

令和 3 年 10 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11425

研究課題名(和文) PICS関連の中樞神経障害を予測するバイオマーカーの開発と臨床応用

研究課題名(英文) Establishment of new diagnostic methods for PICS.

研究代表者

山田 真史奈 (YAMADA, Marina)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70508621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：集中治療の進歩により、重症疾患患者の救命率が向上している。その一方で、ICU退出後、脳機能障害が高頻度に生じており、生活の質(QOL)の低下や社会復帰へ支障を来することが報告されている。患者 QOLの保持、患者関係者の負担軽減、医療費削減に直結しうるPICS対策が求められるが、未だ有効なモニタリング法および治療法は確立されていない。本研究の目的は、重症疾患患者が慢性期に発症する中枢神経系機能障害の予後予測法および治療薬を開発することである。認知症に関連する内在性神経保護因子、Humaninの発現量を測定したところ、マウスとヒトで相関結果を得られなかった。引き続き、測定方法の見直しを行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、将来的に重症疾患患者が慢性期に発症する中枢神経系機能障害の予後予測法および治療薬を開発することにつながる。期間内に予後予測法および治療薬を確立することはできなかったが、その候補因子としてHumaninの有用性は明らかにできた。本研究期間で得られた結果は、最終的には患者 QOLの保持、患者関係者の負担軽減、医療費削減に直結しうるものであり、とても重要な一歩だと考えている。

研究成果の概要(英文)：Marked increase in survival after critical conditions such as septic shock have led us to further improve long-term illness described as post-intensive care syndrome (PICS), which covers both physical and psychiatric dysfunction among patients recovered from intensive care. The aim of the study was to establish new diagnostic methods for PICS. We developed murine PICS model by cecal ligation and puncture (CLP). CLP-induced sepsis caused acute increase in serum inflammatory cytokines and induced gliosis in the central nervous system, leading to working memory impairment. Using the model, we measured the HN levels in blood and tissue. As a result, HN levels in blood was decreased after CLP, which was negatively correlated with working memory impairment. Using blood samples of patients recovered from intensive care, we measured HN levels. We, however, could not get same result.

研究分野：脳機能障害、炎症

キーワード：敗血症 PICS Humanin

1. 研究開始当初の背景

集中治療の進歩により、重症敗血症患者や重症頭部外傷患者の救命率が向上している。その一方で、近年、ICU 退出後の慢性期において、記憶障害、ストレス症状、うつ病、倦怠感、長期的筋力低下といった脳機能障害が高頻度に生じており、生活の質(quality of life, QOL)の低下や社会復帰へ支障を来すことが報告されている。こうした病態は、2012年 Society of Critical Care Medicine の合同会議において Post-intensive care syndrome(PICS)という概念にまとめられた。本邦においても重症敗血症診療ガイドライン 2016 では、PICS が新たに取り上げられている。患者 QOL の保持、患者関係者の負担軽減、医療費削減に直結しうる PICS 対策が求められるが、未だ有効なモニタリング法および治療法は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、重症疾患患者(重症敗血症および頭部外傷)が慢性期に発症する中枢神経系機能障害の予後予測法(バイオマーカー)および治療薬を開発することである。

このために、各種 サイトカイン、特に認知症に関連する内在性神経保護因子、ヒューマニン(Humanin, HN)に注目し、病態への寄与、治療薬としての可能性を検討することで、重症疾患患者において、内因性の神経保護ペプチド HN が、PICS で生じる中枢神経障害のバイオマーカーとなり得るか、HN および HN 誘導体が PICS 関連中枢神経障害に対する治療効果を有するかを検討する。

(1) 重症敗血症モデルマウスを用いた検討：

PICS マウスを作成し、侵襲後(敗血症後)の障害臓器へのアポトーシス細胞蓄積、侵襲後炎症性生体反応との相関を解析する。また、同モデルに対する HN 投与による効果を検討する。

(2) 治療メカニズムの解析：

侵襲後の過剰な炎症性生体反応が HN で抑制される機序を解析する。

(3) 患者由来検体を用いた validation：

ヒト重症疾患患者由来の検体(急性期から亜急性期における)末梢血を用いて、HN 濃度と神経細胞・グリア細胞のバイオマーカーを同時に測定する。

3. 研究の方法

(1) 重症敗血症モデルマウスを用いた検討：

A. PICS マウス作成：

PICS マウスとしては、敗血症研究で使用されている盲腸結紮穿刺(Cecal ligation and puncture: CLP)の手法を改良することで、重症敗血症後に脳機能障害が誘導されるモデルマウスを作成した。

マウスは雄の ICR マウスを使用。マウスは通常の SPF(specific pathogen free)環境で飼育し、12時間の昼夜間隔、室温制御は 23 ± 1 、湿度は $50\% \pm 10\%$ 、自由摂餌摂水条件のもとで飼育した。実験は「日本医科大学動物実験ガイドライン」に準拠した。

B. PICS マウスに対する HN 投与実験：

PICS マウス作成後、Vehicle 群および HNG 投与群に振り分けて、HN は CLP 作成 1 時間後から 6 日間、 0.75mg/kg/day を腹腔内投与した。神経障害は、各種行動試験により評価した。
*一般的な運動パターン：Open field 試験、記憶障害：Y-maze 行動試験、うつ症状：尾懸垂試験。

(2) 治療メカニズムの解析：

A. 血中バイオマーカーの探索：

PICS マウス作成後、急性期(1、3、7 日)、慢性期(1、3、6 ヶ月)のタイムコースで血中 HN 濃度と各種サイトカイン(TNF、IL1、IL6)を ELISA で測定した。

B. 臓器障害の評価：

ホルマリン固定した脳と腹腔内臓器から染色切片を作成し、TUNEL および Caspase-3 染色によりアポトーシスを検出した。また、神経周辺の炎症状態の評価として、神経細胞とミクログリア、 $\text{A}\beta$ -Amyloid を用いて、貪食マーカーの発現を測定した。

(3) ヒトの重症疾患患者由来の検体：

重症敗血症患者の末梢血、頭部外傷の患者かつ重症例のサンプル採取。ヒトの重症疾患患者の血中 HN 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 重症敗血症モデルマウスを用いた検討:

PICS マウス作成後 (CLP) 7 日目の生存率は CLP+Vehicle (CV) 群に比べて CLP+HNG (CH) 群では、生存率を有意に改善した。また、21 日目で CLP に起因する短期記憶 (YM; SA%) の低下を認め、CV 群と比べて CH 群で、CLP 誘導性の記憶障害が有意に抑制されていた。急性期に CV 群で観察された炎症性サイトカイン (TNF、IL1、IL6) の上昇が CH 群で抑制されていた。また、慢性期に CV 群で生じる大脳中隔のコリン作動性神経と海馬神経細胞減少およびシナプス可塑性は、CH 群では SV 群とほぼ同レベルまで改善していた。YM において短期記憶 (SA%) は脳機能障害軽度の群に比べて重度の群で有意に低下した。

(2) 治療メカニズムの解析:

大脳と海馬における β -Amyloid の量は重度の群において顕著に増加していた。初代培養アストロ細胞を β -Amyloid と LPS で刺激した結果、 β -Amyloid ないし LPS 単独処理の群よりも β -Amyloid と LPS の両方で刺激した群で TNF と IL6 の発現に相乗効果が得られた。

PICS マウスにおける急性期、慢性期の HN 濃度の変動を観察した結果、血中 HN 濃度は、炎症で低下していた。しかしながら、脳内の HN 濃度は部位依存で上昇傾向が観察された。

(3) 患者由来検体を用いた血中 HN 濃度の測定:

患者由来検体を用いた血中 HN 濃度の測定は、個体によるばらつきが大きく、本プロジェクトで構築した ELISA 方法では、市販の ELISA kit や他の炎症性バイオマーカーとの相関関係を認めなかった。

HNG 投与によって CLP 後の生存率を改善し、敗血症性脳症に対する有効な脳神経保護効果も確認された。その機序は HNG が急性期炎症性サイトカイン産生を抑制することで、脳保護作用を発揮するためと考えられた。HNG は炎症性サイトカインが関与して生じる脳の機能不全に効果が期待される。

患者由来検体を用いた血中 HN 濃度の測定については、臨床検体の測定でも再現性の高いデータを得られるように改良を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

山田真史奈、松田明久、相磯貞和、増野智彦、松本尚、宮下正夫、横田裕行、全身炎症が脳機能に与える影響の検討から得られた治療シーズ～基礎研究、第 44 回日本救急医学会総会・学術集会、2016

山田真史奈、増野智彦、松本尚、横田裕行、早期の感染コントロールは、敗血症マウスモデルにおける PICS 脳機能障害を抑制させる、第 44 回日本救急医学会総会・学術集会、2016

Marina Yamada, Tomohiro Chiba, Akihisa Matsuda, Sadakazu Aiso, Tomohiko Masuno, Hisashi Matsumoto, Hiroyuki Yokota, Masao Miyashita, The role of astrocytes in the nervous system dysfunction, sepsis induced memory impairment., the 8th Congress of the International Federation of Shock Societies, 2016

Kumiko Sekiguchi, **Marina Yamada**, Tomohiro Chiba, Akihisa Matsuda, Sadakazu Aiso, Tomohiko Masuno, Hisashi Matsumoto, Hiroyuki Yokota, Masao Miyashita, S14G-Humanin improves the survival from severe sepsis, the 8th Congress of the International Federation of Shock Societies, 2016

山田真史奈、千葉知宏、松田明久、相磯貞和、増野智彦、松本尚、横田裕行、宮下正夫、PICS 病態におけるアストロサイトの役割、第 23 回 外科侵襲とサイトカイン研究会、2016

Marina Yamada, Akihisa Matsuda, Tomohiro Chiba, Sadakazu Aiso, Tomohiko Masuno, Hisashi Matsumoto, Hiroyuki Yokota, Masao Miyashita, The effect of S14G-Humanin on memory impairment induced by severe sepsis., 39th Annual Conference on Shock, 2016

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：横堀 将司
ローマ字氏名：YOKOBORI Shoji
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：70449271

研究分担者氏名：近田 祐介
ローマ字氏名：KONDA Yusuke
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：80637827
(平成28より勤務先移動のため削除)

研究分担者氏名：太田 黒崇伸
ローマ字氏名：OTAGURO Takanobu
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：60786812
(平成28より近田祐介先生の仕事の引き継ぎのため追加)

(2)研究協力者

研究協力者氏名：千葉 知宏
ローマ字氏名：CHIBA Tomohiro

研究協力者氏名：宮下 正夫

ローマ字氏名：MIYASHITA Masao

研究協力者氏名：横田 裕行

ローマ字氏名：YOKOTA Hiroyuki

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、研究者個人に帰属されます。