

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：87405

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16264

研究課題名(和文) サイトカインストームが主な病態とされる急性脳症の病態解明の試み

研究課題名(英文) An attempt to elucidate the pathogenesis of acute encephalopathy, in which cytokine storm is the main pathogenesis.

研究代表者

藏田 洋文 (Kurata, Hirofumi)

独立行政法人国立病院機構熊本再春荘病院(臨床研究部)・臨床研究部・医師

研究者番号：00774837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性脳症(AE)は東アジアに患者が多く、ほとんどはウイルス感染の合併症であり、サイトカインストーム型のAEが最も重症である。我々はLPS投与後に温熱処置を行うことで全身の炎症を誘導し、モデル動物の作出が可能と仮定した。生後8日齢の幼若マウスにLPSを投与し、温熱処理(HT)を行った。LPS投与後にHTを行ったところ、大脳皮質の血液脳関門(BBB)破綻が増加し、脳は小さな虚血性病変を呈した。以上の結果から、LPS投与とHTにより、サイトカインストームを主な病態とするAEの症状が発現することが示唆された。このモデルマウスは、AEの病態発生メカニズムの解明に役立つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性脳症は東アジアの小児に多くみられる予後不良な疾患である。有効な治療法は開発されておらず、その原因のひとつに、汎用されるモデル動物が存在しないことがあげられる。我々は、幼若動物に細菌の構成成分を投与し、温熱処置を加えることで脳組織の浮腫を誘発し、急性脳症患者の脳組織に類似する組織所見を得ることができた。このモデル動物は、AEの病態発生メカニズムや治療法の解明に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Acute encephalopathy (AE) is mainly reported in East Asia and, in most cases, results from pediatric viral infections. At present, Cytokine storm-induced AE is the severest among them. Here, we hypothesized that the induction of systemic inflammation using lipopolysaccharide (LPS) injection followed by hyperthermia (HT) treatment can be used to develop an animal model of AE. Postnatal eight-day-old mouse pups were injected with LPS followed by HT treatment. LPS injection followed by HT treatment increased BBB permeability in the cerebral cortex and the brains of some pups exhibited small ischemic lesions. Our results indicate that a LPS injection followed by HT treatment can produce symptoms of cytokine storm-induced AE. Thus, this mouse model can help to elucidate the pathogenetic mechanisms underlying AE.

研究分野：小児神経学

キーワード：発熱 サイトカイン 痙攣 血液脳関門 急性脳症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性脳症は、特に本邦の乳幼児に症例が多く、種々の感染症に併発し、急性期には発熱、痙攣重積、意識障害や高い死亡率を示すことがある。慢性期には知的障害やてんかんなどの重い後遺症を残すことを前垣らは報告してきたが[1,2,3]、治療法は確立されていない。研究が遅れている原因として、良いモデル動物が存在しない事が挙げられる。

急性脳症の発症原因として様々な仮説が提唱されている(図1)。AESDでは死亡率は低く(1.4%)、神経学的後遺症を残す例が多い。一方、サイトカインストームが主に病態に關与するANE、HSESでは30~50%と死亡率が高い[4]。ANE剖検脳の報告では、血液脳関門(BBB)破綻による血管原生浮腫を認めている[5]。過去には、インフルエンザウイルスと炎症性サイトカイン産生を惹起するLipopolysaccharide(LPS)の同時投与によるモデル動物が報告された[6]。しかし、病原性ウイルスを扱う事は、限られた施設において特殊な知識と経験が必要となる。また、急性脳症はインフルエンザウイルスのみならず、様々な感染症に合併するため[4]、モデル動物として最適ではない。

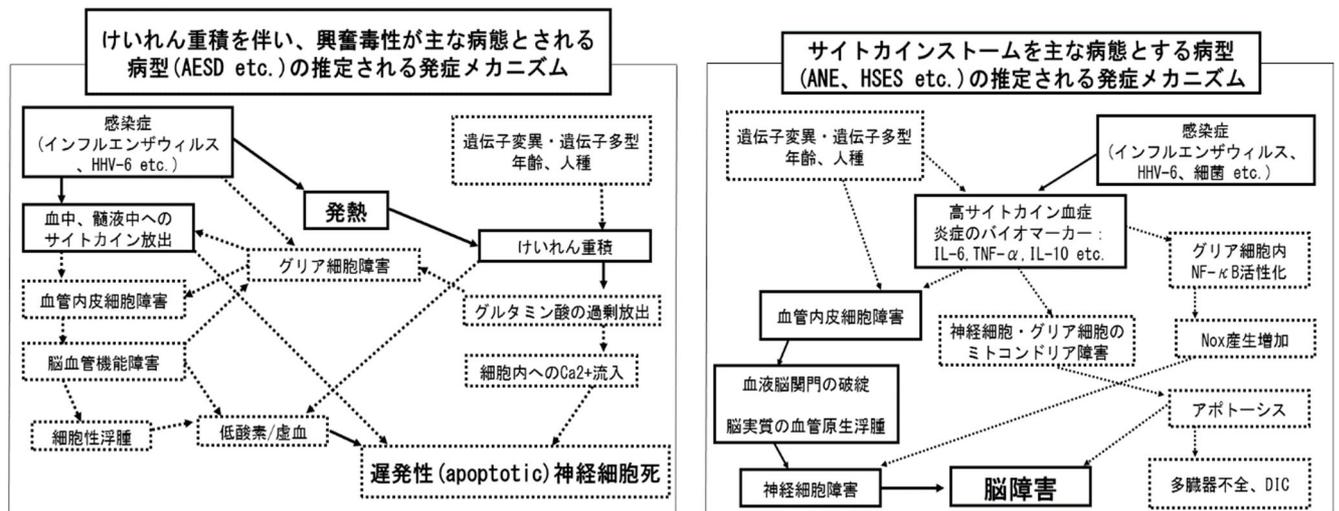


図1) 病態毎の推定される発症メカニズム : Acute necrotizing encephalopathy of childhood(ANE)、Hemorrhagic shock and encephalopathy syndrome (HSES)では感染症による炎症性サイトカインの過剰産生が起き、血管原生浮腫などから神経細胞死が惹起されるサイトカインストームが主な病態とされている(上図左)。二相性けいれんと遅発性拡散能低下を呈する急性脳症(AESD)では、発熱、痙攣重積により興奮性アミノ酸が放出され、神経細胞死に至る興奮毒性が推定されている(上図右)[4]。さらには遺伝的背景との関連も指摘されている。実線矢印と実線枠囲み文字は剖検脳組織や血液・髄液検査で確認

2. 研究の目的

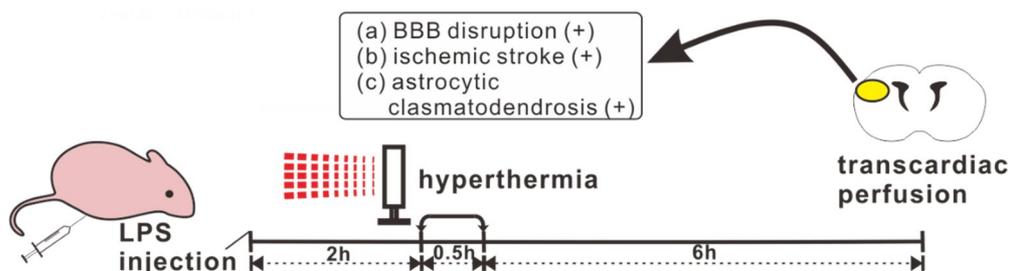
過去には急性脳症モデル動物作成の試みが報告されているが、技術的問題やヒトの症状との類似性の問題から汎用されていない。動物実験では、幼若マウスへの低用量のLipopolysaccharide(LPS)投与、または、温熱処置(HT)により炎症性サイトカイン産生が誘導されることは既に報告されている。また、幼若動物にHTを加えることで熱性けいれんを誘発する方法も汎用されている。我々は、幼若動物への低用量LPS投与とHTによる炎症性サイトカイン産生、および痙攣を誘発することで、特に予後不良とされるサイトカインストームを主な病態とする急性脳症モデル動物を作成し、モデル動物としての妥当性を検討した。

3. 研究の方法

幼若マウスに大腸菌由来LPS (50 µg/kg、100 µg/kg)を腹腔内投与し、2時間後に加温することで痙攣を誘発した。直腸温 41.5 を目標として加温し、脳組織の血管原生浮腫、血液脳関門(BBB)破綻と神経細胞死の検証のため、HTの6時間後にFITC(蛍光色素)を使用して灌流固定を行った。コントロール(CTL)、HT only、LPS100 µg/kg only、LPS50 µg/kg + HT、LPS100 µg/kg + HT(LPS100 + HT)の5群に分け、脳組織の検討を行いBBB破綻を組織学的に定量した。

4. 研究成果

LPS100 + HT 群の大脳皮質における FITC 陽性領域は、CTL 群に比して有意に増加していた。LPS100 + HT 群の皮質では、Iba1 陽性ミクログリアにおいて典型的な活性化状態の形態を示し、また、GFAP 陽性アストロサイトも典型的な反応性アストロサイトの形態を示し、一部のアストロサイトにおいて突起破壊 (clasmotodendrosis) を示していた。突起破壊を示すアストロサイトに関しては、ミクログリアによる貪食を示唆する像がみられ、さらに、主に大脳皮質において、境界明瞭な虚血と考えられる FITC 不染の領域が散見された。これらの組織所見は、ANE や HSES で報告されているヒトの脳組織所見に類似した所見であった。本モデル動物は比較的簡便に作成でき、急性脳症の病態解明と治療法の開発に寄与することが期待される。



<文献>

- [1]Maegaki Y et al. Neuropediatrics 2006;37:269-277.
- [2]Okamoto R, Maegaki Y et al. Neuropediatrics 2006;37:32-4.
- [3]Maegaki Y et al. Brain Dev 2015;37:478-86.
- [4]Hoshino A et al. Brain Dev. 2012;34:337-43.
- [5]Mizuguchi M et al. Neuroradiology. 2002;44:489-93.
- [6]Tanaka T et al. J Neurovirol. 2010;16:125-32.

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 0件）

1. 著者名 Kurata Hirofumi, Saito Kengo, Kawashima Fumiaki, Ikenari Takuya, Oguri Masayoshi, Saito Yoshiaki, Maegaki Yoshihiro, Mori Tetsuji	4. 巻 244
2. 論文標題 Developing a mouse model of acute encephalopathy using low-dose lipopolysaccharide injection and hyperthermia treatment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 743 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1535370219846497	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 Ikenari Takuya, Kurata Hirofumi, Satoh Takemasa, Hata Yoshio, Mori Tetsuji	4. 巻 425
2. 論文標題 Evaluation of Fluoro-Jade C Staining: Specificity and Application to Damaged Immature Neuronal Cells in the Normal and Injured Mouse Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 146 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.11.029	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirofumi Kurata, Kengo Saito, Fumiaki Kawashima, Takuya Ikenari, Masayoshi Oguri, Yoshiaki Saito, Yoshihiro Maegaki, Tetsuji Mori
2. 発表標題 Developing mice model of acute encephalopathy using low-dose lipopolysaccharide injection and hyperthermia treatment: a simple and convenient method
3. 学会等名 The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	前垣 義弘 (Maegaki Yoshihiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	森 徹自 (Mori Tetsuji)		