

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17417

研究課題名（和文）脳浮腫の発生機序に関与するサイトカイン・ケモカインの病態生理学的役割の解明

研究課題名（英文）Pathophysiological investigation of cytokines and chemokines playing a role in the mechanism of developing brain edema

研究代表者

尾崎 充宣（Mitsunori, OZAKI）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00760521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：水中毒は水の過剰な貯留により脳浮腫などの致命的な合併症の原因となる。本研究の目的は水中毒におけるサイトカイン・ケモカインを指標とする分子法医診断基準の確立である。今回IFN- γ とCX3CR1を介したシグナルが脳浮腫に対して保護的に機能することが明らかになったが、その分子機構については明らかに出来なかった。しかしながら水中毒においてaquaporin1、4の脈絡叢での遺伝子発現が著明変化することを見出し、aquaporin1/4比が水中毒による死亡の新しい指標となる可能性が示された。両遺伝子欠損マウスのフェノタイプは明確であるので、今後も継続して両分子の脳浮腫保護の機構を探っていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水中毒に関連する分子レベルでの法医診断基準の確立は急務であると考えられている。水中毒による脳浮腫に対してIFN- γ 、CX3CR1を介したシグナルが保護的に機能し水チャネルの遺伝子発現の変化が死亡率に影響を及ぼすことを解明した本研究は、法医学実務に応用が効く知見を提供したと考えられる。脳内での水チャネルを制御する機構は解明されていない点が多く、脳浮腫制御に関連するサイトカインを同定できた学術的意義は少なくない。また、脳浮腫の発生機序に関連するサイトカイン、ケモカインの病態生理学的役割を解明することは、脳浮腫の分子標的治療にも応用できる可能性を秘めており臨床医学分野への貢献も期待できるものである。

研究成果の概要（英文）：Water intoxication causes excessive intracellular water retention and develops crucial complication such as brain edema. The aim of the present study is to establish the diagnostic criteria related to cytokines and chemokines for water intoxication in molecular forensic medicine. In this study, it was clarified that the signal mediated by IFN- γ and CX3CR1 functions protectively against cerebral edema, but its molecular mechanism has not been clarified. However, we found that gene expression in the choroid plexus of aquaporin 1 and 4, water channels, was significantly altered in water intoxication, which suggests that the aquaporin 1/4 ratio may be a new indicator of water intoxication death. Since the phenotypes of both gene-deficient mice are clear, we plan to continue exploring the molecular mechanism of protection of cerebral edema by both molecules.

研究分野：neurosurgery

キーワード：脳浮腫 サイトカイン 水中毒 アクアポリン1

1. 研究開始当初の背景

水中毒は細胞内に水分の異常な貯留を引き起こし脳浮腫などの致命的な合併症の原因となる。本疾患は法医解剖においてもしばしば遭遇するものであり、その診断の根拠となりうる客観的な指標を確立することは重要な課題であると考えられる。そこで本研究では、まず水中毒モデルを各種 Knock-out マウスで作成することにより、水中毒による脳浮腫の発生に密接に関連するサイトカイン・ケモカインを同定、解明することを目指した。動物実験の結果をもとに脳浮腫の発生機序に関与するサイトカイン・ケモカインを同定、解明し、法医学実務への応用を目指すことを本研究の最終目的とした。

従来から脳浮腫は2つの古典的な分類、すなわち脳血管壁の透過性亢進のため、細胞外組織間隙へ血清蛋白を含む血清成分の透過を認める vasogenic type と細胞障害のため細胞膜の浸透圧調整機構の homeostasis が崩壊し、細胞内に水分の異常な貯留が起こる cytotoxic type の2つの分類が提唱されてきた。本研究はサイトカイン・ケモカインに注目することにより分子レベルで脳浮腫制御システムを解明しようと試みたものである。Geoffrey T et al. (Nature Medicine 159-163, 2000)にて提唱された水中毒モデルマウスを参考に腫瘍壊死因子 (TNF-) のレセプターである TNF-Rp55 KO マウスで作成し、予備的検討を行った。その結果より、TNF-Rp55 KO マウスでは野生型マウスに比べて死亡率が有意に高いことから、脳内における TNF- /TNF-Rp55 のシグナルが脳浮腫に対して保護的役割を有している可能性を見出した。本実験結果を発展させて脳浮腫の発生機序に関連するサイトカイン・ケモカインの病態生理学的役割の解明を研究テーマとした。

2. 研究の目的

水中毒のモデルマウスを作成することで、脳浮腫の発生機序を分子レベルで理解することを目的とした。本研究はさらに各種 KO マウスを使うことにより脳浮腫の発生に関与する各種サイトカイン・ケモカインを具体的に解明するものである。脳浮腫の病態において、KO マウスを網羅的に用いて系統的に研究を推し進めることによって、Key Player となるサイトカイン・ケモカインを見つけ出すことで、脳浮腫におけるサイトカイン・ケモカインの発現様式を分子病態生理学的に特徴付けることを試みた。さらに Key Player となるサイトカイン・ケモカインの遺伝子およびタンパク質の網羅的解析をすることにより、水中毒、脳浮腫に関する診断のための新規分子指標が見い出されることが期待され、新たな分子法医診断学の確立を目的とした。

3. 研究の方法

8 週齢雄性、野生型 (Balb/c, C57/BL/6) マウスと IFN- KO (BALB/c) および CX3CR1KO (C57BL/6) に対して、体重の 19% の DDAVP (0.4 ug/kg) を含む水を腹腔内に投与して水中毒を誘起した。水投与後死亡率の測定および経時的に脳を採取し脳浮腫率を算出した。またサンプル採取した脳を用いて分子生物学的免疫

学的解析として real time PCR 法、western blotting 法、免疫組織化学染色を行い遺伝子発現、タンパク発現を解析し、水中毒の病態形成に関わる分子を検索した。

4. 研究成果

CX3CR1 ノックアウトマウスと IFN- γ ノックアウトマウスはいずれも野生型マウスに比べて、2 時間後の死亡率は CX3CR1 ノックアウトマウス ($p < 0.0005$)、IFN- γ ノックアウトマウス ($p < 0.05$) と有意に高いという結果を示し (図 1 及び図 2)、IFN- γ と CX3CR1 を介したシグナルが脳浮腫に対して保護的に機能することが明らかであった。

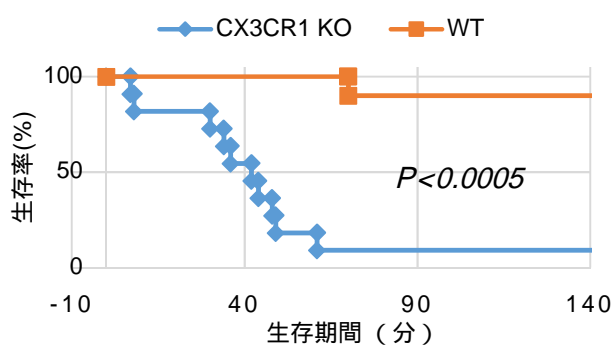


図 1 . C57/BL6 (野生型) および CX3CR1KO マウスの水投与 2 時間後までの生存曲線

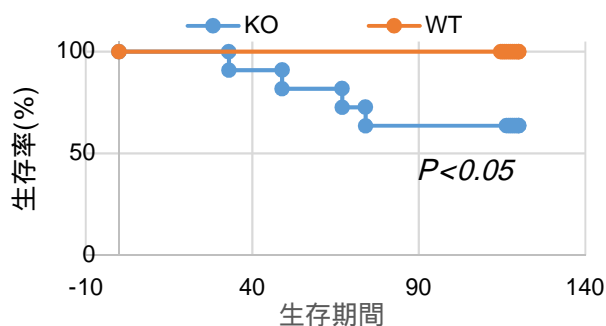


図 2 Balb/c (野生型) および IFN- γ KO マウスの水投与 2 時間後までの生存曲線

死亡の原因となる脳浮腫率 (脳組織水分含有率) は CX3CR1 ノックアウトマウスと IFN- γ ノックアウトマウスの両系統マウスで水投与後有意に上昇し、強い脳浮腫を呈し、野生型とノックアウトマウスの両方で、強い昏睡を示した。しかし、

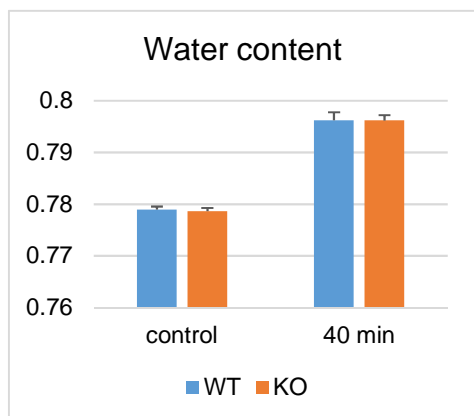


図 3 . C57/BL6 (野生型) および CX3CR1KO マウスの無処理と水投与 40 分後のマウス脳の水含有率

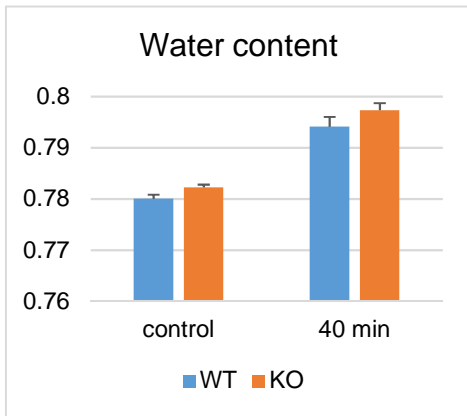


図4 . Balb/c (野生型)および IFN- γ KO マウスの無処理と水投与 40 分後のマウス脳の水含有率

両系統マウスにおいて野生型とノックアウトマウスの間に脳浮腫率の有意な差を示さなかった(図3および図4)。従って、CX3CR1 ノックアウトマウスと IFN- γ ノックアウトマウス両系統での野生型マウスとの著明な死亡率の差を脳浮腫率では説明出来なかった。よって CX3CR1 および IFN- γ の保護的機能は脳浮腫の形成抑制を介してではなく、脳浮腫により誘起される二次的病因を抑制するものと考えられた。脳浮腫の形成に直接関与する分子として aquaporin 1(Aqp1)と aquaporin 4(Aqp4)の遺伝子発現に対する水中毒の影響を CX3CR1 ノックアウトマウスと野生型マウスの全脳を試料として解析すると、図5に示す様に脳組織への水の浸透を抑制するためにコントロール群に比較して有意に発現が低下した。しかし、CX3CR1 ノックアウトマウスと野生型マウスの間で発現の有意な差を認めたのはコントロールにおける Aqp1 の遺伝子発現のみであった。

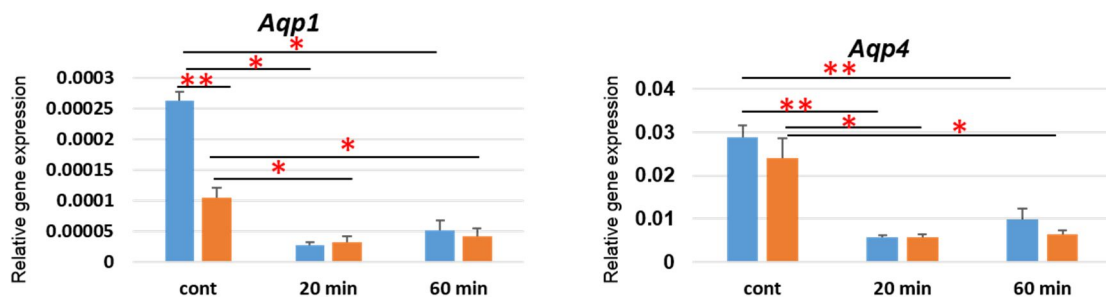


図5 . C57/BL6 (野生型)および CX3CR1KO マウスの脳における Aqp1 と Aqp4 の遺伝子発現に対する腹腔内水投与の影響 * , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$

一方、脈絡叢における Aqp1 および Aqp4 の発現は水中毒モデルではコントロール群と比べて Aqp1 の遺伝子発現が水投与後 30 分で一過性に上昇し、60 分後にはコントロールのレベルまで低下した。しかし、Aqp4 は水投与後コントロールと比較して 30 分および 60 分後ともに有意に発現が低下していた(図6)。これらのことは水中毒において、脈絡叢の Aqp 遺伝子の発現を変化させて髄液量を調整し脳浮腫の軽減を行っている可能性を示唆するものと思われる。しかし、これらの変化は野生型マウスと CX3CR1 ノックアウトマウスでともに認められ、両系統で有意な差を認めなかったことから、脈絡叢における Aqp1 および Aqp4 の発現変化は CX3CR1 ノックアウトマウスの高い死亡率と直接結びつかないものと考えられた。

本研究の法医実務への応用として、水中毒の新しい診断指標の候補として水中毒モデルにおける脈絡叢での Aqp1 と Aqp4 の遺伝子発現量の比を解析した。

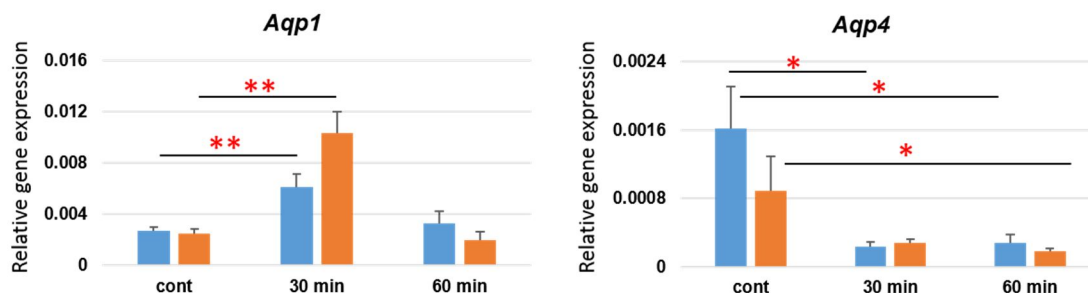


図6 .C57/BL6 (野生型)および CXCR1KO マウスの脈絡叢における Aqp1 と Aqp4 の遺伝子発現に対する腹腔内水投与の影響 * , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$

図7 に示す様に Aqp1/Aqp4 ratio は水投与 30 分後でコントロール群、60 分群に比較して有意に高く、少なくとも Aqp1/Aqp4 ratio が 20 より高い値を示すものは水中毒による死亡を強く示唆するものと思われた。

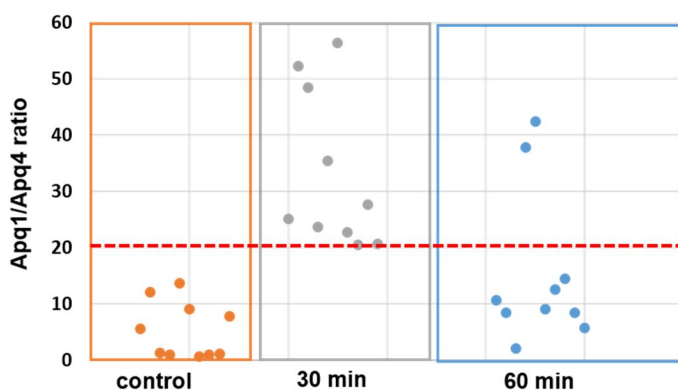


図7 . 水中毒モデルマウス(C57/BL6)の脈絡叢における Aqp1/Aqp4 ratio

当初の目的である IFN- および CX3CR1 の水中毒病態形成における意義の解明には至っていないが、CX3CR1 ノックアウトマウスと IFN- ノックアウトマウスは何れもそれぞれの野生型マウスとフェノタイプの相違は著明であることから、今後も継続して死亡率の差を説明できる分子機構を探っていく予定である。

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 2件）

1. 著者名 Mitsunori Ozaki, Kazuya Nishioka, Mari Kitayama, Takumi Kawaguchi, Naoyuki Nakao	4. 巻 Jan 71
2. 論文標題 Quantitative evaluation for cervical foraminal bony stenosis based on angled sagittal slices along a nerve root on computed tomography.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci.	6. 最初と最後の頁 89-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2019.10.009.	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 Mizuho Nosaka, Yuko Ishida, Akihiko Kimura, Yumi Kuninaka, Akira Taruya, Mitsunori Ozaki, Atushi Tanaka, Naofumi Mukaida, Toshikazu Kondo	4. 巻 Feb 7
2. 論文標題 Crucial Involvement of IL-6 in Thrombus Resolution in Mice via Macrophage Recruitment and the Induction of Proteolytic Enzymes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 10:3150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.03150.	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------