

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11576

研究課題名(和文) 一酸化炭素中毒による遅発性脳症発症の分子メカニズム解明のための研究

研究課題名(英文) Distinctive pathophysiological features of Carbon monoxide poisoning-induced delayed encephalopathy compared with hypoxemia-induced brain damage

研究代表者

萬家 俊博 (Yorozuya, Toshihiro)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10230848

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)：ラットをコントロール群(Air群)、一酸化炭素(CO)に暴露した群(CO群)、低酸素状態に暴露した群(LowO2群)の3群に分けた。CO群でのみ1週後より有意な認知機能の低下を認めた。それぞれのラットから海馬組織を取り出し解析したところ、CO群ではLowO2群よりも有意に激しく長期におよぶ脱髄が認められた。さらに、海馬組織におけるマイクログリアはCO群で有意に減少していたが、一方、LowO2群で活性化が認められた。海馬における神経栄養因子のmRNAの発現はCO群で有意に減少していた。マイクログリアの減少および神経栄養因子の発現減少は、CO中毒後遅発性脳症の一因であるのかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の行った研究で得られた知見は、これまでの報告とは全く異なる新しいものであった。特に、マイクログリアの活性化によって脱髄が引き起こされることが問題の一つとされていたこれまでの報告と比べ、マイクログリアは活性化するどころか、逆に減少し、おそらくはそれに伴うと考えられる神経保護因子の減少は、今後の治療方法が大きく変わる可能性がある。例えば、マイクログリアの活性化を抑制することを目的とする治療方針から、マイクログリアの生存を助けることを目的とする、もしくは、減少した神経保護因子を補う事を目的とする治療方針への転換などが考えられ、社会的に大きな意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide (CO) causes a delayed neurologic syndrome called delayed encephalopathy (DE). Rats were randomly assigned to three groups; the air group, the CO group (exposed to CO), and the low O2 group (exposed to low concentration of O2). The impairment of memory function was observed only in the CO group. The demyelination in the CO group was more severe and continued longer than that in the low O2 group. Moreover, decrease in microglial cells were observed in the CO group, however, on the other hand, microglial cells were activated in the low O2 group. mRNAs of several neurotrophic factors expressed by microglia were decreased in the CO group but increased in the low O2 group. Conclusively, CO-induced DE displayed distinctive pathological features from simple hypoxic insults; prolonged demyelination accompanying a significant decrease in microglial cells. The decreased neurotrophic factor expression in microglial cells may be one of causes of CO-induced DE.

研究分野：麻酔一般

キーワード：microglia neurotrophic factor carbon monoxide delayed encephalopathy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一酸化炭素 (CO) 中毒は主に火災や練炭自殺などで発生し、急性期には高濃度では意識障害を起こし死に至る。急性期の中毒症状から回復しても、その数日から数週後に遅発性 (間欠型) 脳症と言われる神経障害を呈することがある。CO 中毒の急性期の主な機序は、ヘモグロビン (Hb) との強い親和性 (酸素の 200 倍以上) のために形成された COHb による、組織への酸素運搬能低下とそれに伴う低酸素状態とされる。一方、遅発性脳症の機序は、大脳白質の広汎な脱髄現象、淡蒼球を主体とする基底核容積の減少など様々な所見は報告されているものの、その詳しいメカニズムは依然不明確である。

遅発性脳症における上記所見のメカニズムとして、脳内の免疫担当細胞であるマイクログリアの活性化の関与が示唆されている (Thom SR et al. 2004)。脳内において免疫システムが発動するメカニズムは、CO による酸素運搬能の障害とそれに伴う低酸素症であると考えられるが、数週間後に発症することから、初期の低酸素状態による虚血の影響の長期化、もしくは遅発的な顕在化が考えられる。しかしながら純粋な低酸素状態への暴露と比較した研究は無く、低酸素脳症との違いは不明である。

2. 研究の目的

一酸化炭素中毒後の遅発性脳症の病態生理学的メカニズムや低酸素症との違いを明らかにし、遅発性脳症に対する新たな知見を得ることを目的とする。

また、現時点において、有効な治療法が確立されていない一酸化炭素中毒後の脳傷害に対し、分子標的薬などの開発など、新たな有効な治療法の確立につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

生後 8 週の雄性ウイスターラットを用い、CO 中毒のモデルとして、すでに確立されている Thom らが報告した (Thom SR et al. 2004) モデル (1000ppm の CO に 40 分間吸入させた後、3000ppm の CO を最長で 20 分間吸入させる) を作成する (CO 群)。Low O₂ モデルとして 8% で 40 分間吸入させた後、4% で最長 20 分間吸入させた (1000ppm の CO は酸素濃度 8%、3000ppm の CO は酸素濃度 4% に相当する) モデルを作成する (LowO₂ 群)。コントロールとして空気を 60 分間吸入させる (Air 群)。

Air、CO、Low O₂ それぞれの吸入後 3 日、1 週間、2 週間、3 週間の時点で passive avoidance test を用いた行動実験を行う。行動実験で変化の起こり始める 1 週間後、及び遅発性脳症を発症する 3 週間後のラットから大脳を取り出す。摘出した大脳は左右に分け、右半球の海馬、大脳皮質から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR のために cDNA を作成する。左半球の海馬と大脳皮質は Western Blotting サンプルとする。さらに、免疫沈降法やフローサイトメトリーを用いて海馬組織からマイクログリアのみを抽出し、各群でのマイクログリアの数や性質の違いを検討する。また、免疫組織化学的手法をもって、空間的な蛋白発現を確認する。

4. 研究成果

まず 3 週間の各群の認知機能の差を passive avoidance test を用いた行動実験により比較検討した。Air 群、Low O₂ 群では吸入後 21 日までに変化は認められず、CO 群でのみ 7 日目以降の有意な認知機能の低下を認めた (Figure 1)。

次に海馬組織サンプルの解析を行った。遅発性脳症の発症機序の一つと考えられている脱髄現象について検討するため、ミエリンを構成するタンパクである myelin basic protein (MBP) や myelin-associated glycoprotein (MAG)、成熟オリゴデンドロサイトのマーカーでもある glutathione S-transferase pi 1 (GST π) などの mRNA やタンパクの発現変化について調べた。これらの mRNA は、CO 群では LowO₂ 群よりも明らかに有意に Air 群と比較して減少していた (Figure 2Aa, Ab, Ac)。また、タンパク発現でも同様の結果が得られた (Figure 2Ba, Bb)。さらに、ミエリンの前駆細胞とされるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPCs) についても検討したところ、そのマーカーである Neuron-gial antigen 2 (NG2) や platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α) の mRNA 発現が共に CO 群でのみ 7 日目以降で有意に減少していた (Figure 2Ca, Cb)。NG2 のタンパク発現は mRNA と同様であった (Figure 2D)。

マイクログリアは脳内の免疫担当細胞であるが、病態脳においてそれらの活性化は様々な影響を及ぼす。我々はマイクログリアの状態を観察するために、Iba1、Tmem119、CD11b といった広く用いられているマイクログリアのマーカーの mRNA やタンパクの変化を確認した。これまでの報告では、マイクログリアの活性化が原因となり脱髄が起こる可能性が示唆されていたが、

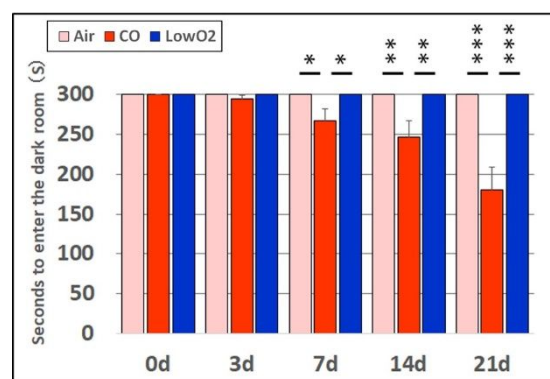


Figure 1 : 3 週間の行動実験結果

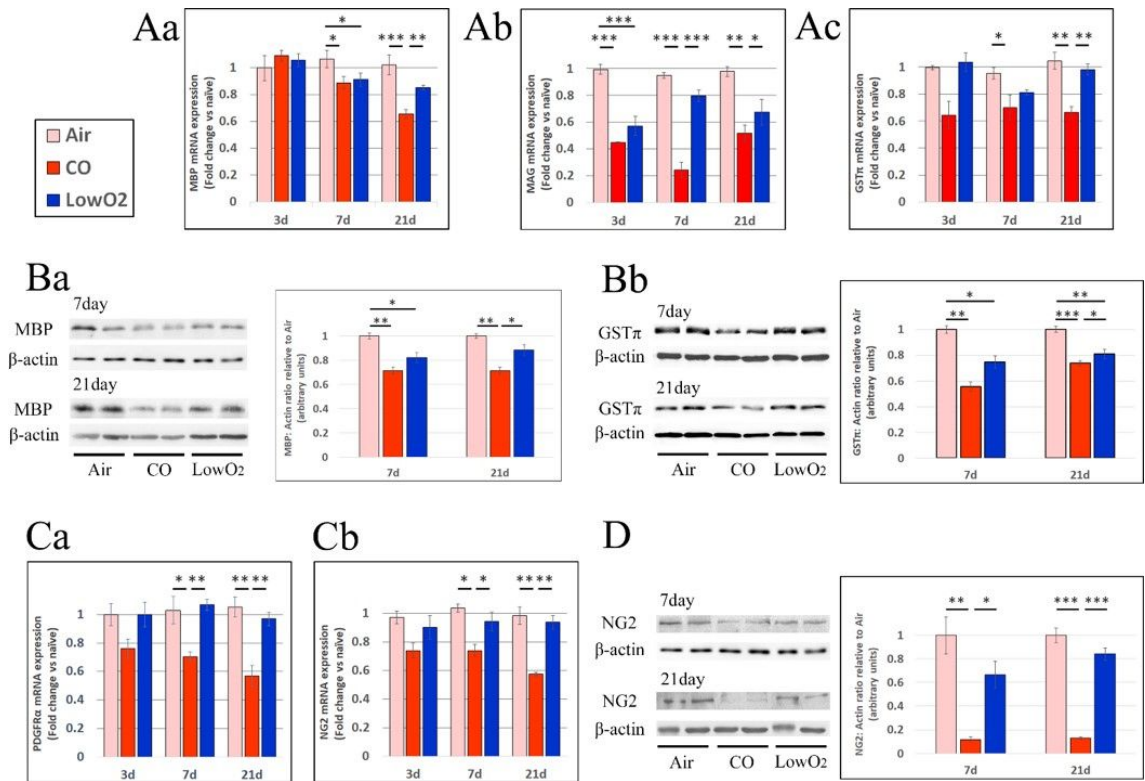


Figure 2 : 海馬におけるミエリンおよびミエリン前駆細胞の mRNA およびタンパク発現変化

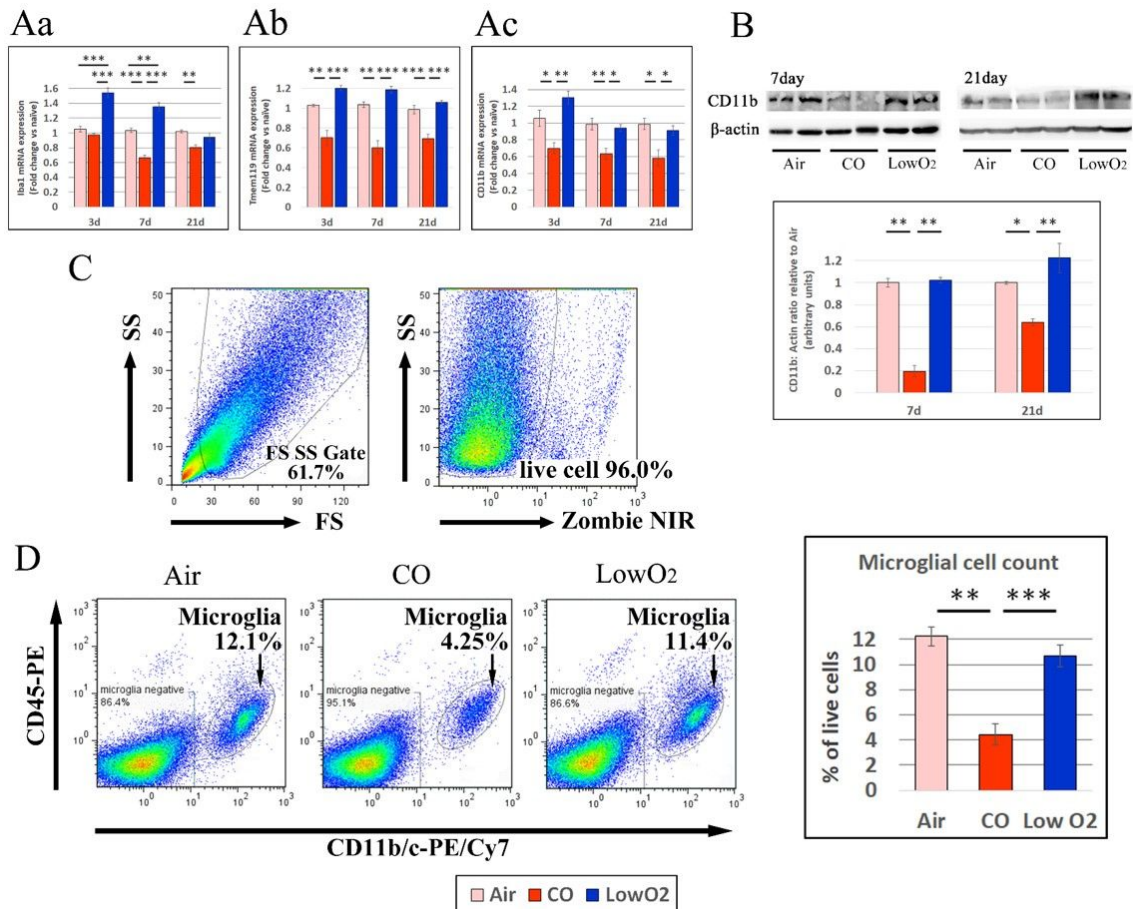


Figure 3 : 海馬におけるマイクログリアの mRNA およびタンパク発現変化および数的変化

我々のデータでは過去の報告とは全く真逆のデータが得られた。全てのマーカーにおいて、mRNA の発現は CO 群では Air 群や LowO2 群と比較して有意に減少していた (Figure 3Aa, Ab, Ac)。CD11b はタンパクレベルでも同様の結果であった (Figure 3B)。さらにそれぞれの群で吸入後 1 週間での海馬における生存細胞のうちマイクログリアの占める割合を、フローサイトメ

トリーを用いて観察したところ、CO群でのみ有意にその割合は減少していた (Figure 3C, D)。これらの結果から、CO暴露後においてマイクログリアは活性化するのではなく、むしろ減少している可能性が示唆された。

そこで、マイクログリアや神経の状態を免疫組織化学により形態学的な観察を行った (Figure 4)。Air群と比べ、CO群におけるマイクログリア (赤: CD11b) はその樹状突起がちぎれ、数も減少していた。一方で、LowO2群のマイクログリアは、細胞体が大きく、樹状突起が短く、活性化していた。また、ミエリンの前駆体である OPCs (緑: NG2) も mRNA や WB のデータ同様、CO群では減少していた。さらに、神経細胞 (紫: NeuN) は CO群も LowO2群もともに傷害を受け、歯状回の神経細胞の配列が乱れていた。これらのことから、CO中毒時には低酸素暴露時と同様に神経細胞に対する傷害が認められるだけではなく、マイクログリア、ミエリン、ミエリンの前駆細胞への傷害も同時に認められることが分かった。

マイクログリアの主な機能の一つに神経栄養因子の産生といった働きがあるが、マイクログリアの減少によってそれら神経栄養因子の産生にどのような影響があるか検討した。我々は、マイクログリアが産生するとされる神経栄養因子である Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)、Insulin-like growth factor 2 (IGF-2)、Hepatocyte growth factor (HGF)、Fibroblast growth factors 2 (FGF-2)、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、Platelet-derived growth factor-AA (PDGF-AA) の海馬組織における発現変化を確認した。それらの全ての mRNA は CO群で有意に減少していた (Figure

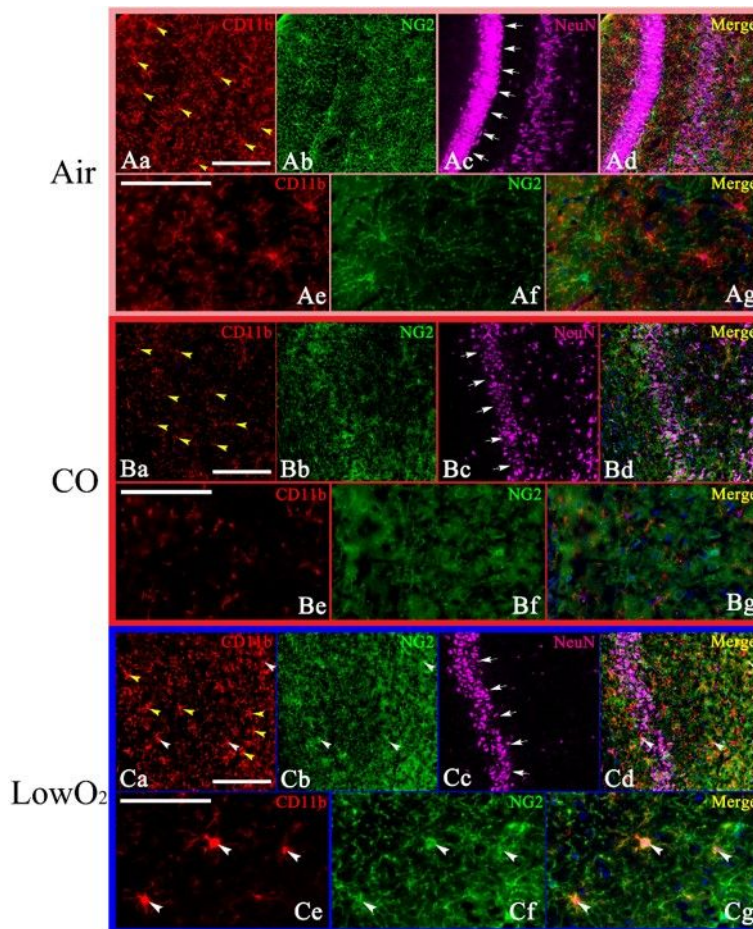


Figure 4 : 暴露後 1 週間における、海馬歯状回のマイクログリア、ミエリンおよび神経の形態学的変

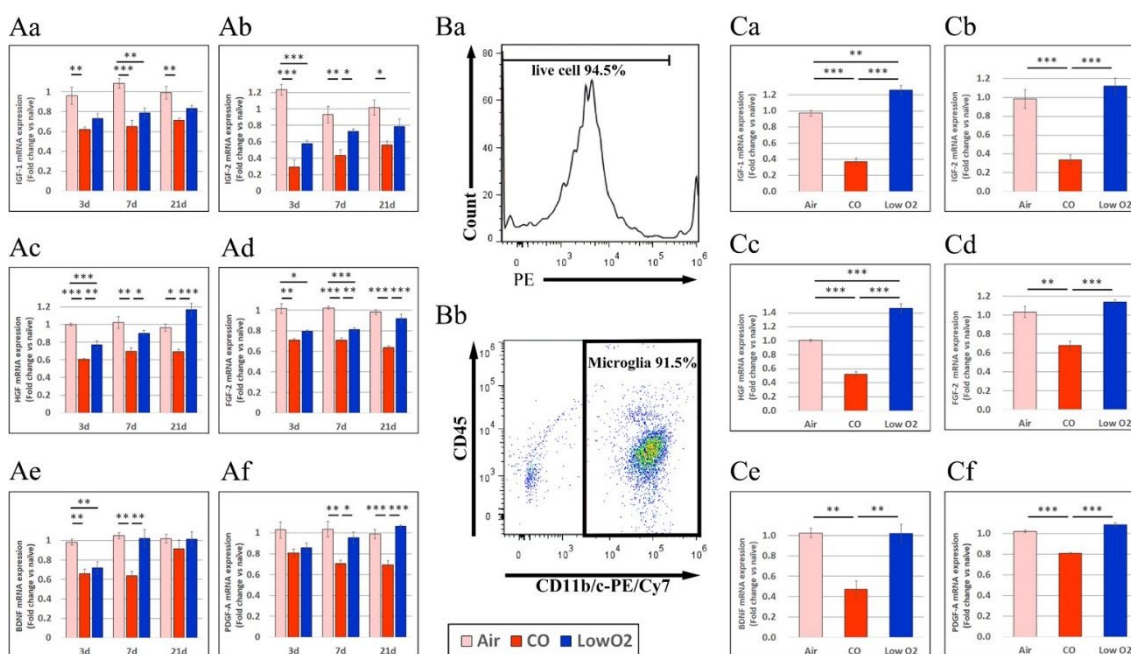


Figure 5 : 海馬における神経栄養因子の変化および海馬マイクログリアの神経栄養因子産生の変化

3A)。さらに、それらの mRNA の減少が海馬組織においてマイクログリアによる産生減少に起因するものかどうかを確認するため、海馬組織よりマイクログリアのみをマグネットビーズを用いた免疫沈降により単離し、マイクログリアにおける神経栄養因子の発現変化を確認した。マイクログリア単離の際の純度はフローサイトトリーにより確認した (Figure 3Ba, b)。マイクログリアによる神経栄養因子の発現は、海馬組織での発現変化と同様に CO 群でのみ有意な減少が認められた (Figure 3C)。さらに、IGF-1 および HGF に関しては、LowO2 群では Air 群と比較して有意な発現の増加が認められた (Figure 3Ca, c)。これらの結果から海馬組織における神経栄養因子の CO 群における有意な発現減少は、海馬マイクログリアによる発現減少が一因となっていることが示唆され、さらに、LowO2 暴露では CO 暴露とは異なり、神経栄養因子の発現減少が見られないことが分かった。

以上のデータより、これまでに報告されたマイクログリアの活性化は CO 中毒では認められず、低酸素暴露の方が活性化状態を引き起こす可能性が示された。CO 中毒は純粋な低酸素暴露と比較して神経細胞への傷害だけではなく、ミエリンの傷害やそれらの前駆細胞の傷害、また、マイクログリアの傷害が著しいことが示唆された。マイクログリアの減少は神経栄養因子の減少へとつながることが示唆され、このことが遅発性脳症の発症と関与するのかもしれない。

参考文献

Thom, S.R., Bhopale, V.M., Fisher, D., Zhang, J., Gimotty, P., 2004. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 13660-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Sekiya K, Nishihara T, Abe N, Konishi A, Nandate H, Hamada T, Ikemune K, Takasaki Y, Tanaka J, Asano M, Yorozuya T	4. 巻 1710
2. 論文標題 Carbon monoxide poisonin-induced delayed encephalopathy accompanies decreased microglial cell numbers: Distinctive pathophysiological features from hypoxemia-induced brain damage cellNumbers:Distinctive pathophysiological features from hypoxemi-induced brain damage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 22-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.12.027.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keisuke Sekiya, Tasuku Nishihara, Naoki Abe, Toshihiro Yorozuya
2. 発表標題 The comparison of microglial phagocytosis between carbon monoxide poisoning and hypoxemic hypoxia
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting 2018
4. 発表年 2018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	西原 佑 (Nishihara Tasuku) (50568912)	愛媛大学・医学部附属病院・講師 (16301)	
研究協力者	関谷 慶介 (Sekiya Keisuke)	愛媛大学・医学部附属病院・助教 (16301)	