

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18296

研究課題名(和文) 集中治療後の認知・精神障害におけるxCTを介した酸化ストレスとグルタミン酸の制御

研究課題名(英文) Regulation of Oxidative Stress and Glutamate via xCT in Cognitive and Psychiatric Disorders after Intensive Care

研究代表者

北川 良憲 (KITAGAWA, YOSHINORI)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40595154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Post-intensive Care Syndrome (PICS)とは、重症患者において集中治療室在室中や退院後に生じる精神機能障害、認知機能障害、身体障害の総称である。本研究ではその成因としてグルタミン酸の細胞外輸送に関与するxc-系と、その特異的構成分子のCystine/Glutamate transporter (xCT)に注目した。リポポリサッカライドの投与によりマウス敗血症モデルを作成した。LPS群では短期記憶障害や自発性低下を認めたと、海馬のミクログリアが活性化し、xCT発現が増加して、脳内のグルタミン酸の放出量が増加していた。これら諸症状はxCTの阻害により軽減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PICSの機序に関する分子生物学的な解明は始まったばかりであり、分子生物学的な機序の解明は不十分であった。そのような背景のなか、本研究はミクログリアにおけるxc-系/xCTを阻害することによって細胞外へのグルタミン酸放出を抑制する結果、敗血症後の認知・精神障害を軽減することを初めて明らかにした。世界では年間約2700万人に敗血症が発生しており、そのうち約800万人が死亡していると推定されている。近年、敗血症の救命率は上昇しているが、救命後の認知機能の低下などの後遺症は大きな問題となっており、本研究の成果は集中治療後の全般的な認知機能の低下に関する解決の糸口となりうるものである。

研究成果の概要(英文)：Post-intensive Care Syndrome (PICS) is a syndrome of psychiatric disorders, cognitive dysfunction, and physical disability that occurs in critically ill patients during intensive care unit stay and after discharge. In this study, I focused on the xc-system, which is involved in the extracellular transport of glutamate, and its specific component, Cystine/Glutamate transporter (xCT).

A mouse model of sepsis was created by injection of lipopolysaccharide. the LPS group showed short-term memory impairment and decreased spontaneity, indicating that microglia in the hippocampus were activated, xCT expression was increased, and glutamate release in the brain was increased. These symptoms were alleviated by xCT inhibition.

研究分野：麻酔・集中治療医学

キーワード：敗血症 認知・精神障害 xc-系 xCT グルタミン酸 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

集中治療後の精神障害については、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome : ARDS) 患者の退院後の精神的な生活の質 (Quality of Life : QOL) に関する報告が 1990 年代半ば頃より相次いでなされた。これらの報告のなかで、ARDS 患者が ICU を生存退室した後に抑うつ状態や不安、外傷後ストレス障害 (posttraumatic stress disorder : PTSD) などのさまざまな精神障害を残している割合が一般的な罹患率と比して高いことが指摘されてきた。ARDS 患者の精神的予後調査の先駆的報告とされる Hopkins らによる 1999 年の報告では、すべての患者が退院時に何らかの認知機能障害を持ち、1 年後でも 78% の患者に記憶や注意力、集中力について障害を残していたとしている。こうした認知機能障害や精神障害は、ARDS 患者に限らず、ICU に入床した重症患者全般に認められることも明らかになってきた。このような背景から、2012 年の米国集中治療医学会において Post-intensive Care Syndrome (PICS) という概念が提唱された。PICS とは、ICU 在室中あるいは退院後に生じる運動機能障害、認知機能障害、精神障害であり、長期予後に影響を与える病態と定義される。

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系において記憶・学習などの高次機能を調節する主要な興奮性神経伝達物質であるが、過剰なグルタミン酸はグルタミン酸興奮毒性と呼ばれる神経細胞障害作用を持つことも知られている。また、グルタミン酸の制御異常がうつ病や統合失調症の発症や進展に関与していると考えられており、「グルタミン酸仮説」として知られている。このため細胞外グルタミン酸濃度は厳密に制御される必要があり、グルタミン酸トランスポーターがその役割を担っている。

本研究において注目したのは、多選択性アミノ酸トランスポーターの一つである xc 系 (System xc⁻) である。その構成分子である Cystine/Glutamic acid transporter (xCT) は、CD98 heavy chain (CD98 hc) とヘテロダイマーを形成し、シスチンとグルタミン酸を輸送基質とする交換輸送体として機能している。xCT は細胞内のグルタミン酸を放出し、細胞外のシスチンを取りこむ形で機能し、細胞内に取りこまれたシスチンは、システインに還元されグルタチオン生成の基質となる。xCT は細胞への酸化ストレス負荷によって発現が誘導されることから、酸化ストレスに対する細胞保護因子として位置付けられてきた。

手術後や敗血症後の認知機能障害においては、病態の一部に脳内炎症が関与することが注目されており、ミクログリアの活性化を認められることが報告されていた。しかしながら、従来の脳内炎症の考え方は、主にミクログリアが分泌する TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインと神経細胞死を結びつけて論じられることが多かったが、精神症状の発生機序を十分に説明出来るものではなかった。特に、PICS の成因に関する知見は十分には得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究においては、過剰な酸化ストレス応答に伴う xc 系/xCT を介したグルタミン酸の制御異常が PICS の発症や進展に関与しているか否かを明らかにすることである。

3. 研究の方法

リポポリサッカライド (LPS) の腹腔内投与によるマウス敗血症モデルを作成し、以下の評価を行った。

(1) 精神症状・運動症状の評価

行動学実験として、ロータロッド試験 (運動機能、運動記憶)、自発運動試験用回転ケージを用いた自発運動試験 (wheel running activity : WRA)、Y 字迷路試験 (短期記憶)、体重変化の経時変化を追跡した。

(2) 精神症状へのミクログリア、xc 系/xCT 由来グルタミン酸の影響の評価

ミクログリアから細胞外への xc 系/xCT を介したグルタミン酸放出は、培地中のグルタミン酸濃度を酵素法により測定した。また、脳内のグルタミン酸濃度はマイクロダイアリシス法を用いて検出した。脳における xCT の発現量や分布に関して、それぞれウエスタンブロットや免疫染色法により解析した。

xCT 阻害薬や xCT ノックアウトマウスを用いた検討のほかに、NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬や AMPA 型グルタミン酸受容体阻害薬を併用することで、PICS 病態におけるグルタミン酸の解析を行った。さらに、xCT 阻害薬であるスルファサラジン (Sulfasalazine : SSZ) の共投与や xCT ノックアウトマウスを用いた検討により、LPS 単独投与群との差異を評価した。

4. 研究成果

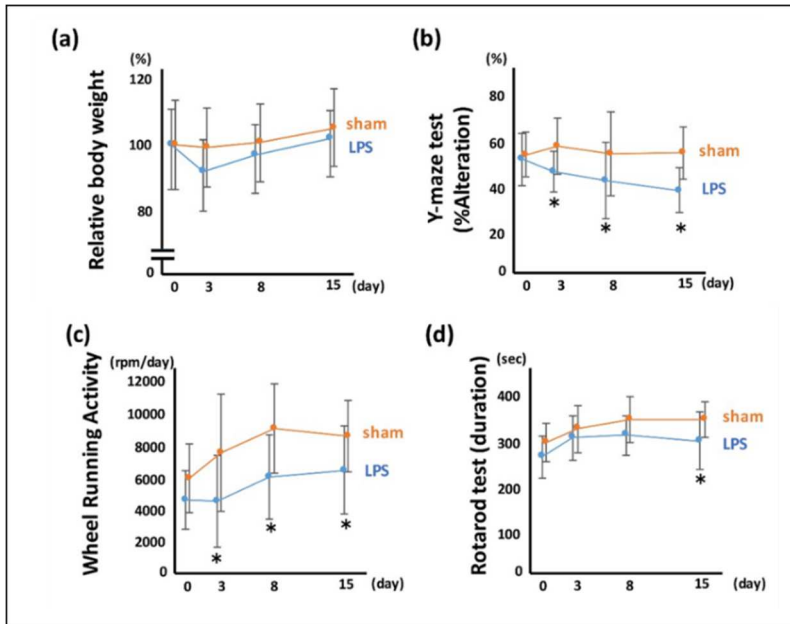


図 1. 行動学実験

LPS 投与 2 週間後の Y 字迷路, WRA, ロータロッド試験のスコアは, 対照群と比較していずれも低下した (図 1)。

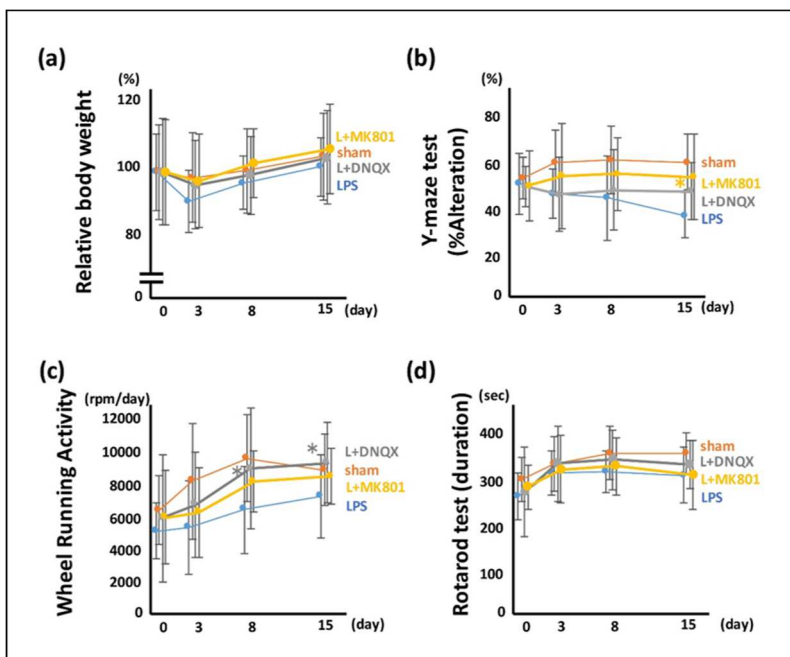


図 2. グルタミン酸受容体拮抗薬投与による効果

NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 MK801 の共投与により Y 字迷路のスコア低下は改善したことや, MK801 あるいは AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 DNQX の投与によって LPS 投与による WRA のスコアの低下が改善したことから, 表現型とグルタミン酸の関係性が示された (図 2)。

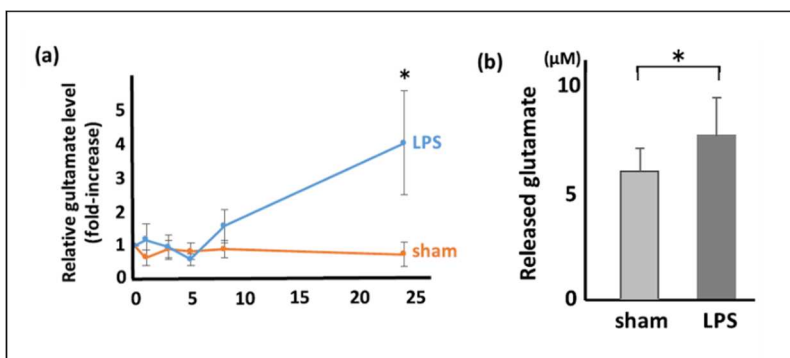


図 3. グルタミン酸の放出能評価

単離したミクログリアからのグルタミン酸の放出能は LPS 投与によって高まっており, 海馬のグルタミン酸の濃度も上昇していた (図 3)。

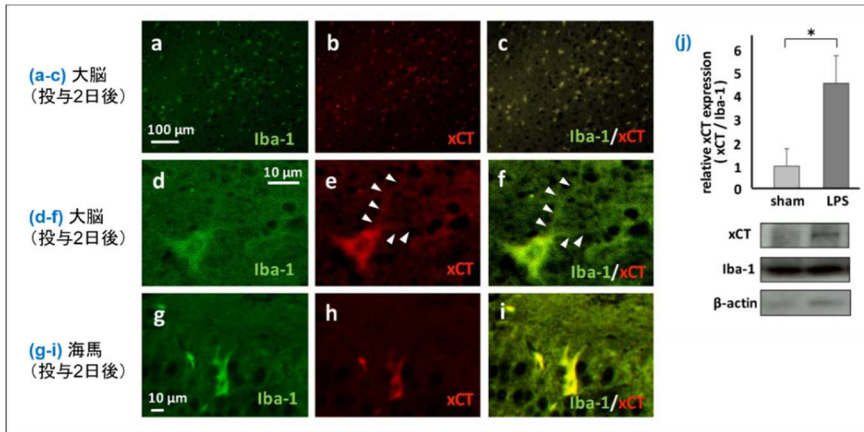


図 4. xCT の発現

グルタミン酸放出源の候補として xCT を考え検討したところ、xCT の発現は対照群では皆無であったが、LPS 投与後には誘導されていた。また、免疫染色による検討では、xCT 発現は主にミクログリアに認められた (図 4)。

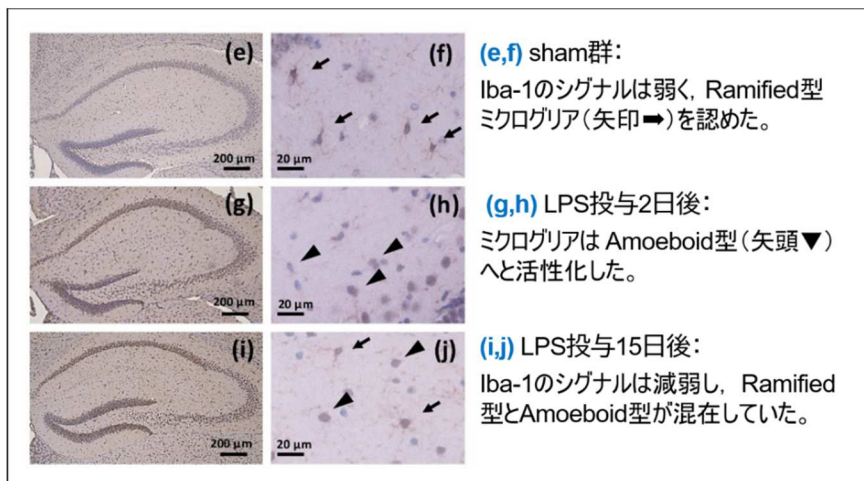


図 5. 海馬ミクログリアの活性化

LPS 投与は海馬のミクログリアを活性化させ、Ramified型から Amoeboid型へと変化した (図 5)。

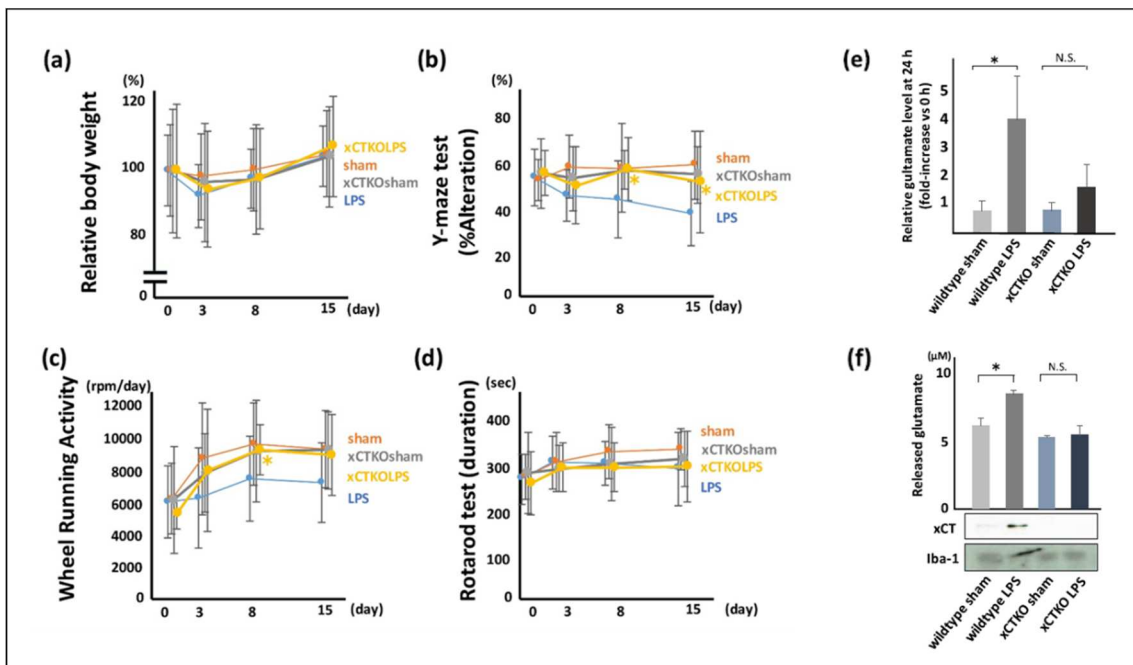


図 6. xCT ノックアウトマウスでの検討

xCT ノックアウトマウスに LPS を投与した場合は、野生型マウスに投与した場合と比較して、Y 字迷路および WRA のスコア低下は有意に軽度であり、海馬のグルタミン酸濃度やミクログリアからのグルタミン酸放出量も低値であった (図 6)。

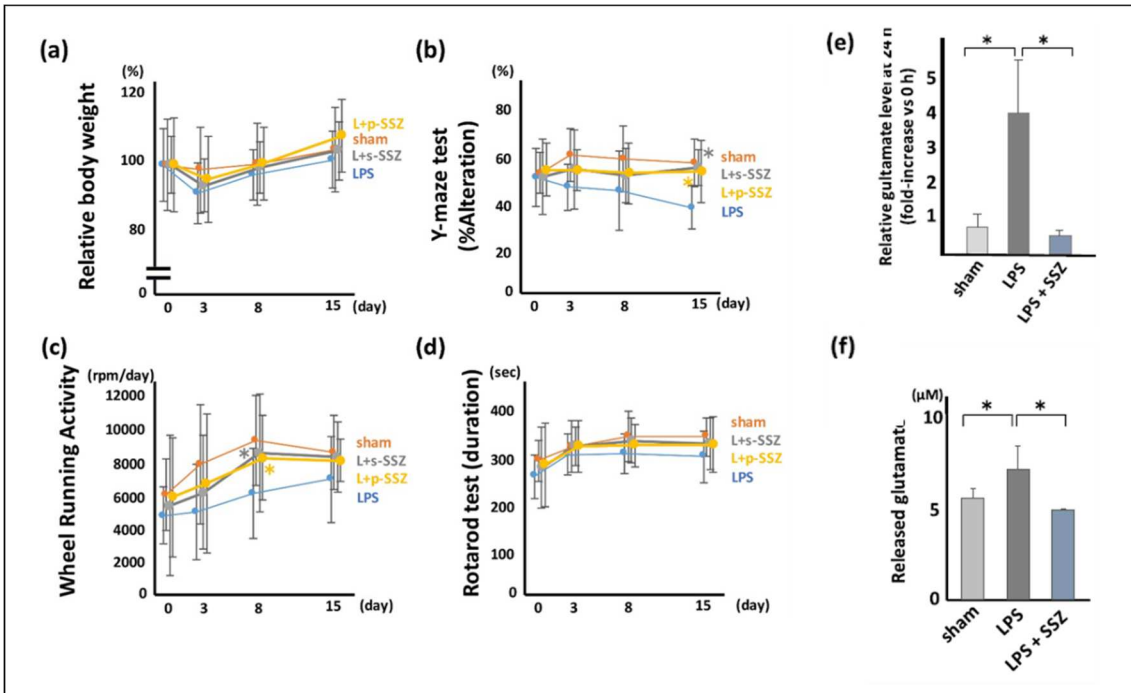


図 7. xCT 阻害薬 SSZ による効果

xCT 阻害薬 SSZ は, LPS と同時あるいは 1 時間後に投与することによって, Y 字迷路や WRA のスコア低下を抑制した。さらに, SSZ の同時投与によって海馬のグルタミン酸濃度の上昇やミクログリアからのグルタミン酸の放出は抑制された (図 7)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitagawa Yoshinori, Nakaso Kazuhiro, Horikoshi Yosuke, Morimoto Masaki, Omotani Takuma, Otsuki Akihiro, Inagaki Yoshimi, Sato Hideyo, Matura Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 System xc- in microglia is a novel therapeutic target for post-septic neurological and psychiatric illness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44006-8	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 Morimoto Masaki, Horikoshi Yosuke, Nakaso Kazuhiro, Kurashiki Tatsuyuki, Kitagawa Yoshinori, Hanaki Takehiko, Sakamoto Teruhisa, Honjo Soichiro, Umekita Yoshihisa, Fujiwara Yoshiyuki, Matura Tatsuya	4. 巻 470
2. 論文標題 Oncogenic role of TYRO3 receptor tyrosine kinase in the progression of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 149 ~ 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2019.11.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kitagawa Yoshinori, Kurashiki Tatsuyuki, Minato Hiroyuki, Moriyama Naoki, Funaki Kazumi, Otsuki Akihiro, Nakaso Kazuhiro, Matura Tatsuya, Inagaki Yoshimi
2. 発表標題 Dexmedetomidine Suppresses Lipopolysaccharide-induced Glutamate Release from Hippocampal Microglia in Mice.
3. 学会等名 米国麻酔科学会 American Society of Anesthesiologists（ANESTHESIOLOGY 2019）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川良憲, 倉敷達之, 仲宗根正人, 菅澤萌, 大槻明広, 稲垣喜三
2. 発表標題 デクスメドミジンはマウス株化マクロファージ RAW 264.7細胞においてリポポリサッカライド刺激によるグルタミン酸の放出を抑制する.
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川良憲, 中曽一裕, 倉敷達之, 森本昌樹, 堀越洋輔, 松浦達也
2. 発表標題 敗血症後の認知・精神障害におけるxc-系/xCTの関与
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川良憲, 倉敷達之, 古川恭子, 船木一美, 大槻明広, 稲垣喜三
2. 発表標題 デクスメドミジンはマウス株化ミクログリア6-3細胞においてリポポリサッカライド刺激によるxc-系の活性化とグルタミン酸の放出を抑
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川良憲, 坪圭亮, 菅澤萌, 仲宗根 正人, 南ゆかり, 稲垣喜三
2. 発表標題 肺血栓栓症による心肺停止に合併した前脊髄動脈症候群の一例
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中曽一裕, 大端周, 北川良憲, 堀越洋輔, 倉敷達之, 松浦達也
2. 発表標題 MPTP誘発パーキンソン病モデルにおける活動性低下はミクログリアxCT/xc-系と関係している
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉敷達之, 北川良憲, 足立雄基, 船木一美, 大槻明広, 稲垣喜三
2. 発表標題 デクスメドミジンはヒト株化ケラチノサイトHaCaT細胞においてリポポリサッカライドによる創傷治癒の遅延を改善する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021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

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