

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03753

研究課題名（和文）敗血症モデルへの層別化メタボローム解析に基づくPICSメカニズム解明と治療法探索

研究課題名（英文）The trial to elucidate the mechanism underlying PICS after sepsis with stratified metabolome analysis.

研究代表者

後藤 隆久（GOTO, Takahisa）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：00256075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では敗血症モデル動物を用いて、集中治療後症候群（PICS）の解析を行った。最初に、中枢神経系の障害に注目して研究を行ったが、若年健常動物を対象として、簡易的な蘇生・治療を行った敗血症モデルでは、過去の研究とは異なり明確な長期残存する認知機能障害は認められず、モデルの再検討が必要であると考えられた。

次に身体機能障害に注目した研究を行ったところ、若年健常動物を同様に用いた場合でも、急性期の急激な筋肉の異化代謝、長期にわたる筋力低下を認めた。また、クレアチニン産生量が急性期筋肉の状態を示す新規マーカーとして有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症などの重症患者では、急性期を乗り越え生存できたとしても、その後、集中治療後症候群（PICS）と呼ばれる認知機能の低下、身体機能の低下などに悩まされることが多く見られる。本研究は、PICSの中でも特に認知機能障害の研究のためには、より臨床的な動物モデル構築が必要であることを明らかにした。一方、身体機能に注目した研究によって、筋肉の状態を示すマーカーとしてクレアチニン産生量が有用である可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we evaluated post intensive care syndrome (PICS) using several animal models of sepsis.

First, we focused on the central nervous system disorders after sepsis. However, the apparent long-lasting cognitive dysfunction was not observed after sepsis in young adult animals with non-intensive resuscitation. These results suggest that the development of more clinically relevant animal model is necessary.

Next, we evaluated the muscle dysfunction after sepsis. Acute muscle catabolism and long-lasting muscle weakness were observed after sepsis in young adult animals. Moreover, we found that creatinine production rate can be a novel integrative marker for muscle status.

研究分野：麻酔科学・集中治療医学

キーワード：集中治療後症候群 敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

重症敗血症や ARDS などの重症病態患者の多くは、急性期に脳循環や脳代謝の障害、神経炎症などの理由によりせん妄をはじめとする中枢神経障害を合併する。一方で、近年集中治療室でケアを受けた患者が急性期のみならず、中・長期的経過において、様々な精神障害、認知機能障害および運動機能障害を引き起こすことが知られるようになり、集中治療後症候群 (PICS) という概念が提唱された。PICS は重症病態患者が例え救命されたとしても、長期に渡る後遺障害を引き起こし、社会的生活の質を大きく損なわせるため、深刻な問題であり、治療方法の確立が急務である。

PICS における精神障害および認知機能障害 (以降、高次脳 PICS) の背景メカニズムの探索は今までに敗血症から回復した慢性期の動物モデルを用いて研究が行われてきた。しかしながら、敗血症では急性期にすでに細胞死による不可逆的な神経細胞脱落が生じることが知られており、慢性期の動物モデルから得られた治療標的が有効である可能性は低いと考えられる。従って、申請者は神経細胞死が生じるよりも前の、超急性期を治療臨界期と捉え、その時期における分子メカニズムの解明を行う必要があると考えている。

敗血症においては様々な臓器が臓器低灌流、低酸素、炎症といったストレスにさらされ、代謝障害を来すことで、臓器不全が生じると考えられている。さらに、中枢神経系においては血流減少及びグルコース取り込み低下や電気的活動の低下が、その後の神経細胞脱落と関係していることが示唆されている。従って、超急性期の脳における代謝障害は急性期の神経障害のみならず、慢性期の高次脳 PICS の原因となっている可能性がある。しかしながら、PICS の背景にある代謝経路ネットワーク障害の全貌は今までに明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では敗血症モデル動物を用いて、行動実験を軸に PICS モデルを確立した上で、その背景にある代謝障害メカニズムを明らかにすることが目的である。

最初にラットを用いた敗血症モデルにおいて一定の回復が達成された 2-4 週後の認知機能障害について評価を行い、その背景にある中枢神経代謝の変化を明らかにしたいと考えた。

また、PICS では中枢神経のみならず身体機能障害が生じることから、運動機能・筋肉機能について解析し、その背景にある筋肉の代謝変化について明らかにしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 盲腸内容物懸濁液 (Cecal Slurry:C/S) 腹腔内投与モデルにおける PICS の解析

#### ①C/S 腹腔内投与敗血症モデルにおける認知機能評価

最初に C/S 腹腔内投与モデルにおける発症 14 日後または 28 日後に認知機能の評価を行った。6~10 匹のラットから盲腸内容物を採取して混合し、15%グリセロール/PBS に懸濁して盲腸内溶液懸濁液 (C/S) を作成し、これを-80°Cで冷凍保存した。これを解凍してラットの腹腔内に投与することにより、均一性と再現性の高い敗血症動物モデルを作成した。

9~10 週齢の SD ラットに対して C/S 腹腔内投与を行い、2~4 週間後に気分障害を測るオープンフィールドテストや、記憶力を測るオブジェクトレコグニションテストおよびソーシャルレコグニションテストを実施し、PBS を投与された Control 群と比較した。

#### ②C/S 腹腔内投与敗血症モデルにおけるサブフェノタイプ解析

上記①の結果を踏まえ、同じ侵襲を加えた動物モデルにおいても隠れたサブフェノタイプが存在するのではないかと仮説を立てた。C/S 腹腔内投与モデルにおける初期の臓器障害マーカーに基づいたフェノタイプ解析を行ない、サブフェノタイプごとにおいて行動実験の結果を解析するというアプローチで解析した。

C/S 腹腔内投与モデル作成から 6 時間後にラットから採血を行い、その時の血漿中の臓器障害マーカー (クレアチニン (腎臓)、Alanine Transaminase:ALT (肝臓)、ビリルビン (肝臓)、Soluble receptor of advanced glycation end-products:sRAGE (肺)、心拍数 (循環)) を測定した。それらの臓器障害マーカーを用いてクラスター解析を行い、サブフェノタイプを同定した。

### (2) 盲腸結紮穿刺 (Cecal Ligation and Puncture:CLP) モデルにおける PICS の解析

#### ①CLP 敗血症モデルにおける認知機能評価

CLP 敗血症モデルを用いて、発症 14 日後、28 日後に受動的回避行動テストを行い、開腹のみを行なった sham operation 群と比較した。行動テストが終了した動物は安楽死させ、脳および血液を採取し、タンパクを抽出してサイトカインの発現量を比較した。

#### ②CLP 敗血症モデルの慢性期における FDG-PET の解析

次に、敗血症モデル動物において、慢性期の脳内の代謝変化を探索するため、中枢神経細胞の糖代謝の変化を記述した。①と同様に C/S 腹腔内投与モデルを作成し、2 週間または 4 週間後に FDG-PET を撮影し、脳内の糖取り込みの違いを評価した。

### (3) 敗血症モデルにおける運動・筋肉機能評価

ここでは敗血症モデル・全身炎症モデルを用いて、中枢神経以外の PICS として運動、筋肉機能の評価を行った。

最初に CLP 敗血症モデルマウスを用いて、運動機能の変化及びマイオカイン mRNA 発現に与える影響について解析を行った。9-12 週齢の C57BL/6J マウスに対して全身麻酔下に盲腸先端 1cm を結紮し、21G 針で横方向に 2 つの穴をあけることで CLP モデルを作成した。コントロールとしては無処置群と sham 群を作成した。モデル作成前、2、3、7、10、15 日目にワイヤーハンダテスト、オープンフィールドテスト、ロータロッドテストを施行し、それぞれ筋力、活動性、協調運動の評価を行った。また 2、16 日目に一部のマウスを安楽死させた上で、筋肉断面積を評価した。

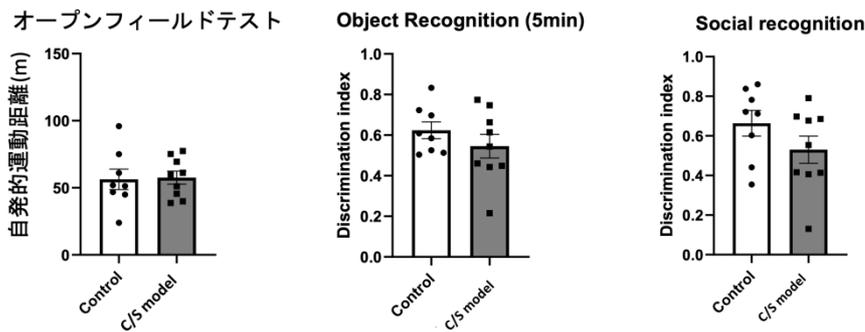
次に、LPS 誘導性全身炎症モデルを用いて、筋肉におけるクレアチン/クレアチニン代謝を中心に、筋肉の代謝変化について評価を行った。イソフルラン麻酔下にマウス腹腔内に高用量 LPS (125  $\mu$ g/body)、低用量 LPS (25  $\mu$ g/body) 及びコントロール (Vehicle のみ) を投与して全身炎症モデルを作成した。最初に LPS 投与直前に両側腎摘出を施行し、血中濃度の変化からクレアチニン産生量を測定した。次に、これらのモデルにおける筋力及び筋断面積測定を行なうとともに、筋肉、血液のメタボローム解析を行い、どのような変化が見られるか解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 盲腸内容物懸濁液 (Cecal Slurry:C/S) 腹腔内投与モデルにおける PICS の解析

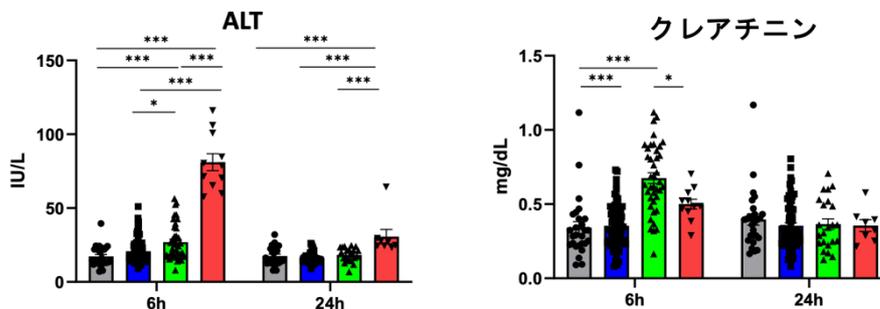
#### ① C/S 腹腔内投与敗血症モデルにおける認知機能評価

オープンフィールドテストでは自発的な運動性に差はなく、運動性の低下によるバイアスはないことが示唆された。しかし、オブジェクトレコグニションテストおよびソーシャルレコグニションテストでは新規のオブジェクトまたは新規のラットに対する識別 (Discrimination index) に有意な低下はなく、記憶力の低下は認められなかった。



#### ② C/S 腹腔内投与敗血症モデルにおけるサブフェノタイプ

臓器障害マーカーを用いたクラスター解析の結果、臓器障害の弱いサブフェノタイプ、肝障害が優位なサブフェノタイプ、腎障害が優位なサブフェノタイプの 3 つのサブフェノタイプが同定された。潜在クラス分析を用いた解析においても、同様の 3 つのサブフェノタイプが存在することが確認された。これらのサブフェノタイプ間で行動実験の結果を比較したが、明らかな差はなかった。



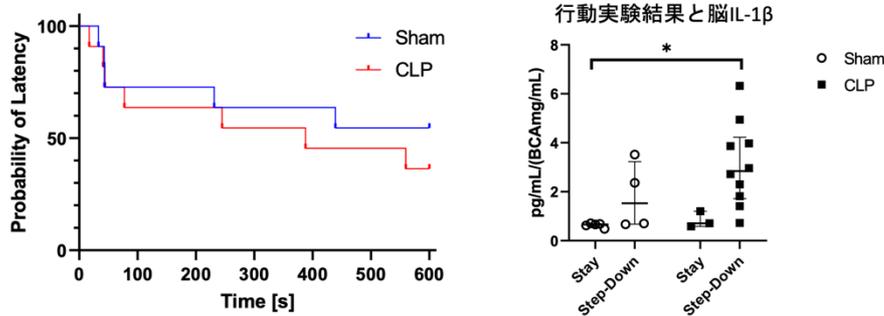
考察：

以上から、若年健常ラットに対する C/S 腹腔内投与による敗血症では、生存した動物において長期にわたる明らかな認知機能障害は認められなかった。さらに、急性期臓器障害マーカーで層別化した場合にも明らかな認知機能障害の違いは認められなかったことから、この敗血症動物モデルにおいて中枢神経系の PICS を評価することは困難であることが示唆された。

(2) 盲腸結紮穿孔刺 (Cecal Ligation and Puncture:CLP) モデルにおける PICS の解析

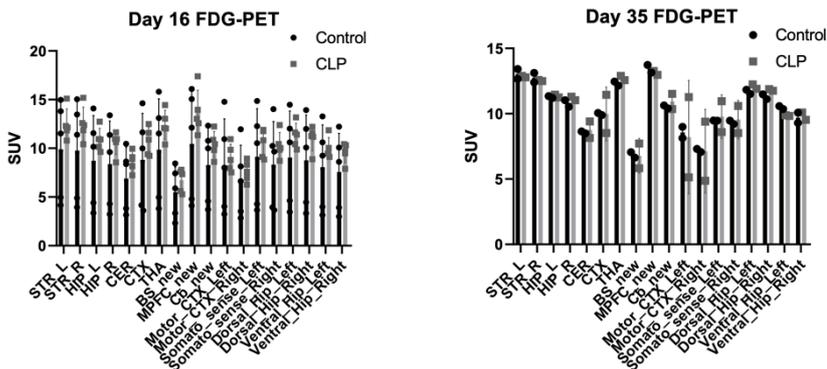
①CLP 敗血症モデルにおける認知機能評価

CLP 敗血症モデル作成から 14 日後または 28 日後に受動的回避行動テストを行った結果、CLP 群と Sham 群で明らかな差はなかった。しかし、受動的回避行動テストで暗所への侵入を認めた個体、すなわち記憶力の低下を認めた個体では、脳内の IL-1 $\beta$  濃度が高いことが示された。これは脳内の炎症の遷延が記憶力の低下を起こすという過去の報告と一致していた。また、Sham 群においても同様の傾向が認められ、Sham によって引き起こされる軽度の炎症も行動実験の結果に影響していることが示唆された。



②CLP 敗血症モデルの慢性期における FDG-PET の解析

①と同様の CLP モデルにおいて、14 日後または 28 日後に受動的回避行動テストを行い、それぞれ CLP モデル作成から 16 日後または 35 日後に FDG-PET を用いて脳の糖代謝を検討した。受動的回避行動テストでは、CLP 群と Sham 群で統計学的な有意差はなかった。FDG-PET の結果を脳の部位別に検討したが、全ての部位において糖の取り込みに明らかな差は認められなかった。これは行動実験にも差がないことと一致していた。



考察：

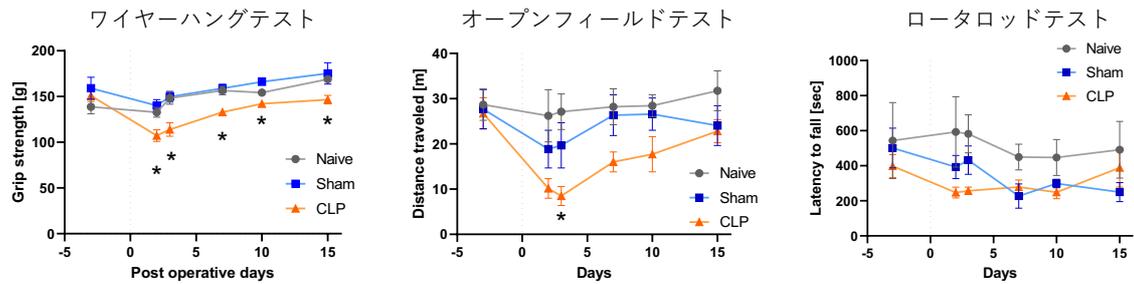
若年健常ラットを用いた CLP 敗血症モデルでも、過去の報告とは異なり、長期的な認知機能障害は認められなかった。また、明らかな脳の糖代謝障害も認めなかった。これらの結果から、若年健常ラットを用いて、皮下注射による輸液蘇生+抗菌薬投与によって治療された敗血症モデルでは中枢神経系の PICS を十分に再現できないことが示唆された。従って、老年ラットを用いる、あるいはよりインテンシブな蘇生を行うことによって、重症例の救命率を向上させた上でフォローアップを行うなどの手法を取る必要があると考えられた。

一方で、sham 群も含めた解析では、認知機能障害を認めたグループで IL-1 $\beta$  の増加を認めたことから、中枢神経系における炎症反応は手術後、敗血症後の認知機能障害と関連している可能性が示唆された。

(3) 敗血症モデルにおける運動・筋肉機能評価

①CLP 敗血症モデルにおける運動機能、筋肉機能評価

CLP 敗血症モデルマウスでは敗血症急性期にワイヤーハングテストで評価した前肢筋力の低下、オープンフィールドテストで評価した活動性の低下を認めた。徐々に改善を認めたものの、前肢筋力の低下は 15 日後まで残存していた。ロータロッドテストでは無処置群と比較して低下傾向を認めたが、統計学的有意差は認めなかった。



一方で、前脛骨筋の筋断面積は2日目においてCLP、shamグループで低下傾向を認めたが、統計学的な有意差は認めなかった。また16日目では、ほぼ差が見られなかった。以上から、筋力低下の原因は筋萎縮だけでは説明できず、筋肉、もしくは神経系の機能障害に起因すると考えられた。

## ②LPS誘導性全身炎症モデルにおける筋肉の代謝変化の解析

LPS誘導性全身炎症モデルにおいても急性期に筋力低下を認めたが、明らかな筋肉量の減少は認めなかった。両側腎摘出モデルを用いた解析の結果、クレアチニン産生量が低下していた。一方で、メタボローム解析の結果、クレアチニンの前駆体、クレアチンの筋肉中濃度には変化が見られなかったことから、前駆体の現象ではなく、クレアチンからクレアチニンへの変換速度が低下している可能性が示唆された。同時に、筋肉のメタボローム解析の結果、多数のアミノ酸の増加、ケトン体の増加が認められ、異化亢進とエネルギー代謝の障害が生じていることが示唆された。

### 考察：

上記の結果から、敗血症を含む全身炎症の病態においては、筋肉の異化亢進、エネルギー代謝障害を伴う筋肉機能障害が生じており、クレアチニン産生量は筋肉量にとどまらない統合的なマーカーとして、有用である可能性が示唆された。

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 0件）

1. 発表者名 山本 夏啓, 東條 健太郎, 水原 敬洋, 後藤 隆久
2. 発表標題 ICU 急性期の筋肉量減少と長期生存の関係 クレアチニン産生量を用いた解析
3. 学会等名 第50回日本集中治療医学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下 真, 山本 夏啓, 新倉 怜, 東條 健太郎
2. 発表標題 敗血症が筋力, 及びマイオカイン遺伝子発現に与える経時的影響の解析: モデルマウスを用いた検討
3. 学会等名 第50回日本集中治療医学会総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	宮崎 智之 (MIYAZAKI Tomoyuki) (30580724)	横浜市立大学・医学部・准教授  (22701)	
研究分担者	杉浦 悠毅 (SUGIURA Yuki) (30590202)	京都大学・医学研究科・特定准教授  (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	新倉 怜 (NIIKURA Ryo)  (70760750)	横浜市立大学・医学研究科・特任助教  (22701)	
研究分担者	高瀬 堅吉 (TAKASE Kenkichi)  (80381474)	自治医科大学・医学部・教授  (32202)	
研究分担者	東條 健太郎 (TOJO Kentaro)  (80737552)	横浜市立大学・医学部・講師  (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関