

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09436

研究課題名(和文) 一酸化炭素中毒後遅発性脳症に対する神経栄養因子の投与による治療効果の検討

研究課題名(英文) The effects of neurotrophic factor for carbon monoxide poisoning-induced delayed encephalopathy

研究代表者

西原 佑 (Nishihara, Tasuku)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50568912

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)：一酸化炭素(CO)中毒ではマイクログリア(MG)の樹状突起がちぎれ数が減少し、さらにMGにおける各種神経栄養因子のmRNA発現が有意に減少する。このことはCO中毒後に発症する遅発性脳症の原因となることが考えられるが、IGF-2を補充することで予防することが出来るかを検討することを目的とし、実験を行った。IGF-2を補充することでMGの生存には関与しないが、ミエリン成分は有意に保持され、さらに、CO中毒後の行動異常も改善された。この効果は神経細胞表面に発現するIGF-1受容体を介したものと考えられ、IGF-2の投与はCO中毒後の遅発性脳症に対して、一定の効果があるものと推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで一酸化炭素中毒およびその後遺症ともいえる遅発性脳症に対して、明らかに有効といえる治療方法はなかった。しかしながら、本研究により、IGF-2という神経栄養因子の補充が、中毒後に介入可能な治療方法として可能性が認められたことは、大きな進歩といえる。

研究成果の概要(英文)：In carbon monoxide (CO) poisoning, decreased in microglial cell numbers are observed and microglia (MG) with detached branches are observed. Furthermore, mRNAs encoding several neurotrophic factors expressed by MG were decreased. These findings may cause delayed encephalopathy (DE). We aimed that supplementation of Insulin-like growth factor-2(IGF-2) may prevent DE. As the results, supplementation of IGF-2 prevented demyelination but was not associated with survival of MG. Moreover, IGF-2 ameliorated CO induced behavioral abnormality. These effects are probably induced via IGF-1 receptor expressed on the neuronal cell surface. Supplementation of IGF-2 may have certain effects on DE after CO poisoning.

研究分野：神経免疫

キーワード：一酸化炭素中毒 遅発性脳症 マイクログリア 神経栄養因子 IGF-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素 (CO) 中毒は、急性期の中毒症状から回復しても、遅発性脳症と言われる神経障害を呈することがある。現在において、急性期の CO 中毒の治療および遅発性脳症の予防は、1900 年代半ばに用い始められた高圧酸素療法 (HBO) しかなく、目覚ましい進歩が無い。またその効果もいまだ賛否両論である。遅発性脳症の詳しいメカニズムは依然不明確であるが、臨床所見として脱髄現象が認められており、その原因として脳内における活性化マイクログリア (MG) の関与が示唆されている [Thom SR et al. 2004]。

しかしながら、実際に我々が CO 中毒モデルを用いて、純粋な低酸素脳症モデルとの差異について検討した研究では、CO 中毒のモデルでのみ Myelin basic protein (MBP) や Myelin-associated glycoprotein (MAG) といったミエリン鞘成分の持続的な減少が認められ、持続的に脱髄が進行することが示唆された。また、CO および低酸素暴露後 1 週間の海馬において、純粋な低酸素暴露群では MG の活性化が認められる一方で、CO 暴露群では MG は活性化するどころか、樹状突起がちぎれ、数の減少も認められた。さらに、それぞれの群から MG を免疫沈降法により単離し、それらの発現する神経栄養因子を確認したところ、CO 中毒群の MG は各種神経栄養因子の mRNA 発現が有意に減少していたが、低酸素暴露群の MG は、一部の神経栄養因子の mRNA 発現が有意に増加していた。これらのデータから、一酸化炭素中毒は純粋な低酸素状態とはその病態は大きく異なっており、CO 中毒後の遅発性脳症発症には、MG の減少による神経栄養因子発現の減少が関与する可能性が示唆された [Sekiya K et al. 2019]。

2. 研究の目的

本疾患において、上記の通り MG の存在が重要であることが示唆されるが、治療および予防を考えた際、一度アポトーシス経路へと進んだ MG に介入を試みることは、おそらく臨床的に困難であると思われる。CO 中毒では、ミエリンは暴露直後にはまだ保たれており、3 日後くらいから脱落するようであり、また、ミエリン構成細胞の前駆細胞であるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) も同様に CO 暴露により減少していることから、脱髄とその後の再生における障害が示唆される。このことから、遅発性脳症の治療ターゲットとして、ミエリン構成細胞であるオリゴデンドロサイトと、将来ミエリンとなる OPCs の減少を防ぐことが重要である。

MG は本来様々な起炎症性サイトカインを放出する一方で、同時に様々な神経栄養因子を産生する。中でも Insulin-like growth factor-2 (IGF-2) は OPCs の生存と成熟を促す重要な神経栄養因子の一つであり、近年では記憶の統合において重要な役割を果たしていることが報告されている [Chen DY et al. 2011]。このことに着目し、本研究では CO 中毒ラットに対して IGF-2 を補充することで、遅発性脳症の予防を行うことが出来るかを検討することを目的としている。

3. 研究の方法

生後 8 週の雄性 Wistar ラットを使用。CO 中毒および遅発性脳症のモデルとして、Thom らによって報告され、現在広く用いられているモデル (CO 1000ppm を 40 分間吸入させた後に CO 3000ppm を最長で 20 分間吸入させる [Thom SR et al. 2004]) を用いた。CO 1000ppm および 3000ppm は、特注でボンベ内にそれぞれの濃度の CO を混入したものをを用いた。ラットを、Sham 群として空気を吸入させた群 (Air 群)、CO モデルを作成後に PBS を注射した群 (CO 群) と recombinant IGF-2 を注射した群 (IGF2 群) に分け、3 群で評価する。IGF-2 は血液脳関門を通過することが報告されているが、その半減期は数時間程度と短く、頻回の注射が必要であると考えられる。そこで、本研究では CO 暴露後 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 20 日に 250ng/ml を皮下注射し、暴露後 3 週で海馬を摘出し解析する。

4. 研究成果

まず IGF-2 の働きから、ミエリン成分およびその前駆細胞である OPCs に着目し、その評価を行った。CO 中毒後 3 週間の海馬において、MBP および MAG の mRNA は IGF2 群で有意に CO 群よりも減少が抑制されており、同様に OPCs のマーカーである Neuron/Glial antigen 2 (NG2) の mRNA も同様の結果であった (Figure 1)。MBP に関しては、タンパクレベルでも同様の結果が得られた (Figure 1)。これらのラットで Passive Avoidance (PA) 試験による行動実験を行ったところ (N=10)、IGF2 群における 14 日、21 日での行動異常が、CO 群よりも有意に減少した (Figure 2)。しかしながら、一方で MG のマーカーである CD11b の mRNA は、CO 群と IGF2 群では有意な差は無く (Figure 3)、IGF2 は MG の生存に働きかけてミエリンの保持に関わるのではなく、MG 以外の細胞に対して効果を持つものと考えられる。実際に、モデル作製後翌日にそれぞれの群のラットより海馬を取り出し、MG を単離培養したところ、MG の生存に IGF-2 は効果を認めなかった (Figure 3)。IGF2 の効果を調べるため、それぞれの群において IGF1 受容体 (IGF1R) および IGF2 受容体 (IGF2R) の mRNA 発現を調べたところ、IGF1R でのみ有意な増加が IGF2 群で認められた (Figure 4)。IGF1R は免疫組織化学により、神経細胞の表面に発現していることから、神経細胞に直接的に働きかける可能性が示唆された (Figure 4)。

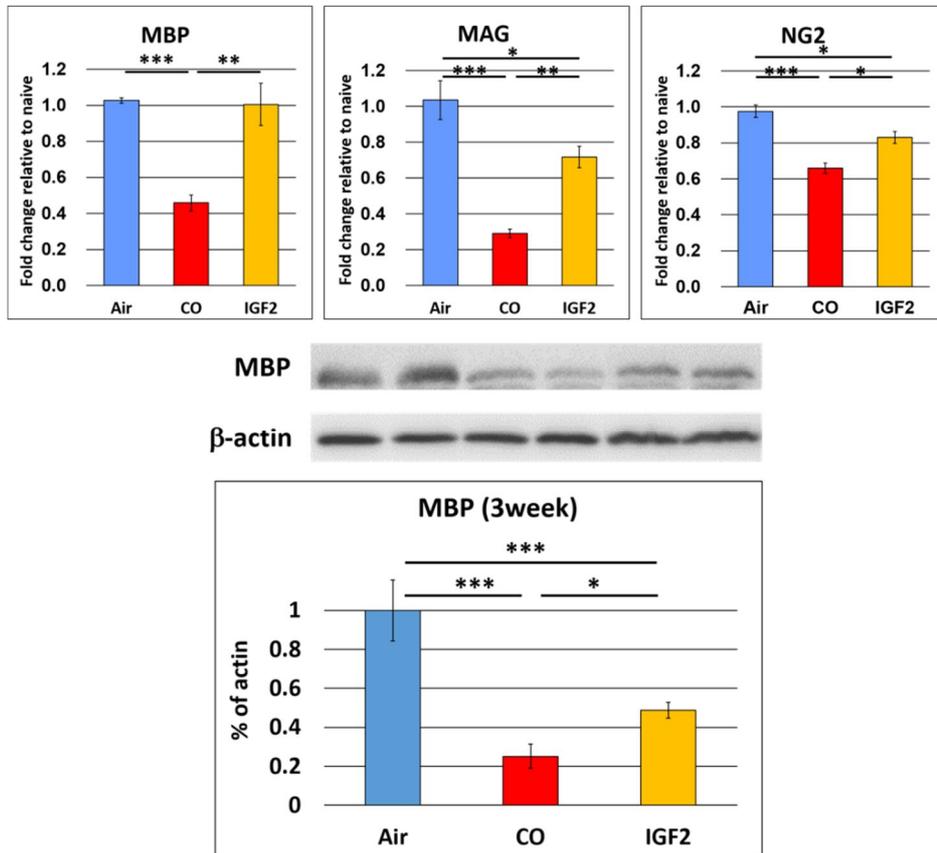


Figure 1: ミエリン関連マーカーおよびオリゴデンドロサイト前駆細胞関連マーカーの mRNA 変化
 一酸化炭素中毒モデルにおいて、IGF-2 の投与により MBP の減少が mRNA レベルおよびタンパクレベルで有意に抑制された。さらに、他のミエリン関連マーカーである MAG やオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである NG2 の減少も同様に mRNA レベルで有意に抑制された。

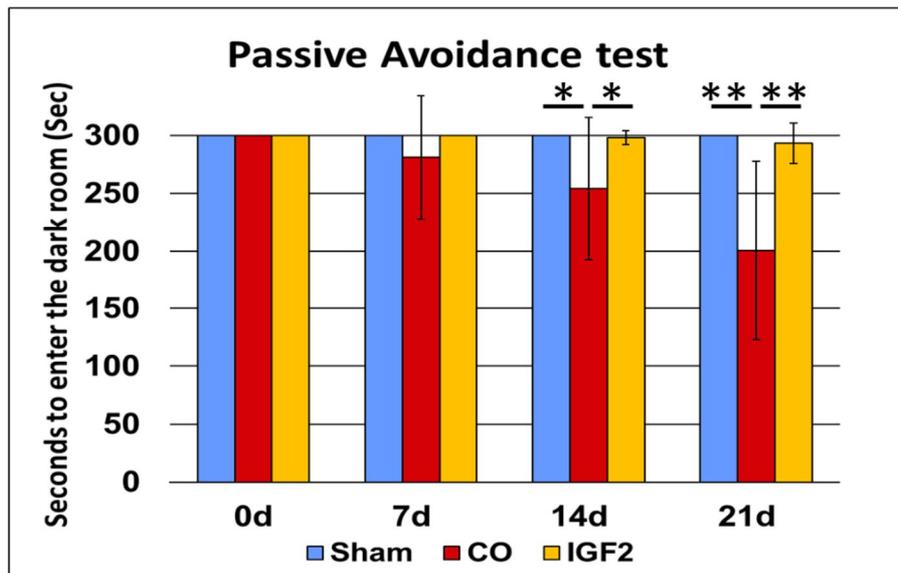


Figure 2: Passive Avoidance Test の結果
 一酸化炭素中毒モデルに IGF-2 を投与することで、行動異常を有意に予防した。

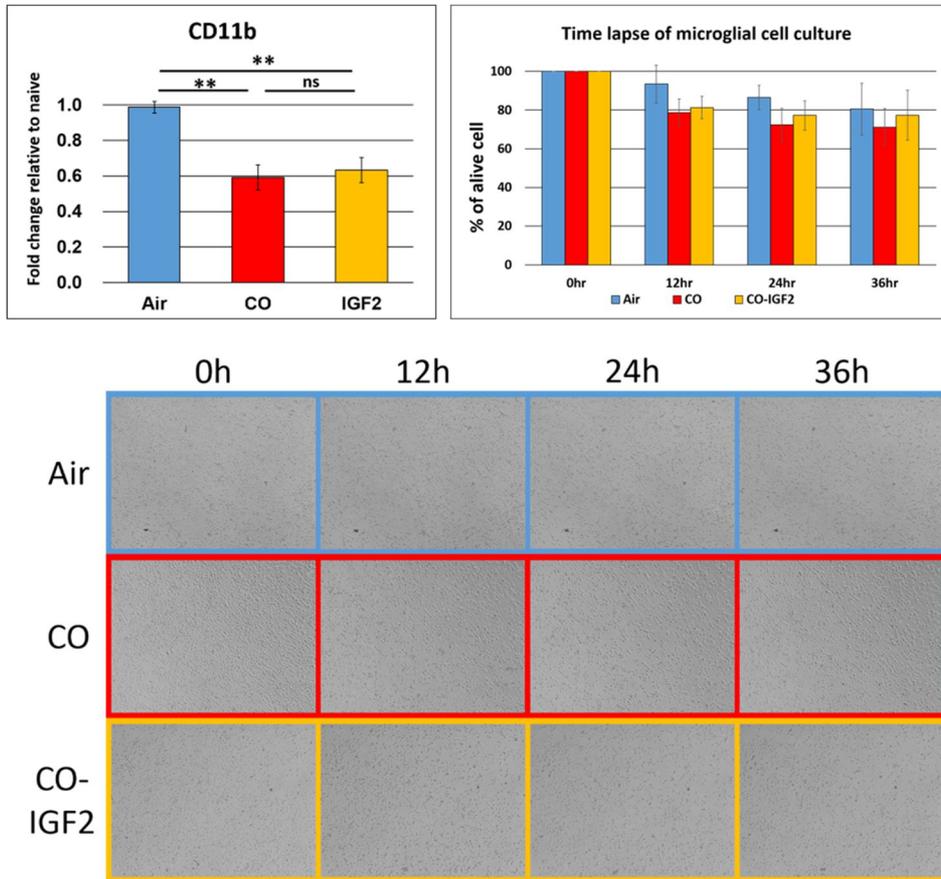


Figure 3: IGF-2 のマイクログリアにおける効果
 一酸化炭素暴露後3週において、IGF-2を投与してもマイクログリアのマーカであるIba1は海馬においてその mRNA は変化しなかった（上段左）。さらに、一酸化炭素暴露翌日に海馬からマイクログリアを単離したのちに IGF-2 を添加して 36 時間培養したところ、マイクログリアの生存には IGF-2 を添加しなかった群と有意な差は認めなかった。（上段右、下段）

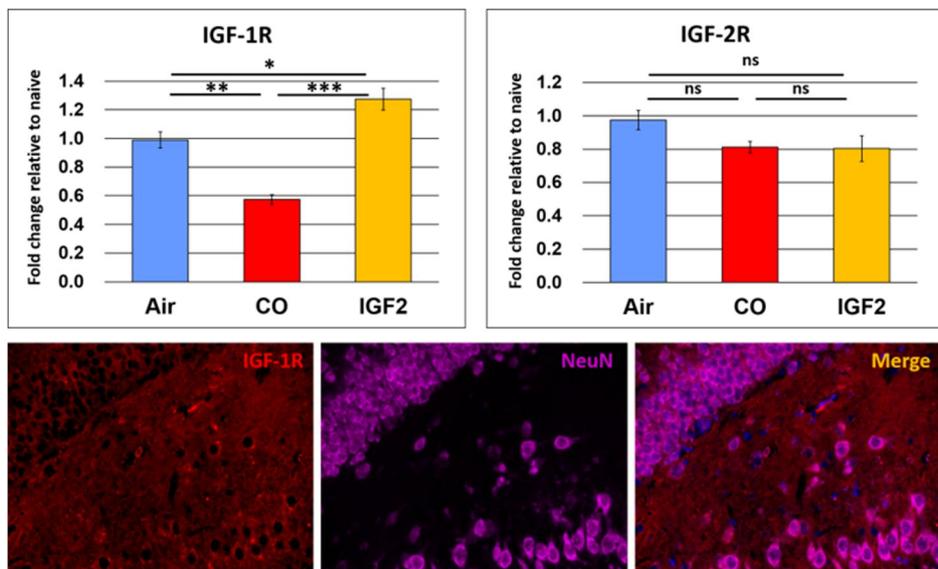


Figure 4: IGF-2 の作用部位
 IGF-2 を投与した群において、IGF-1 受容体 mRNA は有意に増加するにもかかわらず、IGF-2 受容体 mRNA には有意な差を認めなかった（上段）。IGF-1 受容体は神経細胞表面に発現している（下段）。

これらの結果から、IGF-2 は一酸化炭素中毒後の遅発性脳症に対して、一定の効果が認められることが示唆された。その効果として、ミエリンが IGF-2 の投与により保持される可能性が示唆された。機序として現段階においてはマイクログリアに IGF-2 が作用するのではなく、神経細胞に発現する IGF-1 受容体を介して作用するものと思われるが、ミエリンの保護と神経細胞に対する IGF-2 の効果との直接的な因果関係は明らかになっておらず、今後さらなる研究が必要であると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ochi S, Sekiya K, Abe N, Funahashi Y, Kumon H, Yoshino Y, Nishihara T, Boku S, Iga J, Ueno S	4. 巻 18
2. 論文標題 Neural precursor cells are decreased in the hippocampus of the delayed carbon monoxide encephalopathy rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85860-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Abe N, Nishihara T, Yorozuya T, Tanaka J	4. 巻 9
2. 論文標題 Microglia and Macrophages in the Pathological Central and Peripheral Nervous Systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9092132.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishihara T*, Kudamatsu N, Hamada T, Nakata Y, Yamamoto W, Nandate H, Namiguchi K, Nishimura T, Izutani H, Yorozuya T	4. 巻 23
2. 論文標題 A Case Report of Thrombotic Complete Obstruction of the Ascending Aorta as a Complication of Venoarterial Extracorporeal Membrane Oxygenation Support: Steps to Prevent Thrombosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13019-020-01239-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishihara T, Tanaka J, Sekiya K, Nishikawa Y, Abe N, Hamada T, Kitamura S, Ikemune K, Ochi S, Choudhury ME, Yano H, Yorozuya T	4. 巻 134
2. 論文標題 Chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats causes different activation modes of microglia between the anterior and posterior horns of the spinal cord	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2020.104672.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sekiya K, Nishihara T, Abe N, Konishi A, Nandate H, Hamada T, Ikemune K, Takasaki Y, Tanaka J, Asano M, Yorozuya T	4. 巻 1710
2. 論文標題 Carbon monoxide poisoning induced delayed encephalopathy accompanies decreased microglial cell numbers: Distinctive pathophysiological features from hypoxemia induced brain damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 22-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.12.027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto Y, Nishihara T, Watanabe A, Nakanishi K, Hamada T, Konishi A, Abe N, Kitamura S, Ikemune K, Toda Y, Yorozuya T	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Hemolytic reaction in the washed salvaged blood of a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12871-019-0752-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西原佑、関谷慶介、阿部尚紀、濱田泰輔、萬家俊博
2. 発表標題 一酸化炭素中毒後遅発性脳症に対する神経栄養因子による予防効果の検討
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------