

令和元年6月28日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20394

研究課題名(和文) AMPによるミトコンドリア機能の変化とマウス心肺停止モデルへの作用の研究

研究課題名(英文) AMP effect for mitochondrial function and cardiac arrest model mice

研究代表者

近藤 豊 (Kondo, Yutaka)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90642091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AMPを投与することはカルシウムの流入などに影響することで、ミトコンドリアの機能を抑制することがわかった。またマウスにAMPを投与すると徐脈や低体温を引き起こす(人工冬眠状態)が誘発されることを確認した。心肺停止、外傷、敗血症などの重症病態においてAMPを投与することは予後改善の可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMPは生体内の代謝を抑えることで、心肺停止、外傷、敗血症などの重症病態の予後改善効果が期待できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：AMP could inhibit activation of mitochondrial function. In vivo, AMP could lead to hibernation. AMP may improve survival for cardiac arrest, trauma, and sepsis population.

研究分野：救急医学

キーワード：プリン作動性シグナル 心肺停止 蘇生 敗血症 集中治療

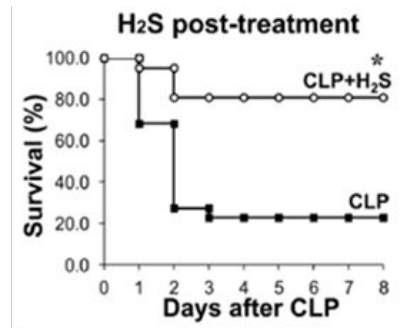
## 1. 研究開始当初の背景

心肺蘇生や除細動器の教育・普及により、心肺停止蘇生後の患者は年々増え続けている。しかしながらその一方で、心拍が再開しても意識が回復せず寝たきりとなる患者も多い。時として患者、家族、社会の大きな負担となることがあり心肺停止患者の脳神経予後をどう改善するかは大きな課題である。脳神経予後が改善出来れば社会に与えるインパクトや医療経済的なメリットは非常に大きい。また脳神経予後の改善として低体温療法が現在臨床現場でおこなわれているがその効果は限定的である。

アデノシン 1 リン酸 (AMP) は哺乳動物においては身体の代謝を抑制し、人工冬眠を引き起こす物質であることが知られている。生体内に入ると徐脈や低体温を引き起こすとされており、機序として AMP は細胞外でアデノシン三リン酸 (ATP) と競合することによりプリン作動性シグナルに抑制的に働くこと、及び ATP と拮抗してミトコンドリア機能を抑制し代謝を抑制することが推測されている。しかしながら、AMP による人工冬眠の詳細なメカニズムは未だ不明である。

## 2. 研究の目的

免疫細胞により放出されるプリン作動性シグナルの 1 つとして知られている AMP に関して色々な機序が報告されている。ATP とその加水分解産物である AMP, アデノシン二リン酸 (ADP), アデノシンはプリン作動性シグナルとそのフィードバック機構により制御されている。(Junger WG, Nature Rev Immunol, 2011) これらのメカニズムの重要な部分は、ATP 放出チャネルである Pannexin1 やエクト酵素として知られている CD39、CD73 やプリン受容体の 3 大受容体である P2X、P2Y、P1 受容体であり、これらは ATP の加水分解産物である ADP、AMP、アデノシンが作用していると考えられている。しかしながら AMP はどの受容体にも結合しない。これは AMP それ自体の細胞への直接的な作用はないが、ATP や ADP に競合し、その後アデノシンの前駆物質となるような働きで、生体内を“コントロール”する作用を持っているのではないかと考えた。人工冬眠を引き起こす薬剤として、AMP の他に硫化水素 (H<sub>2</sub>S) がすでに知られているが、敗血症モデルマウスにおいて生存率を改善することが知られている(右図、Ferito M, J Immunol 2014)



そこで、今回 AMP が動物や脳神経細胞に作用する詳細なメカニズムを解明し、AMP を使用したマウスの脳保護作用や生存率を改善する可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

マウス実験においては、野生型マウス、生後 8-12 週、生後 20-30g の雄性マウス (C57BL/6J) を用いた。吸入麻酔下にて AMP (Adenosine 5'-monophosphate monohydrate from yeast, ≥97%, Sigma) を生理食塩水に溶解させ、0.5g/kg-4g/kg24G 穿刺針を用いて腹腔内投与した。その後経皮的に心拍数、心電図、体温モニターを用いてマウスの生理学的パラメーターの変化を調べた。体温は直腸から体温プローブを挿入し、体温変化を経時的に観察した。細胞実験において脳神経細胞として神経芽細胞腫である脳神経の培養細胞 SH-SY5Y 細胞(ATCC)を使用した。SH-SY5Y 細胞は DMEM と F12 培養液を 1:1 に配合し、10%の FBS fetal bovine serum (FBS) と 100 U/ml のペニシリン、100 µg/ml のストレプトマイシンを加えた。細胞の培養は CO2 インキュベーターを用いて、5%の CO2 と 37 °C の温度下において管理した。細胞内カルシウムの評価には Fluo4-AM を用いた。Fluo4 は Fluo3 のクロロ基(Cl)をフルオロ基(F)へと置きかえた構造を持つカルシウム蛍光プローブであり、アルゴンレーザー励起による Fluo4 の蛍光強度は Fluo3 の約 2 倍の高感度であるとされる。また SH-SY5Y 細胞に対して mito-car-geco を用いたトランスフェクション実験をおこない、細胞内カルシウム流入の有無を観察・検討した。Mito-Car-Geco はプラスミド DNA と脂質試薬は複合体を形成させて、細胞核へのトランスフェクションをおこなうものである。

## 4. 研究成果

動物実験においては、野生型マウスに AMP を腹腔内投与し、人工冬眠が誘発されることを確認した。AMP 投与により脈拍が低下したことは人工冬眠が引き起こされたと考えられた。健常マウスの脈拍は通常 400 - 500 回/分であるが、0.5g/kg の AMP の腹腔内投与により、投与後に 100 - 200 回/分まで低下することがわかった。また投与後 60 分において最も脈拍が低下した。また呼吸数に関しては、健常マウスでは 125-150 回/分の呼吸数が認められたが、0.5g/kg の AMP の腹腔内投与により、50 - 70 程度まで低下した。投与後 60, 90, 120 分において脈拍が最も低下

し、60,90,120 分においては差が認められなかった。体温に関しては健常マウスにおいてはヒトよりも1度高体温であり、直腸温にて37-38の体温が観察された。0.5g/kgのAMPの腹腔内投与により、投与後に25程度まで低下することがわかった。また投与後60分において最も体温が低下した。これらの脈拍低下、呼吸数減少、低温低下の現象は腹腔内投与後の数十秒後から確認された。また0.5g/kgのAMP投与後に同量のATPを投与すると人工冬眠機能の延長が認められた。一方で少量のATPを投与した場合は逆に人工冬眠期間は短縮した。これらの結果から少量のATPはAMPと拮抗するが、大量に投与するとATPが加水分解されAMPへと変化し、人工冬眠が延長すると考えられた。

なおH30年度は動物実験施設が修理により閉鎖したため、動物実験の中断を余技なくされた。また心肺停止蘇生モデルマウスはマウスの蘇生に難渋した。最終的には心肺停止蘇生モデルマウスの構築が困難であったため、通常のマウスに人工冬眠が引き起こされることの確認までおこなった。また代わりにヒーティングパッドを用いてマウスを40-42に設定させる熱中症モデルを構築した。今後さらに研究を継続し、AMPと熱中症の関係について検討予定である。

また細胞実験においてAMPを投与することは、脳神経培養細胞においてミトコンドリアの機能を抑制することがわかった。またMito-Car-Gecoで脳神経培養細胞にトランスフェクションさせてカルシウムの細胞内への流入を調べたところ、AMP投与では濃度依存的にカルシウムの流入を抑制していた。ミトコンドリア機能の活性化にはカルシウムの流入が関与していると考えられているため、この現象はミトコンドリア機能を抑制するという仮説を間接的に裏付けるものであった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Kondo Y, Fukuda T, Uchimido R, Hifumi T, Hayashida K. Effects of advanced life support versus basic life support on the mortality rates of patients with trauma in prehospital settings: a study protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2017 Oct 22;7(10):e016912.

### 〔学会発表〕(計16件)

1. 近藤 豊、川崎喬彬、中村有紀、阿部智一、岡本 健、田中 裕、当院のAcute Care Surgeryチームの特徴と課題、第32回日本外傷学会、京都、2018年6月22日
2. 福田 龍将、近藤 豊、林田 敬、久木田 一朗、ショック非適応の院外心停止における早期エピネフリン投与の効果についての検討 第45回日本集中治療医学会、2018年2月22日
3. 近藤 豊、一二三 亨、島崎 淳也、小田 泰崇、白石 振一郎、清水 敬樹、日本と諸外国の熱中症基準の比較と重症Heat Strokeの治療戦略、第45回日本集中治療医学会学術集会、2018年2月22日
4. 近藤 豊、「環境性体温異常症における体温管理」III度熱中症の診断からより良い体温管理を目指して、第21回日本脳低温療法・体温管理学会、2018年7月7日
5. 近藤 豊、池上さや、工藤智博、中村有紀、滝沢 聡、石原唯史、平野洋平、杉中宏司、松田 繁、岡本 健、田中 裕、順天堂大学医学部附属浦安病院におけるAcute Care Surgery Team、第46回日本救急医学会総会、2018年11月20日
6. 平野洋平、近藤 豊、井上樹里、入山大希、岡本 健、田中 裕、ヒト敗血症における炎症性ICAM-1高発現好中球の重症度への影響、第46回日本救急医学会総会、2018年11月21日
7. 唐津進輔、石原唯史、村田健介、近藤 豊、松田 繁、岡本 健、田中 裕、小児熱傷の非特異性、第46回日本救急医学会総会、2018年11月21日
8. 神後宏一、近藤 豊、井上樹里、川崎喬彬、唐津進輔、中村有紀、平野洋平、滝沢 聡、松田 繁、岡本 健、田中 裕、救命救急センターに搬送された電撃症の二例、第46回日本救急医学会総会、神奈川、2018年11月20日
9. 池上さや、井上樹里、中村有紀、近藤 豊、松田 繁、岡本 健、田中 裕、殿筋群の横紋筋融解を伴ったジフェンヒドラミン中毒の一例、第46回日本救急医学会総会、神奈川、2018年11月20日
10. 川崎喬彬、田中 裕、岡本 健、松田 繁、近藤 豊、中村 有紀、浅頸動脈、上行頸動脈瘤破裂により縦隔血腫・血胸をきたし頻回のカテーテル治療を行ったvon Recklinghausen病の一例、第46回日本救急医学会総会、神奈川、2018年11月21日
11. 唐津進輔、石原唯史、村田健介、近藤 豊、松田 繁、岡本 健、田中 裕、小児熱傷の非特異性、第46回日本救急医学会総会、神奈川、2018年11月21日
12. 石原唯史、村田健介、杉中見和、近藤 豊、松田 繁、岡本 健、田中 裕、救命救急センターに併設されたこども救急センターの実績と効果、第46回日本救急医学会総会、神奈川、2018年11月20日
13. 近藤 豊、福田龍将、久木田一朗、減圧障害のバイオマーカーとしてのプロカルシトニン、第53回日本高気圧環境・潜水医学会、2018年11月30日

14. 近藤 豊 体温と熱中症診断、第46回日本集中治療医学会総会、京都、2018年3月1日
15. 近藤 豊、石原唯史、平野洋平、村田健介、中村有紀、小林 瞬、渡部雄介、山本信明、岡本 健、田中 裕、医師の立場からのPICS対策、第46回日本集中治療医学会総会、京都、2018年3月2日
16. 近藤 豊、福田龍将、内御堂 亮、柏浦正弘、加藤聡一郎、一二三亨、林田 敬 メタ解析論文を書こう！、第46回日本集中治療医学会総会、京都、2018年3月3日

〔図書〕(計4件)

1. 近藤 豊：米国で探究心を満たす 呼吸器ケア 15；1，2017
2. 吉村旬平、近藤 豊、山川一馬、血液検査・バイオマーカー、救急・集中治療医学レビュー 2018-19：135-141.
3. 近藤 豊、リアルワールドでの敗血症診断と初期抗菌薬選択 レジデントノート 2018；19(18)：2-10.
4. 近藤 豊、PICSと認知機能障害、INTENSIVIST 10(1)：83-90，2018

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。