



Suppression of behavioral activity and hippocampal noradrenaline caused by surgical stress in type 2 diabetes model mice

Nishimura, Momoka

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2020-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7821号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007821>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Suppression of behavioral activity and hippocampal noradrenaline
caused by surgical stress in type 2 diabetes model mice

手術侵襲がもたらす2型糖尿病モデルマウスの行動抑制と
海馬のノルアドレナリン抑制

神戸大学大学院医学研究科医学専攻

麻酔科学

(指導教員：溝渕 知司 教授)

西村 杏香

【背景】

近年、周術期に発生する精神神経学的合併症が問題視される中、そのリスク因子として、肥満、糖尿病、脂質代謝異常などが報告されている。糖尿病患者は4億2500万人に上り、その90%以上が食事や生活習慣が原因とされる2型糖尿病患者である。糖尿病患者では、術後早期に、認知機能の悪化や精神疾患の進行、術後せん妄などが非糖尿病患者よりも生じやすいと言われている。しかし、糖尿病患者において、術後に精神神経学的な障害や行動変化が生じる病態機序については不明である。手術を受ける糖尿病患者がますます増加することを考えると、糖尿病患者における手術侵襲による精神神経学的な影響について調べることは重要である。

一方、神経伝達物質であるモノアミンは、覚醒、認知活動、情緒的な活動に重要であると報告されており、モノアミン系の障害はうつ病、情動障害、不安障害などの精神疾患と関連する。精神病理学的観点から、我々は神経伝達物質の障害が糖尿病患者における術後の行動変化や精神疾患と関連があるのでないかと仮説を立てた。

モノアミンの中でも、ノルアドレナリンはストレス時の動態変化や予期せぬ状況での活性化が示唆されている。また、青斑核からの皮質や海馬へのノルアドレナリンの投射は注意力の調節にも深く関わっているとされる。動物モデルにおいて、海馬のノルアドレナリンシグナルの増加は神経可塑性、シナプス可塑性、記憶の想起と関連すると言われる一方、海馬のノルアドレナリン値の減少は不安、抑うつ、低活動性などとの関連が示唆されている。しかし、海馬ノルアドレナリン系に対する手術侵襲が与える影響については不明である。

したがって、本研究では、糖尿病状態における周術期の行動変化と海馬のノルアドレナリンに焦点を当て、2型糖尿病モデルマウス (Type 2 diabetes mellitus; T2DM) を用いて、手術侵襲が術後の行動および海馬のノルアドレナリンに与える影響について調べた。

【方法】

84匹の6週齢の雄性C57BL/6Jマウスを4群 (Non-DM群、Non-DM手術群、T2DM群、T2DM手術群) に分類した。T2DMは高脂肪食 (High Fat Diet; HFD) を8週間摂食させることで作製し、体重と空腹時血糖値の推移の測定、腹腔内ブドウ糖負荷試験、HbA1c測定を行った。14週齢において、各群15匹のマウスに対して、オープンフィールド試験、新奇物体認識試験、明暗試験を含む一連の行動実験を施行した。手術群に対しては行動実験24時間前にセボフルランによる全身麻酔下、開腹腸管操作手術を施行した。また、各群6匹のマウスに対して、高速液体クロマトグラフィーにより海馬のノルアドレナリン濃度を

測定した。統計は反復測定分散分析と Mann-Whitney U 検定を用いて行い、P 値<0.05 未満を統計学的有意差ありとした。

【結果】

T2DM 群の体重は Non-DM 群と比較して有意に増加した（各群 n=12、P<0.0001）。空腹時血糖値は T2DM 群では Non-DM 群と比較して有意に上昇した（各群 n=12, P<0.0001）。13 週齢で施行した腹腔内ブドウ糖負荷試験において、T2DM 群は Non-DM 群よりも有意に血糖値が上昇し、高血糖の遷延を認め（各群 n=12, P<0.0001）、HFD 摂食による耐糖能異常が示唆された。HbA1c も T2DM 群において、Non-DM 群よりも有意に高値であった（各群 n=10、P=0.009）。

探索活動と認知機能を評価した新奇物体認識試験において、獲得試行での総探索時間が T2DM 群で Non-DM 群と比較して有意に増加した（P=0.001）。また、探索活動と不安を評価した明暗試験において、T2DM 群は Non-DM 群よりも有意に明暗箱の移動回数が増加した（P=0.043）。一方、自発活動と不安様行動を評価したオープンフィールド試験において、総運動距離と中心滞在時間は T2DM 群と Non-DM 群の間で有意な差を認めなかった。新奇物体認識試験でのテスト試行において、識別指数は T2DM 群、Non-DM 群の間で有意な差は認めず、本実験では認知機能障害は認めなかった。

手術侵襲による術後の行動変化を評価するため、開腹腸管操作手術 24 時間後に、同様の一連の行動試験を Non-DM 手術群および T2DM 手術群に対して施行した。オープンフィールド試験において、T2DM 手術群では T2DM 群に比較して、総運動距離の有意な減少を認めたが（P=0.015）、Non-DM マウスではその変化は認めなかった。中心滞在時間は Non-DM 手術群でも T2DM 手術群でも術前に比較して有意に減少し（Non-DM 群 vs Non-DM 手術群：P=0.006、T2DM 群 vs T2DM 手術群：P=0.006）、Non-DM マウス、T2DM マウスのいずれにおいても手術侵襲が不安様行動をもたらすことが示唆された。新奇物体認識試験の獲得試行において、T2DM 手術群は T2DM 群に比較して、総探索時間が有意に減少したが（P=0.009）、Non-DM マウスではその変化は認めなかった。また、明暗試験において、T2DM 手術群では T2DM 群に比較して、明暗箱の移動回数が有意に減少した（P=0.007）。一方、新奇物体認識試験のテスト試行では、Non-DM 手術群、T2DM 手術群いずれにおいても識別指数に有意な差は認めず、術後の認知機能障害は示唆されなかった。

高速液体クロマトグラフィーを用いた海馬のノルアドレナリン解析では、術前に Non-DM 群と T2DM 群で海馬のノルアドレナリンに有意な差は認めなかった。しかし、手術侵襲後である T2DM 手術群は T2DM 群に比較して、海馬ノ

ルアドレナリンが有意に減少した（P=0.015）。一方、この変化は Non-DM マウスでは認めなかった。

【考察】

本研究では 8 週間 HFD を摂食させた T2DM モデルマウスは新奇物体認識試験において探索活動が増加し、明暗試験において移動回数が増加した。術後には Non-DM 群と T2DM 群の間で有意な差は認めなかったが、T2DM マウスに焦点を当てるとき、術後には術前に比較して有意に活動が低下し、海馬のノルアドレナリンが減少した。これらの知見から、手術侵襲が T2DM において行動と海馬のノルアドレナリンに抑制的な影響を与えることが示唆された。

T2DM 群において、活動性が増加したことに関して、6 週齢の雄性のマウスに 2 週間 HFD を摂食させたモデルにおいて、同様に新奇物体認識試験で探索活動が増加したという報告がある。一方、HFD を 14 週間摂食させたアルビノマウスでは明暗試験で移動回数が減少したとの報告もあり、HFD の摂食期間の違いが行動変化の違いをもたらしたと考えた。抗不安薬投与により、明暗箱間の移動回数が増加すると報告されており、T2DM 群では不安が少ないとによって明暗試験での移動回数が増加したことが示唆された。

本研究において、開腹手術による手術侵襲は T2DM マウスにオープンフィールドでの総運動距離の減少、新奇物体認識試験での総探索時間の減少、明暗試験での移動回数の減少によって示される低活動性をもたらした。HFD 摂食モデルに対して手術侵襲を加えた報告で、15 ヶ月のマウスに 14 週間 HFD を摂食させたモデルにおいて、肺骨骨折内固定術後にオープンフィールド試験を施行したものがあり、総運動距離が減少しなかったとしている。この点に関して、手術侵襲の種類、HFD 摂食時期、マウスの週齢が異なっていた。不安様行動に関して、T2DM も Non-DM マウスもいずれも手術侵襲後には術前に比較してオープンフィールド試験での中心滞在時間が減少し、いずれの群も術後に不安様行動が増加したことが示唆された。この結果は、16 ヶ月のラットに対して、脾臓摘出後に中心滞在時間が減少したとの報告と類似していた。また、不安によって明暗試験での移動回数が減少することが言われており、本研究結果から、T2DM マウスにおいて、手術侵襲がもたらした不安な状態が、各行動試験で術後の低活動性をもたらした可能性があると考えた。

本研究では手術侵襲により T2DM マウスにおいて術前に比較して術後に海馬のノルアドレナリン濃度の減少を認めた。海馬のノルアドレナリンに対する手術の影響に関して、嗅球切除術によるうつ病ラットで、手術 2 週間後に海馬のノルアドレナリンが減少したとする報告がある。また、慢性的に予測不可能な軽度なストレスを 6 週間与えたマウスにおいて、海馬のノルアドレナリンが減少

したとの報告がある。これらの知見から、T2DM マウスにおいて、手術侵襲が海馬のノルアドレナリン減少をもたらし、このことが T2DM マウスでの術後の行動抑制に関連している可能性があると考えた。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、実験に用いるマウスをできるだけ少なくするために、限られた期間に同一マウスに対して一連の行動評価を施行した。行動に関してさらに詳しく評価するためには、認知、不安、うつ様行動を評価するための他の試験も必要である。第二に、手術侵襲として開腹腸管操作手術を施行し、行動評価を 24 時間後に行ったが、実際の糖尿病患者における術後の手術侵襲を忠実に模倣したものではない。最後に、本研究では海馬のノルアドレナリンに関するシグナルの増減に関しては観察できていない。よって、T2DM に対する手術侵襲が与える術後の行動変化と海馬のノルアドレナリンの関連について証明するためには、更なる研究が必要である。

【結語】

8 週間 HFD を摂食させた T2DM モデルマウスが行動変化を示し、T2DM モデルマウスに対する手術侵襲が術後の低活動性と海馬のノルアドレナリン減少をもたらした。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2963 号	氏名	西村 杏香
論文題目 Title of Dissertation	Suppression of behavioral activity and hippocampal noradrenaline caused by surgical stress in type 2 diabetes model mice 手術侵襲がもたらす2型糖尿病モデルマウスの行動抑制と海馬のノルアドレナリン抑制		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	眞庭 謙昌	
	副査 Vice-examiner	曾良一郎	
	副査 Vice-examiner	古屋敷智之	

(要旨は1,000字~2,000字程度)

近年、周術期に発生する精神神経学的合併症について議論がなされている。そのリスク因子として、肥満、糖尿病、脂質代謝異常などが報告されている。糖尿病患者は4億2500万人に上り、その90%以上が食事や生活習慣が原因とされる2型糖尿病患者である。糖尿病患者では、術後早期に、認知機能の悪化や精神疾患の進行、術後せん妄などが非糖尿病患者よりも生じやすいと言われている。しかし、糖尿病患者において、術後に精神神経学的な障害や行動変化が生じる病態機序については不明である。手術を受ける糖尿病患者がますます増加することを考えると、糖尿病患者における手術侵襲による精神神経学的な影響について調べることは重要である。

一方、神経伝達物質であるモノアミンは、覚醒、認知活動、情緒的な活動に重要であると報告されており、モノアミン系の障害はうつ病、情動障害、不安障害などの精神疾患と関連するとされる。精神病理学的観点から、我々は神経伝達物質の障害が糖尿病患者における術後の行動変化や精神疾患と関連があるのではないかと仮説を立てた。

モノアミン系の中でも、ノルアドレナリンはストレス時の動態変化や予期せぬ状況での活性化が示唆されている。また、青斑核からの皮質や海馬へのノルアドレナリンの投射は注意力の調節にも深く関わっているとされる。動物モデルにおいて、海馬のノルアドレナリンシグナルの増加は神経可塑性、シナプス可塑性、記憶の想起と関連すると言われる一方、海馬のノルアドレナリン値の減少は不安、抑うつ、低活動性などの関連が示唆されている。しかし、海馬ノルアドレナリン系に対する手術侵襲が与える影響については不明である。

本研究では、糖尿病状態における周術期の行動変化と海馬のノルアドレナリンに焦点を当て、2型糖尿病モデルマウス (Type 2 diabetes mellitus; T2DM) を用いて、手術侵襲が術後の行動および海馬のノルアドレナリンに与える影響について調べた。

【方法】

84匹の6週齢の雄性C57BL/6Jマウスを4群(Non-DM群、Non-DM手術群、T2DM群、T2DM手術群)に分類した。T2DMは高脂肪食(High Fat Diet; HFD)を8週間摂食させることで作製し、体重と空腹時血糖値の推移の測定、腹腔内ブドウ糖負荷試験、HbA1c測定を行った。14週齢において、各群15匹のマウスに対して、オープンフィールド(Open field; OF)試験、新奇物体認識(Novel object recognition; NOR)試験、明暗(Light-dark; LD)試験を含む一連の行動実験を施行した。また、各群6匹のマウスに対して、高速液体クロマトグラフィーにより海馬のノルアドレナリン濃度を測定した。統計は反復測定分散分析とMann-Whitney U検定を用いて行い、P値<0.05未満を統計学的有意差ありとした。

【結果】

手術侵襲による術後の行動変化を評価するため、開腹腸管操作手術 24 時間後に、同様の一連の行動試験を Non-DM 手術群および T2DM 手術群に対して施行した。OF 試験において、T2DM 手術群では T2DM 群に比較して、総運動距離の有意な減少を認めたが ($P=0.015$)、Non-DM マウスではその変化は認めなかった。中心滞在時間は Non-DM 手術群でも T2DM 手術群でも術前に比較して有意に減少し (Non-DM 群 vs Non-DM 手術群 : $P=0.006$ 、T2DM 群 vs T2DM 手術群 : $P=0.006$)、Non-DM マウス、T2DM マウスのいずれにおいても手術侵襲が不安様行動をもたらすことが示唆された。NOR 試験の獲得試行において、T2DM 手術群は T2DM 群に比較して、総探索時間が有意に減少したが ($P=0.009$)、Non-DM マウスではその変化は認めなかった。また、LD 試験において、T2DM 手術群では T2DM 群に比較して、明暗箱の移動回数が有意に減少した ($P=0.007$)。一方、NOR 試験のテスト試行では、Non-DM 手術群、T2DM 手術群いずれにおいても識別指標に有意な差は認めず、術後の認知機能障害は示唆されなかった。

海馬のノルアドレナリン値を調べた高速液体クロマトグラフィー解析において、術前には Non-DM 群と T2DM 群で海馬のノルアドレナリンに有意な差は認めなかった。しかし、手術侵襲後である T2DM 手術群は T2DM 群に比較して、海馬ノルアドレナリンが有意に減少した ($P=0.015$)。一方、この変化は Non-DM マウスでは認めなかった。

本研究は、糖尿病状態における周術期の行動変化と海馬のノルアドレナリンに焦点を当て、2型糖尿病モデルマウスを用いて、手術侵襲が術後の行動および海馬のノルアドレナリンに与える影響について研究したものであるが、従来解明されていなかった手術侵襲による行動と海馬のノルアドレナリンへの抑制的な影響について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。