

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591688

研究課題名（和文）敗血症由来の中中枢神経障害における HMGB-1 の関与

研究課題名（英文）Role of HMGB-1 in septic encephalopathy during sepsis

研究代表者

門井 雄司 (KADOI YUJI)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：10292591

研究成果の概要：盲腸穿孔モデルによる実験的敗血症性中枢神経障害を作成し、脳神経細胞のアポトーシスの発現部位を TUNEL 染色法を用いて、HMGB-1 の発現部位については抗体法を用いて観察した。その結果、脳内においても海馬部位の CA1 と CA5 により多くのアポトーシスが発現しておりかつ同部位に HMGB-1 も多く発現していることが判明した。以上のことから HMGB-1 とアポトーシスとの関連を見だし、抗 HMGB-1 抗体を投与することで改善可能かを検討した実験では中枢神経障害が改善し、HMGB-1 が中枢神経障害に関与することを解明できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：敗血症、アポトーシス、脳障害

1. 研究開始当初の背景

細菌感染の増悪による敗血症は致命的であり、その対策は緊急な課題である。敗血症は、心、肝、腎などの臓器障害を引き起こすが、それらに劣らず中枢神経の障害は、予後と後遺症を左右する重要な問題として注目されている。

敗血症の増悪には（数時間以内）内因性マリファナ物質であるカンナビノイドが関与し、後期（発症から 12～24 時間後）には核内タンパクの一つである HMGB-1 が細胞外に流出することによって、全身に強力な炎症が誘導され、予後を左右する後期メディエータとして働くことが証明された。さらに HMGB-1

アンタゴニスト投与により敗血症由来の肺障害を改善することが近年報告された。HMGB-1はreceptor for advanced glycation end-products(RAGE)を介して細胞障害を誘発するが、その下流の細胞伝達系活性部位は不明である。

2. 研究の目的

MGB-1 アンタゴニスト投与により肺障害が改善されるとする報告はあるが、中枢神経障害の改善を検討した研究はない。また、中枢神経系における HMGB-1 の細胞内伝達系システムに関する研究も行われていない。そこで今回の研究目的は、①HMGB-1の核外放出とアポトーシスの関係を In vivo と in vitro の両方の実験系を用いて定性・定量、②HMGB-1の細胞障害メカニズムを MAP kinase 系統と Rho kinase 系統での細胞伝達系レベルで解析、③治療法の開発につながる HMGB-1 拮抗薬の効果を検討した。

3. 研究の方法

(1)Immunohistochemistry 法を用いた脳内 HMGB-1 の発現部位の決定

wistar 系 Rat(250-300g)を用いて pentobarbital 麻酔下に、盲腸穿孔モデルを作成する。24時間後にイソフルラン麻酔下に Rat 脳を4%ハラホルムアルデヒドで還流固定する。固定2時間後に Rat 脳を取り出し、クライオスタット(Leica CM1900)を使用して10 μ mの脳スライスを作成する。作成した脳スライスに ABC 法を用いた Immunohistochemistry 法で測定する。具体的には、組織片中の内因性の peroxidase をブロックするために0.3% H_2O_2 を30分間投与。Phosphate buffer solution (PBS;pH=7.4)で洗浄後、3%の normal goat serum で抗原を固定。1000 倍に希釈した1次抗体である抗

HMGB-1 抗体(シノテスト社製品)で24時間攪拌。PBS でその脳スライスを洗浄した後、Avidin-Biotin Complex(ABC kit:アマシヤム社製)を投与し発色させ1時間後に Hematoxilin で Conter 染色する。Conter 染色することで脳のどの神経細胞に HMGB-1 がより多く発現しているか観察した。

(2)脳内 Rho kinase と MAP kinase の定量

上記で作成した脳スライスに対して Immunohistochemistry 法において HMGB-1 により脳内 Rho kinase や MAP kinase は増加を確認した。HMGB-1 が多く発現する部位を取り出し、0.32M sucrose を10倍量加えた後、Polytron PT-10 型ホモジナイザー及び Potter 型ホモジナイザーを利用して、脳組織をホモジネートを実施。ホモジネートした組織は Beckman 遠心器を利用して100,000 x g, 60分でP2分画に精製分離し、Bradford 法でタンパク定量。その精製した P2 分画を利用して SDS-PAGE と Immunoblotting 法(Western Blot 法)を用いて MAP kinase の定量を行う。20 μ gに分割したP2分画を電気泳動(Boehringer-Mannheim 社製 Immune Blot Kit)に流して MAP kinase を分離し、それを Nitrocellulose 膜に転写。200倍に希釈した1次抗体である抗 MAP kinase 抗体、Rho kinase (Sigma 社製品)を投与し、Avidin-Biotin Complex(ABC kit:アマシヤム社製)を投与し発色させた。発色した部位を Densitometry で解析した。

(3)脳内アポトーシス発現部位の解析

上記で作成した脳スライスに対して TUNEL 法を応用した染色法でアポトーシス発現部位の観察する。TdT を用いて DNA の 3' -OH 末端に FITC(fluorescein isothiocyanate)標識 dUTP を付加し、peroxidase 標識抗 FITC 抗体を結合させた後、DAB と H_2O_2 でアポトーシス細胞を褐色に染色。FITC 標識 dUTP を結合さ

せたところで、蛍光顕微鏡を用いてDNA断片化細胞を検出した。

(4) 中枢神経障害の解析

意識レベルの評価法：動物行動学的研究において用いられる、侵害刺激に対する逃避反応の疼痛閾値を測定することで意識レベルを評価した。急性侵害刺激は、(i) 熱せられた板の上に動物をおいて回避行動発現までの潜時(hot-plate test)、(ii) ガラス板の下から後肢に熱刺激を加えて回避行動発現までの潜時(paw flick test)、(iii) 熱刺激を尾に加えて回避反応を起こすまでの潜時(tail flick test)、(iv) 後肢に一定のスピードで連続的に増加する力を与えて回避反応を起こす圧力の測定(paw pressure test)、などを用いて評価した。

4. 研究成果

アポトーシスの発現部位は脳内に一様に発現していたが、その中でも海馬部位のCA1とCA5により多くのアポトーシスが発現してした。また同時に行ったHMGB-1染色においても海馬CA1とCA5にHMGB-1が多く発現していることが判明した。脳内Rho kinaseとMAP kinaseも同様に海馬CA1とCA5にHMGB-1が多く発現していた。抗HMGB-1抗体を投与したところ中枢神経障害が改善し、HMGB-1が中枢神経障害に関与することを解明できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

①Avila MA, Sell SL, Kadoi Y, Prough DS, Hellmich HL, Velasco M, Dewitt DS: L-Arginine decreases fluid-percussion injury-induced neuronal nitrotyrosine

immunoreactivity in rats.

J Cereb Blood Flow Metab.

28:1733-1741, 2008. 査読有

②Kawauchi C, Kadoi Y, Hinohara H, Fumio Kunimoto K, Saito S: Evaluation of cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with diabetes mellitus under sedative doses of propofol. J Anesthesia 22:429-434, 2008. 査読有

③ Kadoi Y, Saito S, Takahashi K: The comparative effects of sevoflurane versus isoflurane on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with previous stroke. J Anesthesia 22:135-139, 2008. 査読有

④Miyazaki M, Kadoi Y, Sudo T, Sawano Y, Shimada H. Comparative effects of propofol, landiolol and nicardipine on hemodynamic and bispectral index responses to endotracheal intubation: Prospective randomized double-blinded study. J Clinical Anesth. 20:257-262, 2008. 査読有

⑤ Kadoi Y, Hinohara H, Kunimoto F, Saito S: Effects of the cannabinoid antagonist AM281 on systemic hemodynamics and mortality rate in streptozotocin-induced diabetic rats with endotoxic shock - Comparison between non-diabetic and diabetic rats. Acta Anaesthesiol. Scand. 52:664-672, 2008. 査読有

⑥ Kadoi Y, Saito S, Kawauchi C, Hinohara H, Kunimoto F: Comparative effects of propofol versus dexmedetomidine on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with septic shock. Br. J Anesth. 100:224-229, 2008. 査読有

⑦ Kadoi Y, Saito S, Takahashi K: The comparative effects of sevoflurane versus isoflurane on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with

hypertension. Acta Anaesthesiol. Scand. 51:1382-1387, 2007. 査読有

⑧ Kadoi Y, Goto F: Sevoflurane anesthesia did not affect postoperative cognitive dysfunction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. J Anesthesia 21:330--335, 2007. 査読有

⑨ Kadoi Y, Goto F: Effects of selective inducible nitric oxide synthase inhibition on systemic hemodynamics and mortality rate on endotoxic shock in streptozotocin- induced diabetic rats. Shock 28:602-610, 2007. 査読有

⑩ Kadoi Y, Goto F: Effects of nicardipine-induced hypotension on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with diabetes mellitus under sevoflurane anesthesia. J Anesthesia 21:125-130, 2007. 査読有

⑪ Kadoi Y, Goto F: Factors associated with postoperative cognitive dysfunction in patients with cardiac surgery. Surgery Today 36:1053-1057, 2006. 査読有

⑫ Kadoi Y, Goto F: Effects of AM 281, a cannabinoid antagonist, on circulatory deterioration and cytokine production in endotoxin shock model - Comparison with norepinephrine. J Anesthesia 20:284-289, 2006. 査読有

⑬ Kadoi Y, Takahashi K, Saito S, Goto F: Effects of antihypertensive medication on left ventricular function during electroconvulsive therapy: study by transthoracic echocardiography. J Clinical Anesth. 18:441-445, 2006. 査読有

⑭ Kadoi Y, Takahashi K, Saito S, Goto F: Comparative effects of sevoflurane versus

isoflurane on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with diabetes mellitus.

Anesth. Analg. 103:168-172, 2006. 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 須藤 貴史、宮崎増美、澤野由加梨、嶋田均、門井雄司、齋藤繁. 気管挿管時の血行動態変動に対する各種薬物投与の効果の比較検討 第 55 回日本麻酔科学会総会、2008. 6. 3. 横浜

② 門井雄司、後藤文夫. ARDS患者に対するNO吸入テストは腹臥位療法の有効性を予測可能か? 第 22 回日本ショック学会総会、2007. 5. 30. 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門井 雄司 (KADOI YUJI)
群馬大学・医学部・准教授
研究者番号: 10292591