

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11098

研究課題名(和文)メラトニンシグナルを標的とした新たな敗血症関連脳症治療法の確立

研究課題名(英文) Melatonin signaling pathway as a novel target for the treatment for sepsis-associated encephalopathy

研究代表者

新山 修平(Niiyama, Shuhei)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・准教授

研究者番号：40258455

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)：我々はCLPモデルを用いて抗炎症や抗酸化作用を有するとされるメラトニンを投与すると、生存率が統計学的に有意に改善した。そこでメラトニン合成の上流に位置し、実際我々の研究室で敗血症との関連を研究しているテトラヒドロビオプテリン(BH4)とのクロストークに着目した。メラトニン投与群とメラトニン非投与群の血中BH4濃度を比較したところ、CLP後24時間でメラトニン群(約1500 nmol/L)がメラトニン非投与群(約1000 nmol/L)に比べて明らかに高値傾向にあり、それらの強い関連性が示唆された。現在、敗血症におけるメラトニンの細胞保護効果をBH4とのクロストークに着目し解析継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は重症化すると病態のコントロールに苦慮し、世界的には死亡率も非常に高く、特に脳症の合併は死亡率を高める。しかしながらそれらの病態は不明な点が多く治療法が確立されているとは言い難い。創薬ターゲット分子として、キヌレニンやメラトニンがCLPモデルの生存率を改善することを既に見出し、脳内炎症とキヌレニン経路ならびにセロトニン経路が敗血症関連脳症と密接に関連することを示唆する結果を得ている。またメラトニン合成の上流に位置し、実際我々の研究室で敗血症との関連を研究しているテトラヒドロビオプテリン(BH4)とのクロストークに着目し、今回その関連性を示唆する結果を得、治療法確立の糸口を見出した。

研究成果の概要(英文)：We used the CLP model and demonstrated that melatonin, which has anti-inflammatory and antioxidant effects, significantly prolonged the overall survival of mice. In order to elucidate the mechanism of action underlying the effect of melatonin, we examined the potential interaction of melatonin with tetrahydrobiopterin (BH4). BH4 is located upstream in the melatonin synthesis pathway, and we previously studied its role in sepsis. We examined the plasma concentration of BH4 in CLP mice with and without the administration of melatonin and demonstrated that the administration of melatonin significantly increased the concentration of BH4 24 hours after the CLP procedure compared with the control (approximately 1,500 vs. 1,000 nmol/L, respectively). Our findings suggest a strong association between BH4 and melatonin. We are currently performing additional analyses to determine whether the interaction between melatonin and BH4 is involved in the cytoprotective effect of melatonin in sepsis.

研究分野：敗血症

キーワード：敗血症 敗血症関連脳症 メラトニン トリプトファン キヌレニン経路 セロトニン経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、従来の敗血症研究のモデル動物の欠点(腹腔内膿瘍形成)を克服した改良型マウス盲腸結紮穿孔(CLP)モデル(Niiyama et al. Clin Transl Immunology 2016)の作製に成功し、そのモデルを用いて敗血症の治療効果を示す化合物を探索してきた。この一連の研究の中で、強い抗酸化、抗炎症や抗アポトーシス作用を有するとされるメラトニンがCLP処置後の生存率を改善することを見出し、その作用機序を探索している。

2. 研究の目的

敗血症は重症化すると病態のコントロールに苦慮し死亡率も高い。そのため、病態の機序解明および治療法の開発が急務である。特に敗血症関連脳症(せん妄)を合併すると死亡率が高くなる。申請者らは従来の敗血症モデルの欠点(腹腔内膿瘍形成)を克服した「改良型新規マウス盲腸結紮穿孔モデル:以下改良型CLPモデル」の作製に初めて成功した。このモデルにメラトニンを投与すると、有意に生存率が改善した。また最近、大規模試験においてメラトニン受容体作動薬がせん妄に対して有用であると報告されたが、作用メカニズムについては不明な点が多い。本研究では改良型CLPモデルを用いて、メラトニンおよび受容体作動薬の作用メカニズムを解明し、敗血症関連脳症の新規治療法を開発するための研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 使用動物の性質: 今回 C57BL/6 マウス (12 週齢) を使用した

吸入麻酔(イソフルラン)下にマウスCLPモデル作製: 下腹部に約1~2cmの皮膚切開を加え、続いて腹膜も切開。その後、回盲部を結紮し、盲腸部を21G針で貫通穿刺する。

生存率: 生存率はカプラン・マイヤー法を用いて計算し、二つの曲線はlog-rank検定を行った。

CLPモデル作製後の炎症性変化(主にサイトカイン)を測定する目的で、腹腔滲出細胞で各種サイトカインを測定した。

- (1) 4% Brewer Modified Thioglycollate Medium (4%チオグリコレート培地)をマウスあたり2 mL 腹腔内投与する
- (2) 3日間マウスを飼育する
- (3) マウスの頸動脈を切り脱血死させる(血液をしっかり抜く)
- (4) 腹部外皮に切り目を入れ、外皮をはいで腹膜を露出させる
- (5) 冷やしたPBS 5 mLを腹部に注入する
- (6) 3分ほど腹部をマッサージして細胞を浮遊させる
- (7) 脂肪塊をさけて注入したPBSをなるべく多く回収する
- (8) 遠心チューブ(氷冷)に入れ、遠心(1000 X g、10分、4℃)する
- (9) 上清を吸引して、沈殿(マクロファージ)を培養する

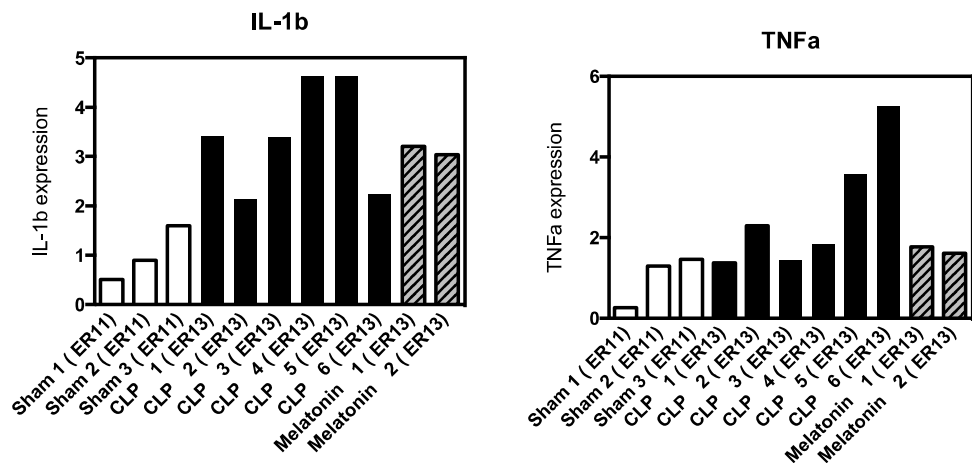
4. 研究成果

申請者らは敗血症関連脳症の発症機序の解明ならびに治療薬のターゲット分子としてメラトニンに着目した。メラトニンは必須アミノ酸であるトリプトファンからセロトニン経路を経て合成され、強い抗酸化ストレス、抗炎症、抗アポトーシス作用等を有する。トリプトファンはキヌレニン経路にも分かれ、それらはサイトカイン誘発の際にも密接に関与している。

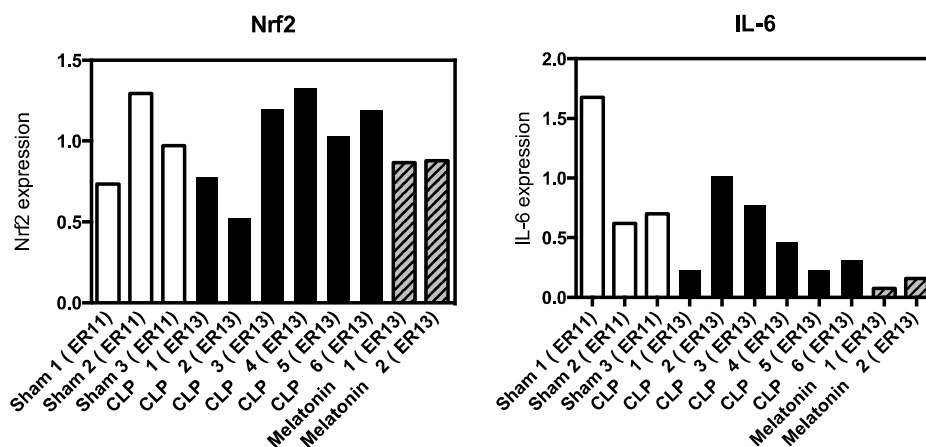
改良型CLPモデルにてメラトニン投与群とsham群(開腹手技のみ)を比較したところ1週間後の生存率においてメラトニン群が有意に高かった(p<0.05)。

敗血症後の炎症性変化を観察するためにCLP処置マウスから腹腔内マクロファージを分取し、サイトカインと酸化ストレス応答の遺伝子をReal-time PCR法で測定したところ、サイトカインでは

IL-1、TNF- α の遺伝子発現(図参照)上昇を認めた。酸化ストレス応答に関わる遺伝子では、Nrf-2(NF-E2-related factor 2)遺伝子(図参照)の発現低下を認めた。CLP処置後のIL-1、TNF- α 遺伝子発現に対するメラトニンの効果を検討したところ、メラトニン投与群ではCLP

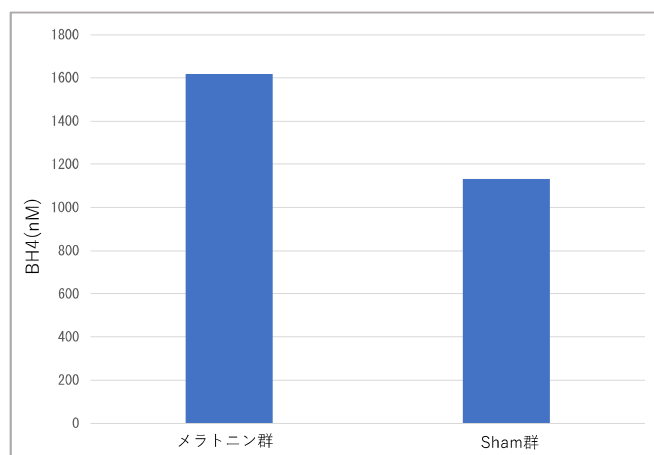
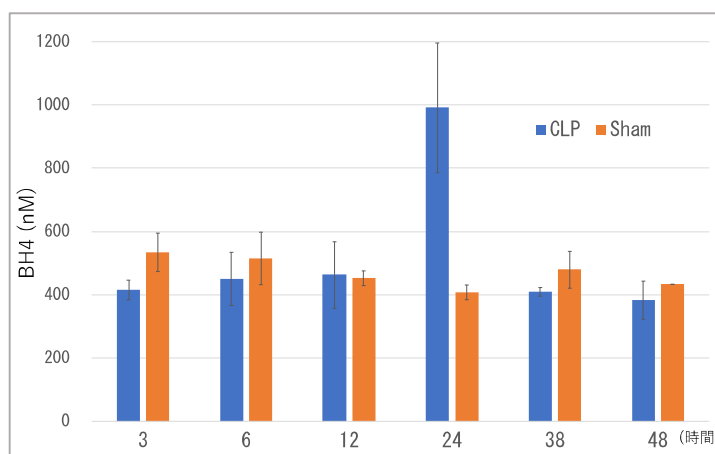


後の腹腔内マクロファージでの IL-1、TNF- α 遺伝子発現を CLP 単独群に比べ変化させないことがわかった。Nrf-2 遺伝子発現に対するメラトニンの効果については大きな変化は認められなかった。IL-6 遺伝子発現 (図参照) に関しては、CLP 単独群でシャム群に比べ低値であり、さらにメラトニン投与群ではシャム群や CLP 単独群に比べさらに低値である傾向にあった。



敗血症時のメラトニンの細胞保護作用機序を探索する一方、当研究室では敗血症時の病態解明のターゲット分子としてテトラヒドロビオプテリン (BH4) にも着目している。BH4 はメラトニン合成の上流に位置し、生体内における役割は補因子としての還元作用で、BH4 を必須の補因子とする酵素としては、カテコールアミンやセロトニン合成の律速段階を触媒するチロシン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素、そしてフェニルアラニンの代謝に働くフェニルアラニン水酸化酵素など、芳香族アミノ酸モノオキシゲナーゼがある。さらに、BH4 は一酸化窒素合成酵素 (NOS) のコファクターであり、NOS 活性の発現に必須の因子である。

そこでマウス CLP モデルを用いた血中 BH4 濃度の経時的推移をシャム群と比較したところ、CLP 作製後 24 時間値で統計学的に有意に高かった ($p < 0.05$)。次にメラトニンと BH4 の関連に CLP モデルでメラトニン (30 mg/kg) 群とシャム群で血中 BH4 濃度を比較したところ、CLP 後 24 時間でメラトニン群 (約 1500 nmol/L) がシャム群 (約 1000 nmol/L) に比べて明らかに高値傾向にあった。現在、敗血症におけるメラトニンの細胞保護効果を BH4 とのクロストークに着目し鋭意解析中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	外角 直樹 (Sotogaku Naoki) (60368884)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	
研究分担者	首藤 隆秀 (Shuto Takahide) (70412541)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	
研究分担者	高須 修 (Takasu Osamu) (90236216)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	