

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08930

研究課題名(和文)心肺停止蘇生後の記憶障害に対するTNF- α 阻害薬による治療効果の検討研究課題名(英文)Therapeutic effects of TNF- α inhibitors on memory impairment after cardiopulmonary arrest resuscitation

研究代表者

若崎 るみ枝 (Wakasaki, Rumie)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：20461527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心肺停止患者の心肺蘇生率が向上している一方で、蘇生後の患者は脳症や腎不全などの臓器障害を伴うことが深刻な問題となっている。それらの発症機序は未だ明確でなく、有効な治療法の確立に至っていないのが現状である。心肺蘇生を起因とする炎症性細胞の活性化は各種臓器の細胞死を誘導する可能性が示唆されているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、心肺停止後あるいは虚血再灌流後の炎症性細胞の活性化が関連細胞内のCa²⁺シグナルに依存していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蘇生後脳症の患者の中には記憶障害のみが残存し社会復帰が困難な場合がある。このような記憶障害を持つ患者数が増加することは、社会的損失となる可能性がある。また蘇生後の腎機能障害も同様であり、特に末期腎不全に至る場合には社会復帰に大きな障害となる。本研究では、心肺停止蘇生後の脳および腎機能障害に対する新規治療法の開発を目指すべく、脳・腎臓における蘇生後病態発症機構の分子基盤を明らかにすることを目的としている。

研究成果の概要(英文)：While the rate of cardiopulmonary resuscitation of patients suffering from cardiopulmonary arrest has improved, it has become a serious problem that post-resuscitation patients develop organ damage such as encephalopathy and renal failure. The pathogenesis of these diseases is still unclear, and at present no effective treatment method has been established. It has been suggested that activation of inflammatory cells caused by cardiopulmonary resuscitation may induce cell death in various organs, but the detailed mechanism is unknown. In this study, we revealed that activation of inflammatory cells after cardiopulmonary resuscitation or ischemia-reperfusion is dependent on Ca²⁺ signals with relevant cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：虚血再灌流障害 脳障害 腎障害

1. 研究開始当初の背景

平成 26 年の全国院外発症心原性心肺停止患者は 25,255 人/年であり、1 ヶ月後の社会復帰者は 1,974 人/年、米国では 2016 年の心肺停止 559,000 人/年、生存者 93,832 人/年であった。心肺停止蘇生後の脳機能障害により社会復帰が困難である患者が多いが、その有効な治療法は未だにない。一般市民による心配蘇生率は向上し、今後患者数の増加に伴い社会的問題となることが予想される。

蘇生後の記憶障害は、低酸素に脆弱な海馬領域の細胞死が原因である。細胞死は心停止数日後に最多となる。この遅発型神経細胞死は海馬の免疫細胞である活性化ミクログリアが関係しており、細胞死のピークを迎える前に障害細胞から放出される炎症性メディエーターにより引き起こされる。しかし、この免疫反応による遅発型神経細胞死の詳細については未だ不明である。ミクログリアはその他の免疫細胞と同様に、toll-like receptors (TLRs) を介して病原体から放出される分子や障害細胞から放出される danger-associated molecular patterns (DAMPs) を認識する。中枢神経の TLRs は主にミクログリアで発現し、内皮細胞、アストロサイト、ニューロン上での発現は少ない。TLR2 はグラム陽性菌の細胞壁構成成分を、TLR4 はグラム陰性菌の細胞からの Lipopolysaccharide (LPS) を認識するが、虚血性障害にも関与する。DAMPs に反応したミクログリアは TNF- α を含めた mediator を放出する。広範な虚血後のニューロンには TNF- α 受容体が upregulation されており、Caspase 依存性に細胞死を起こす。

脳梗塞モデルでは TNF- α 阻害による梗塞範囲を減少させる効果は報告されている (Barone, Arvin et al. 1997) が、蘇生後の遅発性細胞死における炎症細胞に対する TNF- α 阻害効果についてとそれによる機能障害については明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 心肺蘇生モデルおよび虚血再灌流障害モデルを作製し、関連周辺細胞の細胞死あるいは機能変動を検討する。

(2) 心肺蘇生および虚血再灌流障害後の細胞死・機能変動に関わる炎症性細胞の浸潤および、炎症性細胞の特性・分類を検討する。

3. 研究の方法

(1) 心肺蘇生モデルおよび虚血再灌流障害モデルの作製

全ての実験は、8-15 週までの C57BL/6 (野生型および遺伝子改変マウス) を用いて実施した。

心肺停止モデルは、カリウム誘発性の心停止 8 分後に、胸骨圧迫と静脈内エピネフリンの投与により蘇生を開始させることで作製する方針とした。また、上記心肺停止後蘇生モデルによる実験がうまくいかなかった場合を考慮し、心肺停止蘇生に惹起される虚血再灌流障害を、他の臓器 (腎、肺など) で検討することを計画に追加した。腎虚血再灌流障害モデルは、右の腎臓を摘出した 7 日後に左の腎動静脈をクリッピング (30 分) した後、クリップを外し、虚血後の再灌流を促すことにより作製した。

(2) 急性腎障害の機能評価

急性腎障害の評価は、国内外の診断基準 (KDIGO: AKI 診療ガイドライン 2016) に従って、解析を行う。具体的には、薬剤性・敗血症誘発急性腎障害モデルマウスの尿量、尿中・血中の電解質濃度 (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+})、血中クレアチニン・BUN を測定する。GFR については、FITC 標識イヌリンを静注した後、時間経過に伴う血中 FITC 標識イヌリンの減衰曲線により GFR を算出した。

(3) 急性腎障害の組織学的評価

急性腎障害の原因は、血管性、糸球体性、尿細管/間質性に大別され、臨床では治療方針の決定にこれらの組織学的評価が重要になる。急性腎障害において臨床的に頻度が高いとされる急性尿細管障害 (壊死) を検討するために、各種急性腎障害モデルマウスの腎組織を採取し、HE 染色・PAS 染色により尿細管の障害程度 (壊死、拡張、脱落、円柱形成) をスコア化した。尿細管微細構造 (刷子縁、細胞膜、細胞質内オルガネラ局在・形態) ならびに尿細管障害に伴う糸球体構造異常 (内皮細胞の小孔減少、足突起の融合) については、電子顕微鏡を用いた解析を行った。

(4) 急性腎障害の炎症反応解析

急性腎障害の発症・進展には、炎症が重要な役割を果たしている。急性腎障害進行の段階により、自然免疫系細胞 (樹状細胞、好中球、NK 細胞、マクロファージ) が主体となり、炎症性サイトカイン分泌に伴う浸潤が引き起こされる。本実験では、各種急性腎障害モデルにおける炎症性サイトカイン (IL-1, TNF- α , CSF-1, MCP-1) の発現を RT-PCR や ELISA 法を用いて検討し、炎症性細胞の浸潤を、免疫細胞マーカー (F4/80) により解析した。

<引用文献>

1) KDIGO: AKI 診療ガイドライン 2016.

4. 研究成果

(1) 尿細管における Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスを用いた虚血再灌流障害モデル: 腎機能の変動

尿細管 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスおよび対照マウスを用いて虚血再灌流障害モデルを作成し、尿量、尿中・血中の電解質濃度 (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+})、血中クレアチニン・BUN を測定したところ、 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異 (欠損) マウスにおいて血中クレアチニンおよび BUN の増加が、対照マウスに比べて減弱していた。このことから、虚血再灌流障害に尿細管の Ca^{2+} 動体が深く関わっていることが示唆された。

(2) 尿細管における Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスを用いた虚血再灌流障害モデル: 腎組織学的評価

尿細管 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスおよび対照マウスを用いて虚血再灌流障害モデルを作成した後、腎組織を採取し、HE 染色・PAS 染色により尿細管の障害程度 (壊死、拡張、脱落、円柱形成) をスコア化した。その結果、 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異 (欠損) マウスにおいて腎皮質尿細管の傷害が軽減していた。

(3) 尿細管における Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスを用いた虚血再灌流障害モデル: 腎組織学的評価

尿細管 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスおよび対照マウスを用いて虚血再灌流障害モデルを作成した後、腎組織を採取し、HE 染色・PAS 染色により尿細管の障害程度 (壊死、拡張、脱落、円柱形成) をスコア化した。その結果、 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異 (欠損) マウスにおいて腎皮質尿細管の傷害が軽減していた。

(4) 尿細管における Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスを用いた虚血再灌流障害モデル: 炎症細胞の浸潤度合い評価

尿細管 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異マウスおよび対照マウスを用いて虚血再灌流障害モデルを作成した後、腎組織を採取し、免疫染色により TNF- α の関わる炎症性細胞の浸潤を観察した。その結果、 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異 (欠損) マウスにおいて F4/80 陽性マクロファージの浸潤が軽減し、尿細管 Ca^{2+} 輸送体関連遺伝子変異 (高発現) マウスにおいて F4/80 陽性マクロファージの浸潤は、顕著に増加していた。

(5) 腎障害誘発刺激による尿細管 Ca^{2+} シグナル異常: Ca^{2+} 輸送体関連分子の阻害薬による抑制

尿細管特異的 GCaMP6 導入マウスの腎スライスを用いて、低酸素・ H_2O_2 刺激による Ca^{2+} シグナルを解析したところ、刺激度合いに応じて尿細管 Ca^{2+} シグナルは上昇した。同実験を Ca^{2+} 輸送体関連分子の阻害薬処置下で行なったところ、尿細管 Ca^{2+} シグナルの上昇は有意に抑えられた。

以上の結果から、心肺蘇生および虚血再灌流障害後におこる腎障害では、尿細管および周囲を取り巻く血管系に異常が見られ、尿細管内の Ca^{2+} 過負荷により、TNF- α の関わる炎症性細胞である F4/80 陽性マクロファージの浸潤に影響を及ぼすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 虚血性急性腎不全発症における遠位尿管Caオーバーロードの重要性
3. 学会等名 第6回 日本臨床薬理学会 九州・沖縄地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、田頭秀章、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 遠位尿管特異的NCX1欠損/高発現マウスを用いた急性腎障害機序の解析
3. 学会等名 第51回日本心臓血管作動物質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 虚血性急性腎障害における遠位尿管NCX1の重要性
3. 学会等名 第41回 日本マグネシウム学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、田頭秀章、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 腎尿管NCX1遺伝子改変マウスの虚血性急性腎不全モデル実験
3. 学会等名 第12回トランスポーター研究会九州部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、田頭秀章、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 遠位尿細管特異的NCX1遺伝子改変マウスを用いた腎虚血再灌流障害機序の解析
3. 学会等名 第5回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、田頭秀章、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 虚血性急性腎障害における遠位尿細管NCX1の病態生理学的重要性
3. 学会等名 NIPS 生理研研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、田頭秀章、喜多知、中嶋尚子、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 遠位尿細管特異的NCX1遺伝子改変マウスを用いた虚血性急性腎障害機序の解析
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takayuki Nemoto, Rumie Wakasaki, Hideaki Tagashira, Tomo Kita, Naoko Nakajima, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Distal tubular NCX1 plays a critical role in ischemic acute kidney injury
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本隆行、若崎るみ枝、喜多知、喜多紗斗美、岩本隆宏
2. 発表標題 NCX輸送体を標的とした急性腎障害治療戦略
3. 学会等名 第13回 トランスポーター研究会九州部会
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	山浦 健 (Yamaura Ken) (70264041)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	根本 隆行 (Nemoto Takayuki) (90506833)	福岡大学・医学部・講師 (37111)	

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