロオキシゲナーゼ-2 阻害薬に予防薬としての可能性があることも報告されている。しかし、POCD の発症機序についての解明は十分でなく、今後も様々な角度から研究が行われる必要がある。

最近の研究では、海馬歯状回の subgranular zone (SGZ) において、成体においても神経細胞が新生されることが明らかにされている (neurogenesis)。この新たに産生されたニューロンが既存のニューロンネットワークに入り込んでいくことが、記憶の形成に大きな役割を果たすと考えられている。neurogenesis はストレス環境下で低下することが知られているが、手術侵襲が neurogenesis にどのような影響を与えるかについては明らかにされていない。一方、選択的セロトニン再取り込み阻害薬のフルオキセチンに neurogenesis を促進させる働きがあることが知られている。フルオロウラシルによる化学療法中におこる学習・記憶障害に対して治療前からフルオキセチンを投与しておくことで、neurogenesis が維持され障害の程度が軽減されることが報告されていることから、手術前からフルオキセチンを投与し neurogenesis を促進することで手術後の学習・記憶障害を軽減できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ラットを用いて、手術侵襲が海馬歯状回の SGZ における neurogenesis にどのような影響を与え、それが手術後の学習・記憶障害とどのような関わりを持つかを明らかにするとともに、手術前からフルオキセチンを投与して neurogenesis を促進すると手術後の学習・記憶障害が軽減するかを検

討し、フルオキセチンの予防効果を明らかにする。

3. 研究の方法

3ヶ月のオスの Fisher344 ラットを1週間馴化した後、コントロール群、麻酔のみ群、手術のみ群、手術+フルオキセチン投与群の4群に分けた(各群 n=9)。手術+フルオキセチン投与群はフルオキセチン 10 mg/kg/日を手術前21日間経口投与した。3日毎に体重と飲水量を測定し、フルオキセチンを1日に10 mg/kg 摂取できるように飲用水に溶解するフルオキセチンの量を調節した。麻酔のみ群、手術のみ群、手術+フルオキセチン投与群は2%イソフルラン吸入による全身麻酔を12分間行った。手術のみ群、手術+フルオキセチン投与群はその間に開腹手術を施した。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。その後絹糸5針で腹壁を縫合・閉鎖。ナイロン糸で皮膚を縫合した。鎮痛は創部に0.2%ロピバカインを0.5cc皮下注した。コントロール群は普段過ごしているケージとは別のケージの中で12分間過ごした。

術後4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日間行った後に、probe phase を行った。training phase は、直径150cmのプールの中に直径10cm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区域を探索する時間の割合を測定した。

海馬歯状回の neurogenesis を調べるため、別のラットを用い(各群 n=5)術後4日目に安楽死させて、4%パラホルムアルデヒドで還流・固定。脳を摘出し、凍結切片を作成した。Ki67 抗体を用いて免疫染色を行い、海馬歯状回の SGZ の Ki67 抗体陽性細胞数をカウントして細胞分裂中の細胞数を観察した。また、Doublecortin (DCX) 抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、海馬歯状回の SGZ の DCX 抗体染色面積を測定し、新生ニューロンの増殖を観察した。

さらに、学習・記憶障害や neurogenesis が低下する原因を調べるため、別のラットを用い(各群 n=5)術後1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 で脳由来神経栄養因子 (Brain derived neurotrophic factor: BDNF) 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 体重の変化

3日毎に測定した体重の変化を図1に示す。術前にフルオキシセチンを投与した群は他の3群に比べて、投与開始6日目から有意に体重が少なかった。これは、フルオキシセチンを投与すると腸管からの吸収が低下することが原因であると考えられた。

また、手術を施行した群は施行しなかった群に比べて、術後4日目の体重が有意に低かった。MWM後(術後9日目)も手術を施行した群は施行しなかった群に比べて、体重が有意に低かった。

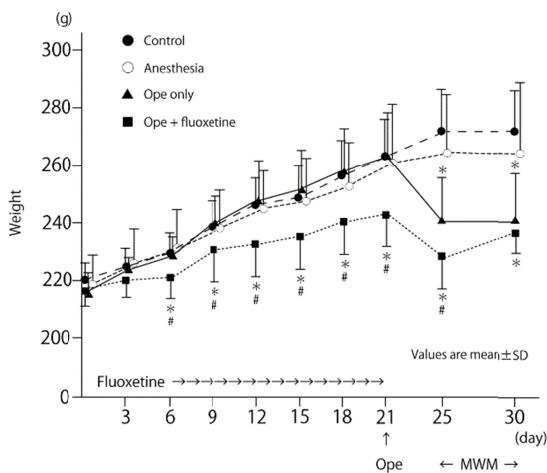


図1 体重の変化

* < 0.05 vs. コントロール群、麻酔のみ群
< 0.05 vs. 手術のみ群

(2) Morris Water Maze

術後4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2)、到達距離(図3)、遊泳速度(図4) probe phase における、プラットフォームが置いてあった区域(プールの4分の1)を探索した時間の割合(図5)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が短くなっていった。それぞれの training session 毎のプラットフォームまでの到達時間と到達距離については4群間に差はなかった。

しかし、probe phase では、手術のみ群がコントロール群や麻酔のみ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く、手術によって学習・記憶障害が起こることが示された。一方、術前にフルオキシセチンを投与した群は手術のみ群に比べて、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、術前のフルオキシセチン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。ただし、術前にフルオキシセチンを投与した群はコントロール群や麻酔のみ群よりも、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、フルオキシセチン投与そのものによる学習・記憶能力への作用があることも示唆される。

一方、それぞれの training session 毎の遊泳速度については4群間に差はなく、手術や投薬が遊泳能力を変化させ、それが結果に影響を与えた可能性はないことが示された。

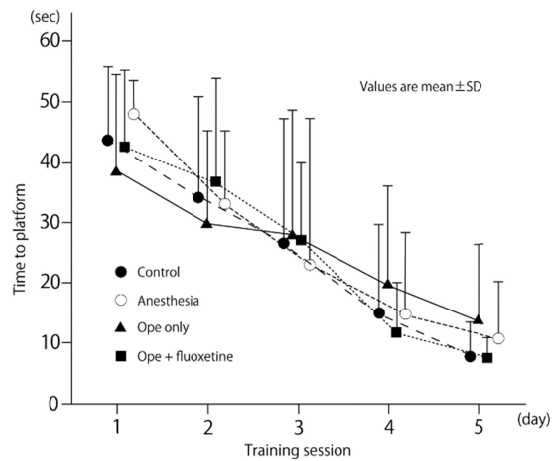


図2 プラットフォームまでの到達時間

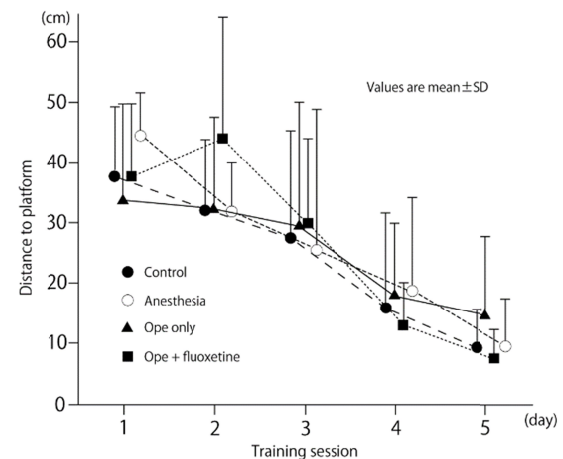


図3 プラットフォームまでの到達距離

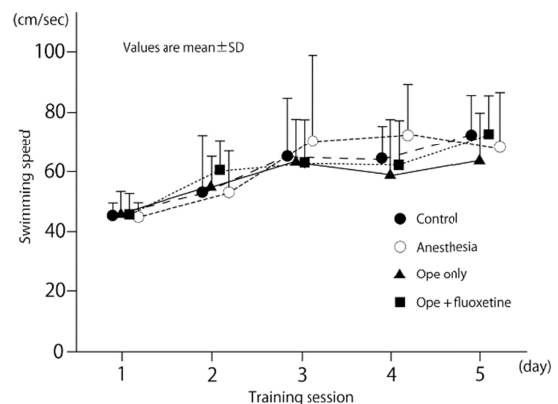


図4 平均の遊泳速度

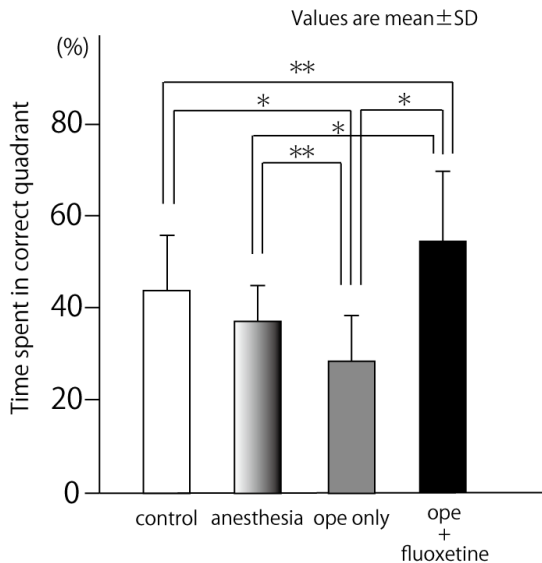


図5 プラットフォームが置いてあった区域を探索した時間の割合 (Probe phase)
* < 0.01、** < 0.05

(3) neurogenesis

術後4日目の海馬歯状回における、Ki67抗体陽性細胞数(図6)とDCX抗体染色面積(図7)を示す。

Ki67抗体を用いて免疫染色を行い、海馬歯状回のKi67抗体陽性細胞数をカウントして細胞分裂中の細胞数を観察したところ、4群間に差はなかった。

DCX抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、海馬歯状回のDCX抗体染色面積の測定により新生ニューロンの増殖を観察したところ、手術のみ群がコントロール群や麻酔のみ群に比べて有意に低く、手術によってneurogenesisの低下が起こることが示された。また、術前にフルオキシセチンを投与した群は手術のみ群に比べて、DCX抗体染色面積が有意に高く、術前のフルオキシセチンの投与が手術によるneurogenesisの低下を予防する効果があることが示された。しかし、術前にフルオキシセチンを投与した群はコントロール群に比べて、DCX抗体染色面積が有意に低く、術前にフルオキシセチンを投与してもneurogenesisを十分維持できるわけではないことが示された。

一方、Ki67抗体陽性細胞で示された細胞分裂中の細胞数は4群間で差はなかったにもかかわらず、DCX抗体染色面積で示された新生ニューロンの増殖は手術のみ群で低かった。これは、手術侵襲は新生ニューロンの細胞分裂には影響を与えず、分化に影響を与える可能性があると考えられた。Neurogenesisに対して手術侵襲がどのような形で影響を与えるについては、今後も検討が必要であると思われる。

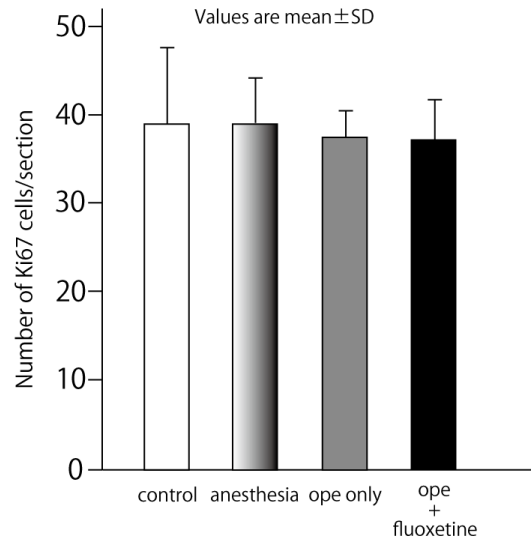


図6 海馬歯状回におけるKi67抗体陽性細胞数

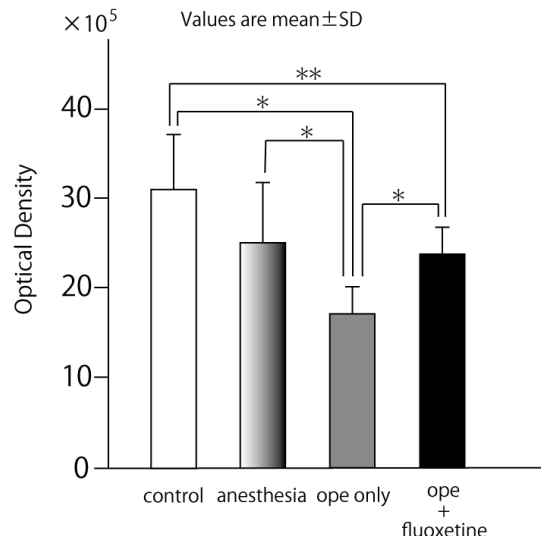


図7 海馬歯状回におけるDCX抗体染色面積
* < 0.01、** < 0.05

(4) BDNF

術後1日目の海馬のBDNF濃度(図8)を示す。海馬のBDNF濃度は、手術のみ群がコントロール群に比べて有意に低く、手術によって海馬のBDNF濃度が低下することが示された。一方、術前にフルオキシセチンを投与した群は手術のみ群に比べて有意に高く、術前のフルオキシセチンの投与が手術による海馬のBDNF濃度の低下を予防することが示された。

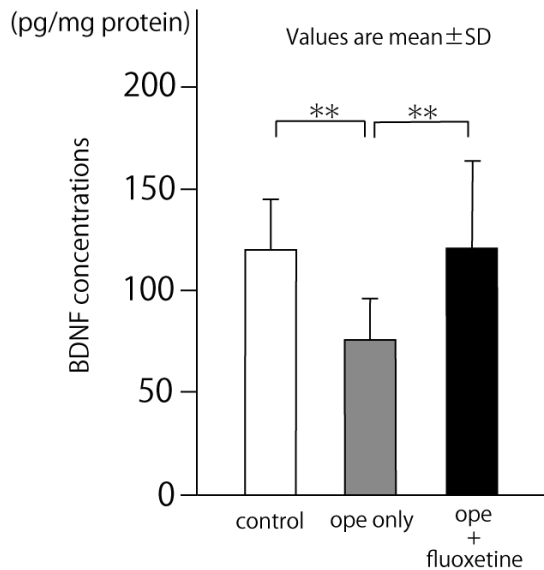


図8 海馬のBDNF濃度

** < 0.05

以上の結果から、手術侵襲は術後に学習・記憶障害を引き起こすことが明らかになった。手術侵襲により海馬の neurogenesis や BDNF 濃度も低下していることから、この学習・記憶障害は、手術侵襲による BDNF 濃度の減少から neurogenesis の低下をきたし発症したものと考えられた。

一方、術前のフルオキセチンの投与により、術後の学習・記憶障害が予防できることも明らかになった。フルオキセチンの投与により、海馬の neurogenesis や BDNF 濃度も回復することから、この予防効果は BDNF 濃度の上昇が neurogenesis を促進させたことによるものと考えられた。しかし、フルオキセチンを投与すると、neurogenesis はコントロール群ほど促進されていないにもかかわらず、学習・記憶能力はコントロール群を上回る結果を示した。フルオキセチンは抗炎症作用なども有するため、neurogenesis 以外の作用も影響を与えた可能性もある。また、フルオキセチン投与そのものによる学習・記憶能力への作用があることも考えられる。フルオキセチンの予防効果については今後も検討が必要である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 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