

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11076

研究課題名(和文)敗血症時の脊髄における急性炎症変化とその臨床的意義

研究課題名(英文) Spinal acute septic inflammatory change and its clinical significance

研究代表者

田中 具治 (Tanaka, Tomoharu)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：10402893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症時に発生する脳の炎症性変化と機能障害は、臨床的に“敗血症性脳症”と呼称され、集中治療室に入室する敗血症患者の実に50-70%に発生すると報告されている。一方、中枢神経系のもうひとつの構成臓器である脊髄については、敗血症時の変化に関する報告はほとんど行われておらず、脊髄の炎症変化に関する報告のほとんどは、神経変性疾患時の慢性炎症や外傷性の脊髄損傷時に発生する炎症性変化についてのものである。敗血症の際に、脊髄にサイトカインをはじめとする炎症性メディエーターがどのように誘導されるかを分子生物学的に解析し、またこれらの炎症反応が脊髄に生じうる形態変化を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集中治療の進歩により、重症敗血症の生命予後自体は改善しつつあるが、一方で、治療後に運動機能が低下し、社会復帰できにくくなる病態(集中治療後症候群)が問題となっている。今回の研究によって、敗血症の際には、脊髄において強度の炎症性変化が起こりうること、またそれによって運動機能が障害される可能性が明らかとなった。今後敗血症治療を行う上で、脊髄は新しいターゲットとなりうると思われ、特に脊髄の炎症反応を担うグリア細胞、ミクログリアへの理解がさらに深まることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Sepsis-induced inflammatory change in the brain has been precisely investigated, but in contrast, how sepsis influence the spinal cord remain unknown. We studied the inflammatory change induced by sepsis in the mice model, and found that as soon as several hours after LPS intraperitoneal injection, inflammatory cytokines including IL-1b, IL-6 and TNF-a were drastically expressed in the spinal cord. Histological finding suggested that the resource of those cytokines are glial cells, especially microglia, nor peripheral blood cells. In addition, neuronal cells showed ischemic change concomittant with those inflammatory findings. Our finding suggest that sepsis induces significant inflammaotry reactions in the spinal cord, and those changes could be the cause of neurological dysfunctions.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脊髄 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症時には、感染病原体に対する免疫担当細胞の炎症反応を契機として、各臓器の血管内皮細胞や実質内の一部の細胞が、各種炎症性メディエーターに反応することにより、さらに炎症性物質を産生し、これらによって白血球系の細胞が組織内に浸潤し、ARDSに代表されるような種々の臓器障害が発生すると考えられている。

中枢神経系では、かつては血液脳関門の存在によって、これらの免疫反応は原則的に発生しないものと考えられてきたが、実際には、グリア細胞(とくにミクログリア)が、炎症性サイトカインを産生すること、また炎症が高度となった場合には、血液脳関門の透過性が亢進し、血中の免疫担当細胞や炎症性物質が中枢神経内に流入することが明らかとなってきた。このような全身性の炎症反応に伴って発生する脳の炎症性変化と機能障害は、臨床的に“敗血症性脳症”と称され、集中治療室に入室する敗血症患者の実に50-70%に発生すると報告されている。実際、敗血症を発症した患者の多くに意識状態の変化を伴うことは、日常臨床上しばしば経験することである。

一方、中枢神経系のもうひとつの構成臓器である脊髄については、敗血症時の変化に関する報告はほとんど行われておらず、脊髄の炎症変化に関する報告のほとんどは、神経変性疾患時の慢性炎症や外傷性の脊髄損傷時に発生する炎症性変化についてのものである。

申請者らは、敗血症時の脳における炎症性サイトカイン誘導に麻酔薬が及ぼす影響について報告してきた(Tanaka T et al. PLoS One. 2013)が、その際に、敗血症モデルマウスを用いた実験で、**脳よりも脊髄においてIL-1、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインがより早く、より高度に誘導されることをみいだした。**また形態的にも、敗血症誘導24時間後には、**脊髄(とくに下部胸髄)の著明な浮腫と神経細胞の阻血性変化を認めた。**これら予備実験の結果から、敗血症の際には、脊髄でも、脳と同様の炎症性サイトカインの誘導とこれに伴う形態変化が発生することが示唆された。

敗血症時の脊髄の変化については、これまであまり注目されず、これに関連づけられる病態も特に報告されていないと考えられるが、臨床的には、敗血症患者において、とくに急性期を過ぎたあとになってから、四肢の筋力の低下・麻痺を合併することをしばしば経験する。これらは敗血症に伴う末梢神経障害(critical illness neuropathy)や筋障害(critical illness myopathy)といった病態であると考えられており、脊髄における炎症性変化と関連づけた報告はほとんど認められない。

申請者らは、これまでの予備実験の結果から、敗血症の際の脊髄の炎症性変化によって、脊髄の機能になんらかの影響をきたす蓋然性は高いと考え、これらの病態について明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、敗血症時に脊髄に発生する炎症性変化を検討し、またこれらの変化により脊髄機能にどのような影響を生じうるかについて明らかにすることを目的とした。また薬剤による介入によってこれら病態を改善させることができるかについても検討目的とした。

A: 敗血症モデルマウスを使用して、脊髄にIL-1、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインがどのように誘導されるかを転写レベル、翻訳レベルにおいて分子生物学的に検討し、これらを血液中の炎症性サイトカインの誘導の時間経過と比較する。また脊髄中のNF- κ BやAP-1といった炎症反応を誘導する転写因子の活性についても検討する。

B: 脊髄に誘導される炎症の機序について、とくにミクログリアの活性化に注目して免疫組織学的に評価する。また血液由来の免疫担当細胞の浸潤の程度についても検討する。

A、Bの結果を併せて、脊髄の炎症発生機構(血液中のサイトカイン上昇により二次的に脊髄の炎症性サイトカインが誘導されるのか、もしくは脊髄においてミクログリアにより直接的に誘導されるのか)について考察する。

C: 炎症によって生じる脊髄の形態変化について組織学的に(とくに神経細胞の変化に注目して)評価する。これは、脳において炎症性サイトカイン(とくにIL-1)が誘導された場合、有意に神経細胞障害が増加することが報告されていることから、脊髄でも同様の現象が発生しているのではないかと考えられるためである。実際に申請者の予備実験でも敗血症マウスの脊髄に神経細胞の阻血性変化を認めている。

D: マウス行動解析によって、敗血症誘導後のマウスの運動機能について評価し、また薬剤(ミ

クログリアの活性化を抑制するミノサイクリンなど)の投与によって、脊髄の炎症を軽減できるかどうか、また運動機能に変化があるかどうか検討する。これは、申請者の予備実験の結果では、脊髄の急性炎症時には血球細胞の浸潤像は認められなかったことから、少なくとも初期の反応は中枢神経系内の細胞(とくにミクログリア)の活性化が主体であると予想されるためである。

敗血症時の脊髄の変化については、過去にほとんど報告がなされていないため、この点について詳細に検討すること自体が強い独創性を有すると考えている。実験方法や検討する対象となる物質自体は新奇なものではないが、そのために新たな実験系を構築する必要はなく、むしろ臨床系の研究室にとって適当であると考えている。

敗血症自体は、集中治療室に入室する病態のなかで、もっとも多い疾患の一つであり、Sepsis surviving campaign guideline など臨床的に多くの対策が講じられているが、依然として高い死亡率を示している。また敗血症後の神経筋疾患に関しても、しばしば遭遇する病態であるにもかかわらず、有効な治療法は確立していない。本研究により敗血症時の脊髄の急性炎症性の病態を明らかにし、ミノサイクリンなどの新たな治療方法を提案できれば、集中治療における意義は非常に大きいと期待される。

3. 研究の方法

脊髄の炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-)誘導を分子生物学的に検討する。

敗血症モデルマウスを作製し、脊髄における炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-) mRNAの誘導変化を半定量的リアルタイムPCR法によって検討する。蛋白レベルの誘導変化もイムノブロット法、ELISA法を使用して検討する。また、血液中の炎症性サイトカインの変化をELISA法で確認し、脊髄および血中のこれらサイトカインの経時的な変化を比較検討する。

脊髄の炎症による変化を病理学的・免疫組織学的に検討する。

敗血症モデルマウスの脊髄の形態的变化を観察する。頸髄から腰髄にかけて、敗血症によってどのような形態変化があり、時間経過とともにどのように変化していくのか、また脊髄内への白血球系細胞の浸潤の有無や、神経細胞の阻血性変化に注目して詳細に検討する。また、ミクログリア(IBA-1など)やアストロサイトの活性化(GFAPなど)の程度や、炎症性サイトカインの産生源(共染色による)などについて免疫組織染色を用いて検討する。

敗血症後のマウス運動機能の行動学的手法により評価する。

LPSの投与量や盲腸結紮を行う場合の長さなどを検討し、脊髄に十分な炎症性変化があり、かつマウスがある程度長期に生存するような敗血症モデルの条件を決定する。これらモデルマウスについて、行動学実験を行う。具体的にはWire hangテストやGrip strengthテストを行い、マウスの四肢筋力を評価する。またGait analysisによって歩行、協調運動も同様に評価する。

ミノサイクリン投与により、上記①～③にどのような変化を生じるか検討する。

ミノサイクリンはテトラサイクリン系の抗生物質であるが、ミクログリアの活性化抑制作用を有することで知られている。敗血症モデルマウスにおいて、敗血症誘導前もしくは誘導後にミノサイクリンを投与し、脊髄内のミクログリアの活性化の変化を免疫組織染色によって評価し、さらに脊髄における炎症性サイトカインの誘導、ひいては炎症後の脊髄の形態変化について、コントロール群との間で比較検討する。また、施行した機能評価を行い、ミノサイクリン投与によって、運動機能や脊髄の神経伝達速度に変化を認めるかどうかを確認する。

4. 研究成果

敗血症性モデルを用いた検討によって以下の知見を得た。

LPS 腹腔内投与マウス

LPSを非致死量腹腔内に投与したところ、2時間後より脊髄内に炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-) mRNAの急激な増加を認めた。この増加は数時間以内にピークに達したのち24時間で収束した。

CLP 盲腸結紮モデル

と同様に数時間以内に脊髄内に炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、TNF-) mRNAの急激な増加を認めた。

CLPマウスは致死率が高かったため、その後の検討にはもっぱら を使用することとした。

LPS 腹腔内モデルマウスにおいて、脊髄の免疫組織染色をおこなった。まず通常の HE 染色において、脊髄内には炎症性細胞の外部からの浸潤像は認めなかった。一方で、脊髄全体に著明な浮腫と神経細胞には虚血性変化が認められ、神経炎症とそれに伴う変化と考えられた。続いて免疫染色にて、IBA-1 染色 (ミクログリア特異的) にて陽性細胞の著増と GFAP (アストロサイト特異的) の微増を認めた。NeuN (神経細胞特異的) は著減していたが、免疫プロットでは発現量は変化していなかった。以上から LPS 刺激によって脊髄内のミクログリアが刺激され、炎症性サイトカインを産生したことが強く示唆された。同時に神経細胞に虚血性の変化が認められたことは、ミクログリアを主体とする神経炎症によって、脊髄の機能に何らかの影響を生じることが示唆された。

続いてミクログリアを抑制する作用があると報告されているミノサイクリンを全身投与した。炎症性サイトカインの誘導は抑制したものの、ミクログリアの活性化の程度は組織所見では変化がなく、同薬の全身投与では、特異的に脊髄内ミクログリア活性を抑制することは難しいと考えられた。

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 1 件)

今回の研究結果とは直接関連しないが、副次的に得られた結果で以下の様な論文を発表した。

Hirotsu A, Iwata Y, Tatsumi K, Miyai Y, Matsuyama T, Tanaka T.

Maternal exposure to volatile anesthetics induces IL-6 in fetal brains and affects neuronal development.

European Journal of Pharmacology 2019 Nov 15;863:172682

[学会発表](計 2 件)

A. Hirotsu, T. Tanaka

Septic Myelopathy: The Role of Microglia

American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2019, October, Orlando, United States of America

廣津聡子、田中具治

敗血症における脊髄の急性炎症性変化について

日本麻酔科学会第 65 回学術集会 5 月 17~19 日 パシフィコ横浜

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 A. Hirotsu, T. Tanaka
2. 発表標題 Septic Myelopathy: The Role of Microglia
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣津聡子、田中具治
2. 発表標題 敗血症における脊髄の急性炎症性変化について
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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