

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22731

研究課題名（和文）敗血症におけるオレキシンの血液-脳脊髄液の液性システムダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Dynamics of orexin in sepsis

研究代表者

小川 靖裕（Ogawa, Yasuhiro）

筑波大学・附属病院・医員

研究者番号：20445406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：敗血症の患者で、脳脊髄液オレキシンが減少していた。その後、敗血症の回復後、脳脊髄液オレキシンは正常値に戻った。また、血液オレキシンは通常検出されないが、敗血症の患者で血液オレキシンが検出された。その後、敗血症の回復後、血液オレキシンは検出されなかった。これらの結果は、敗血症によって血液脳関門が障害を受けたため、脳脊髄液オレキシンが血液中に漏れたと考えられた。このオレキシンの液性ダイナミクスの成果は論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オレキシンが、減少した脳脊髄液オレキシンを補充することで、敗血症から回復を促進したと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Reduced CSF orexin levels gradually recovered as she recovered from sepsis. Unexpectedly, orexin was detected in the blood, which is unusual in healthy humans. Blood orexin was not detected after recovery from sepsis. This result may imply that orexin leaks into the blood because of BBB dysfunction. To the best of our knowledge, this is the first report investigating orexin levels in the CSF and blood of a patient with sepsis, and the data obtained from this case may provide a new understanding of the pathophysiology of SAE.

研究分野：集中治療

キーワード：敗血症 オレキシン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、全身性炎症症候群(Systemic Inflammatory Response Syndrome: SIRS)から多臓器不全に陥り、死に至ると考えられているが、これは現象であり、どのようなメカニズムで死に至るのか説明していない。SIRS を起こさないマウスの原因遺伝子として Toll-Like Receptor 4(TLR4)が同定されたことを契機に SIRS が引き起こされるメカニズムが明らかになった。しかし、SIRS は敗血症のトリガーではあるが、多臓器不全を引き起こし、死に至るメカニズムはさらに複雑で、TLR4 を標的とした治療法は失敗に終わり、未だ敗血症の根本的な治療法はない。

敗血症では多くの臓器に障害がおよぶが、申請者は治療標的として中枢神経系に注目した。すでに、SIRS における中枢神経系の出力応答として自律神経系と神経内分泌系の活性化が明らかになり、敗血症の治療標的として中枢神経系が注目されたが、未だに実現していない。その中で、申請者は、驚くべきことに、睡眠覚醒を制御する神経ペプチドオレキシンを脳室内に投与すると、敗血症モデルマウスの生存率が改善することを見出した。作用機序の解明には至っていないが、治療コンセプトとして減少したオレキシンの補充療法が想定された。敗血症の新規治療標的として、敗血症におけるオレキシン系の役割の解明が期待される。

さらに、驚くべきことに、オレキシンは視床下部で産生され、血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)を通過せず、通常血液では検出されないが、敗血症モデルマウスでは、末梢投与したオレキシンが脳内に移行し、生存率が改善することを見出した。BBB の破綻を逆手に取った脳内へのドラッグ・デリバリーと考えられた。また、予備実験ではあるが、一部の敗血症患者の血液でオレキシンが検出された。これも BBB の破綻による漏出と考えられたが、オレキシン産生神経は炎症性サイトカインで神経活動が抑制されることから、経過に依存している可能性があった。敗血症における中枢神経系の病態として、BBB を介した血液-脳脊髄液の液性システムダイナミクスの解明が必要である。

2. 研究の目的

敗血症モデルマウスの生存率の実験の過程で、敗血症誘導 24 時間後の体温によって、高い感度と特異度で生命予後予測が可能なることを見出した。さらに、オレキシン投与によって、有意に生存が予測されるマウスが増えることを見出した。以上を踏まえて、本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、より具体的に「オレキシンの血液-脳脊髄液の液性システムが、敗血症の生命予後と関連しているか」である。

本研究の目的は、核心をなす学術的「問い」に基づき、敗血症モデルマウスにおけるオレキシンの血液-脳脊髄液の液性システムダイナミクスを明らかにすることで、オレキシンの敗血症に対する治療コンセプトを検証し、敗血症の生命予後に関連したオレキシン系の役割を解明することである。

3. 研究の方法

本研究は、敗血症モデルマウスの血液および脳脊髄液のオレキシン量を測定するという非常にシンプルな実験ではあるが、重要な点として サンプルングおよび測定の精度、 サンプルング・プロトコルをあげる。

1) 健常マウスにおける血液および脳脊髄液のオレキシン量の測定

マウスの脳脊髄液は非常に少量のため、サンプルングおよび測定に問題がなかったかを検証する必要がある。そのため、健常の野生型マウス、オレキシン欠損マウス、オレキシン過剰発現マウスを用いて、精度を検証する。

健常において、血液でオレキシンは検出限界以下であり、脳脊髄液では概日リズムがあり、活動期に多く、睡眠期に少ないことが知られているが、マウスの脳脊髄液は非常に少量のため、ラットや犬などの中型から大型の実験動物で確認した報告がほとんどである。サンプルング・プロトコルとしては、健常マウスを用いて、4 時間毎に 24 時間の血液および脳脊髄液のサンプルングをする。また、同時に体温を測定する。

オレキシン量の測定は、筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構の神林崇博士にお願いし、ラジオイムノアッセイにて測定する。野生型マウスだけではなく、オレキシン欠損マウスおよびオレキシン過剰発現マウスでも測定することで、測定の精度を担保する。

2) 敗血症モデルマウスにおける血液および脳脊髄液のオレキシン量の測定

健常マウスでの確認が取れたら、敗血症モデルマウスでの測定に入る。敗血症モデルマウスとしては、致死量のリポポリサッカライドを腹腔投与する。24 時間後の体温で生命予後予測が可能なることから、敗血症誘導後 24 時間の血液および脳脊髄液のオレキシン量の時間変化を追跡する。具体的なサンプルング・プロトコルとしては、敗血症誘導前、敗血症誘導後から 4 時間毎に 24 時間の血液および脳脊髄液のサンプルングをし、同時に体温を測定する。

主要評価項目は体温によって割り付けられた生存予測群と死亡予測群における血液および脳脊髄液のオレキシン量であるが、時系列データを基に生命予後、体温、血液および脳脊髄液の

オレキシン量の関連性を時間軸で探索的に解析していく。

3) オレキシンの末梢投与後の血液および脳脊髄液のオレキシン量の測定

最後に、健常および敗血症モデルマウスに対してオレキシンの末梢投与後の血液および脳脊髄液のオレキシンの動態を検証する。投与方法としては、注射器を用いて腹腔単回投与および浸透圧ミニポンプを用いて皮下 24 時間持続投与を予定している。サンプリング・プロトコールとしては、単回投与では投与前、投与後から 4 時間毎に 24 時間、持続投与では投与開始前、投与開始後から 4 時間毎に 24 時間の血液および脳脊髄液のサンプリングをし、同時に体温を測定する。これまでの実験結果からは、健常マウスではオレキシンを末梢投与しても脳内に移行せず薬理効果を示さない。一方で、敗血症モデルマウスでは脳内に移行し薬理効果を示す。今回、オレキシンの脳への移行性と薬理効果を定量的に評価する。

4 . 研究成果

マウスの脳脊髄液で安定してオレキシンを測定することが難しいことを確認した。ラットの脳脊髄液で安定して精度よくオレキシンを測定できることを確認した。敗血症モデルラットの脳脊髄液オレキシンが減少していることを確認した。また、敗血症患者の脳脊髄液オレキシンが減少し、回復するとともに減少していた脳脊髄液オレキシンが正常値まで戻ることを確認した。この結果から、減少したオレキシンを補充することによって、オレキシンが敗血症からの回復を促進するという治療コンセプトが考えられた。また、正常のヒトでは通常血液でオレキシンは検出されないが、敗血症患者の血液でオレキシンが検出され、敗血症から回復するとともに血液オレキシンは検出されなくなった。この結果から、脳脊髄液オレキシンが、全身性炎症による血液脳関門の障害によって、血液中に漏れ出したと考えられた。当初の研究計画通りには進まなかったが、この研究を通して、世界で初めての脳を標的とした敗血症の治療薬として、オレキシン療法の臨床応用への道を開いた。

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 2件）

1 . 著者名 Ogawa Y, Shimojo N, Ishii A, Tamaoka A, Kawano S, Inoue Y.	4 . 巻 15
2 . 論文標題 Reduced CSF orexin levels in rats and patients with systemic inflammation: a preliminary study.	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 BMC Res Notes	6 . 最初と最後の頁 221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-022-06121-0.	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 Ogawa Y, Ezaki S, Shimojo N, Kawano S.	4 . 巻 15
2 . 論文標題 Case Report: Reduced CSF Orexin Levels in a Patient With Sepsis.	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 Front Neurosci.	6 . 最初と最後の頁 739323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.739323. eCollection 2021.	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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