

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10928

研究課題名（和文）敗血症関連脳症の病態機序の解明および治療薬の検討

研究課題名（英文）Pathophysiology of sepsis-related encephalopathy and investigation of therapeutic agents

研究代表者

里元 麻衣子（SATOMOTO, Maiko）

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：10611551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：全身性炎症が脳内神経炎症を引き起こし、脳内神経炎症は急性の認知機能障害を呈するということが指摘されている。しかしながら、神経炎症の病態生理学は十分に明らかになっておらず、現在確立された治療法はない。今回我々はLPS投与により誘発された全身性炎症由来の脳内神経炎症と認知機能低下モデルマウスに対して、セボフルランの前投与が神経保護的効果をもたらすか検討した。セボフルラン前投与は全身性LPS投与により引き起こされた記憶障害を改善させ、過度のミクログリアの活性化を抑制し、炎症を抑え、アミロイド関連蛋白の上昇を抑制した。これら結果からセボフルランの前投与は脳内神経炎症に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症を起因とした敗血症性脳症は、全身性炎症反応の結果として生じ、せん妄、見当識障害など様々な症状を呈する。しかしながら、敗血症関連脳症の発生メカニズムは明らかになっておらず、病態機序の解明と治療薬の開発は注目されており臨床的にも喫緊の課題となっている。今回全身性炎症由来の脳内神経炎症と認知機能低下モデルマウスに対して、セボフルランの前投与が全身性LPS投与により引き起こされた記憶障害を改善させ、過度のミクログリアの活性化を抑制し、炎症を抑え、アミロイド関連蛋白の上昇を抑制した。これら結果からセボフルランの前投与は全身炎症性反応の結果引き起こされる脳内神経炎症に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Systemic inflammation induces brain neuronal inflammation, in turn causing acute cognitive disorders. Furthermore, neuronal inflammation is one cause of postoperative cognitive disorder (POCD) and delirium. However, no sufficiently established pharmacological treatment is available for neurocognitive inflammation. This study evaluated the possible neuroprotective effects of preconditioning with sevoflurane anesthesia on cognition and neuroinflammatory changes in an animal model of lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation. This study supports the hypothesis that sevoflurane preconditioning might also be beneficial for neuronal inflammation. Sevoflurane might be beneficial for reducing delirium and POCD.

研究分野：医学

キーワード：神経炎症 認知機能障害 セボフルラン

1. 研究開始当初の背景

敗血症は昔から知られている疾患ではあるが未だに特效薬といえるものがなく、完治が難しい病態である。敗血症を起因とした敗血症性脳症 (**septic encephalopathy**) は、微生物の中枢神経系への侵入により引き起こされる脳炎とは異なり、感染による全身性炎症反応の結果として生じる、びまん性脳機能障害であり、近年は、敗血症関連脳症 (**sepsis-associated encephalopathy; SAE**) や敗血症関連譫妄 (**sepsis-associated delirium**) などとも呼ばれる。本疾患は他の臓器不全に先行してみられることも多く、興奮、易刺激性による譫妄、見当識障害から昏睡までさまざまな症状を呈し、病態生理としては、脳内の炎症惹起による神経伝達経路の異常、アポトーシス誘導以外にも、脳微小循環障害による虚血の関与も推定されている。さらに、因果関係はまだ明らかにはなっていないが、重症度、死亡、生存後の長期認知機能障害との関連も推定されている。しかしながら、敗血症関連脳症の発生メカニズムはいまだに明らかになっておらず、この病態機序の解明と治療薬の開発は世界的に注目されており臨床的にも喫緊の課題となっている。

研究代表者は、これまで発達段階の中枢神経における麻酔薬の毒性についての研究を進めてきており、その分野での第一人者である。新生仔マウスに麻酔薬 (セボフルラン) を併用し、セボフルランそのものが脳の発達および成長後の学習障害を引き起こすことを世界に先駆けて報告した。その後もセボフルランによる神経毒に対して、治療効果の検討を行い先駆的な結果を明らかにしてきた。



本研究の予備実験として、成獣マウスにリポポリサッカライド (以下 **LPS**) を投与することで敗血症実験モデルを作り、そのモデルに麻酔薬であり脳内炎症増悪因子であるセボフルランの併用を行った。成獣マウスに腹腔内 **LPS** を **1mg/kg** とごく少量投与し、海馬においてコントロール群に比較して炎症反応が上昇していることを確認しこれを敗血症実験モデルとし、**LPS** 投与後さらにセボフルラン (**1%**) を **15** 分間曝露した。結果、曝露により海馬の炎症反応はより上昇することを明らかにした (図 1)。さらに今回 **LPS** 単独投与においてミトコンドリア障害の指標であるチトクローム **C** が上昇を認めているも、セボフルランを併用することでミトコンドリア障害はさらに増幅されていること (図 2)、アルツハイマー関連タンパク質 (**BACE 1**) が上昇すること (図 3) も明らかにした。

成長発達中の脳では、セボフルランに曝露されることで脳細胞の炎症反応およびミトコンドリア障害が起きることがわかっている。一方、通常の脳では本現象は起きない。そのため、この結果から敗血症実験モデルは通常の脳ではなく成長発達段階の脳に近いことを明らかにした。本研究ではこの予備実験の結果から「敗血症の脳」と「成長発達段階の脳」の炎症発生メカニズムは同じであるという仮説を立て、本仮説の検証およびその時の脳内状態の解析を行い炎症の発生メカニズムを明らかにし、敗血症関連脳症の病態機序の解明および治療薬の検討を行う。

2. 研究の目的

(1) **LPS** 腹腔内投与により引き起こされる全身性炎症による脳内炎症効果の検討

上記で述べたような背景から、我々は敗血症患者の脳内と成長発達段階の脳内は共通点があり同様のメカニズムで炎症が引き起こされると仮説を立てた。これを検証するために、敗血症実験モデルを作り、そのモデルにセボフルランを曝露させ、成長発達段階の脳内と同様の反応が起きるかどうかを明らかにする。そのために、セボフルランを曝露させた敗血症実験モデルに対して、成長発達段階の脳へのセボフルランの曝露で起きる下記反応の検討を行った。

- 脳組織の免疫組織学的検討および電子顕微鏡によるミトコンドリアを中心とした微細構造の観察
- アルツハイマー関連タンパクの上昇およびそれに伴う認知機能障害およびミトコンドリア障害から引き起こされるアポトーシスによると考えられている学習障害について行動実験を用いた解析

(2) 脳内炎症効果の検討より治療薬の開発

成長発達中の脳におけるセボフルランの毒性についての治療薬を、セボフルランが脳内に重大な影響を与える反応から開発を行い、論文化している。本研究でも同様にセボフルランが非常に短時間かつ軽度であっても、脳内に重大な影響を及ぼすかどうかを明らかにし、治療薬の開発を行う。すでに開発した脳の成長発達期の麻酔薬の毒性を抑制する薬剤 (**NADPH** オキシダーゼ阻害剤であるアポシニン) は、候補として有力であり、投与時期や濃度の検討も含めて実施する計画である。さらに (1) の実験結果から新たに見つけ出された治療ターゲットについても研究を行う。活性酸素を抑える水素などいくつかの系統の薬剤も候補であると考えている。

敗血症関連脳症により長期認知機能障害が示唆されているも、その病態機序はいまだ明らかでない。敗血症の重症度や死亡との関連も指摘されており、世界的に注目されているトピックであり、臨床的にも早期に病態解明したい喫緊の課題といえる。本研究のように、成長発達期の麻酔薬の神経毒について、安定した実験系および熟練を伴う動物行動学的な手法ならびに脳組織標本を用いた形態学的アプローチを組み合わせることで研究できる施設は国内でも数少なく、そのほとんどの手法を「脳内炎症を増悪させるもの」という切り口で応用できることが本研究の特色といえる。本研究により、敗血症関連脳症及び増悪因子であるセボフルランの関与機序の解析から、敗血症関連脳症の予防及び治療法を確立するうえでの一つの突破口となることが期待される。

<参考文献>

1. Deng YY et al. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013;12:720-5.
2. Essen F et al. *Crit Care*. 2005;9:R18-23.

3. 研究の方法

【背景】全身性炎症が脳内神経炎症を引き起こし、この反応が引き続いて急性の認知機能障害を呈する現象が注目されている。さらに、神経炎症は術後の認知機能障害 (POCD) や術後せん妄の発症原因となることも指摘されている。しかしながら、神経炎症の病態生理学は十分に明らかになっておらず、現在確立された治療法はない。今回我々はLPS投与により誘発される全身性炎症由来の脳内神経炎症と認知機能低下モデルマウスを用いて、セボフルランの前投与が神経保護的效果をもたらすか検討したので報告する。

【方法】6か月齢のオスのC57BL/6NCrを使用した。マウスを以下の4群に分けた。(1)生理食塩水群、(2)2%セボフルラン1時間投与群、(3)腹腔内LPS5mg/kg投与群、(4)LPS投与前に2%セボフルランを1時間投与群。LPS投与後24時間後に、海馬のミクログリアの活性化、炎症性サイトカインの測定、脳内アミロイドの解析を、免疫染色及びウエスタンブロッティングで行った。認知機能は恐怖条件付けテストとし、実験の時系列はFig. 1のとおり行った。

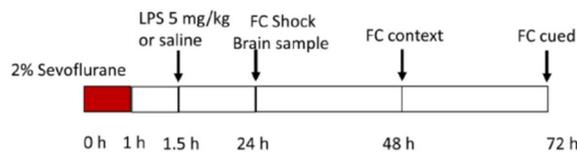


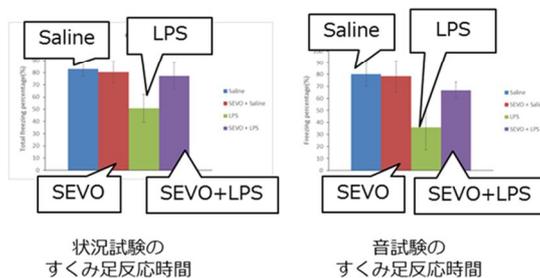
Fig. 1. Timeline of the experimental procedure. FC, fear conditioning. Mice were administered 2% sevoflurane or carrier gas only for 1 h before receiving a 5 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) or saline intraperitoneal injection. Twenty-four h after LPS injection, brain samples were taken for Western blotting. A fear conditioning test was performed on days 2, 3, and 4.

【結果】LPS投与により、脳内のミクログリアの活性化 (150%)、炎症性サイトカインの上昇 (160%)、脳内アミロイド関連タンパクの上昇 (350%) を認めた。セボフルランの前投与はこれらの上昇を抑えた。全身性LPS投与により有意な学習障害が惹起されたが、セボフルランの前投与はこの学習障害を軽減した。セボフルラン単独による脳内神経炎症や学習への影響は認めなかった。

4. 研究成果

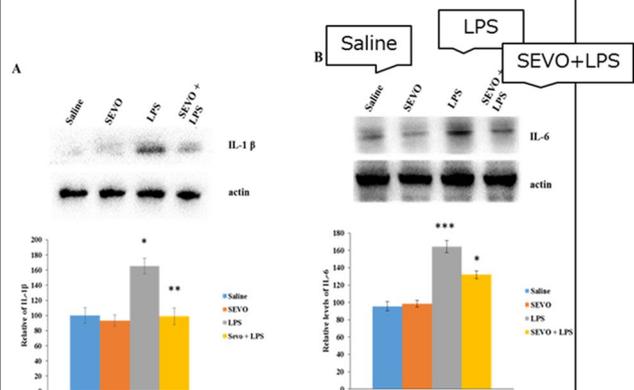
恐怖条件づけテスト

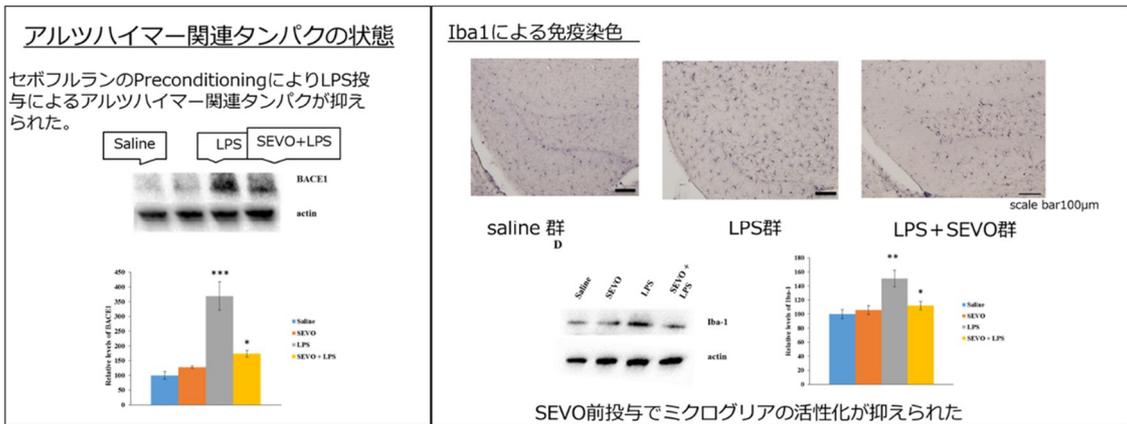
LPS投与により、恐怖条件づけテストで異常が認められた。セボフルランのPreconditioningにより学習障害が回復した



脳内の炎症タンパクの状態

セボフルランのPreconditioningによりLPS投与による脳内炎症が抑えられた。





を5.考察

セボフルランの投与時期や時間などいろいろな条件で行ったところ、今回のようなセボフルランの炎症抑制効果が、LPS投与により誘発される全身炎症性脳内反応に対して有用であることが証明された。セボフルランの前投与自体に炎症や学習への影響はなかった。セボフルラン前投与は全身性LPS投与により引き起こされた記憶障害を改善させ、過度のミクログリアの活性化抑制し、炎症を抑え、アミロイド関連蛋白の上昇を抑制した。これら結果からセボフルランの前投与は脳内神経炎症に有効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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Satomoto M, Sun Z, Adachi YU, Kinoshita H, Makita K	4. 巻 67
2. 論文標題 Sevoflurane preconditioning ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Anim.	6. 最初と最後の頁 193-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.17-0102	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 Satomoto M, Sun Z, Adachi YU, Makita K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Neonatal Sevoflurane Exposure Induces Adulthood Fear-induced Learning Disability and Decreases Glutamatergic Neurons in the Basolateral Amygdala.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosurg Anesthesiol.	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/ANA.0000000000000387	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 -

1. 著者名 Satomoto M, Sun Z, Adachi YU, Makita K.	4. 巻 72
2. 論文標題 Blood-brain barrier disruption caused by neonatal sevoflurane-induced depends on exposure time and is reversible in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Korean J Anesthesiol.	6. 最初と最後の頁 389-391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.4097/kja.d.19.00029	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 Satomoto M, Sun Z, Adachi YU, Makita K.	4. 巻 2016
2. 論文標題 Sugammadex-Enhanced Neuronal Apoptosis Following Neonatal Sevoflurane Exposure in Mice	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anesthesiol Res Pract .	6. 最初と最後の頁 9682703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2016/9682703	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 Sun Z, Satomoto M, Adachi YU, Makita K.	4. 巻 70
2. 論文標題 Apocynin Preserves Glutamatergic Neurons in the Basolateral Amygdala in Mice With Neonatal Sevoflurane Exposure	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Korean J Anesthesiol .	6. 最初と最後の頁 335-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4097/kjae.2017.70.3.335	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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 里元麻衣子、孫忠良、足立裕史、張愛玲、木下浩之、横田浩史
2. 発表標題 セボフルランの前投与は、LPS投与後の全身性炎症反応による認知機能低下を減弱させる効果がある
3. 学会等名 日本麻酔科学会大64回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Li C, Satomoto M, Sun Z, Zhang A, Adachi YU, Nishiwaki K.
2. 発表標題 Apocynin Preserves Glutamatergic Neurons in the Basolateral Amygdala in Mice with Neonatal Sevoflurane Exposure.
3. 学会等名 Anesthesiology Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Zhang A, Satomotom M, Sun Z, Li C, Adachi YU, Nishiwaki K.
2. 発表標題 2% Sevoflurane Influenced Blood-Brain-Barrier Opening And Integrity in Neonatal Mice.
3. 学会等名 Anesthesiology Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 里元麻衣子
2. 発表標題 「Pro's and Con's」子供の未来を守る麻酔とは？「Con: 麻酔薬は子供の脳の発達に悪影響を及ぼすかもしれない」
3. 学会等名 日本麻酔科学会第63回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Adachi YU, Echizen M, Taharabaru S, Higashi M, Tamura T, Satomoto M.
2. 発表標題 Dopamine D2-receptor Antagonist-induced Electroencephalographic Change is Independent from the Depth of General Anesthesia Using Sevoflurane
3. 学会等名 Anesthesiology Annual Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Adachi YU, Higashi M, Taharabaru S, Kuroiwa K, Tamura T, Satomoto M, Sato A, Okuda M.
2. 発表標題 Midazolam-induced Electroencephalographic Change Is Not Fully Antagonized By Flumazenil During Propofol Anesthesia In Rats.
3. 学会等名 Anesthesiology Annual Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Maiko Satomoto	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 255
3. 書名 General Anesthesia Research	

〔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	横田 浩史 (MAKITA Koshi) (20199657)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	削除：2017年2月3日