

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791751

研究課題名（和文） 活性化グリアが敗血症性脳症発症にはたす役割の解明

研究課題名（英文） Contribution of activated glia cells on the development of sepsis associated encephalopathy

研究代表者

竹下 淳 (Takeshita Jun)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：40433263

研究成果の概要（和文）：行動解析に適した敗血症モデルラット（リポポリサッカライド(LPS)腹腔投与および Cecal ligation and puncture (CLP)作成マウス）を作成し、脳組織を摘出、免疫組織化学法によりグリア細胞の活動性を評価した。また、real time PCR 法により炎症性サイトカイン mRNA の発現量を定量した。敗血症性モデル動物では、グリア細胞が活性化し、脳内により多くの炎症性サイトカインが存在することが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：

We created animal model of sepsis suitable for behavioural analysis, including rat intraperitoneally injected lipopolysaccharide (LPS) and mouse treated with Cecal ligation and puncture (CLP). Brain tissue was taken from animals and performed immunohistochemistry to investigate activation of glial cells during sepsis. In addition, expression level of cytokine mRNA was quantified by real time PCR. In septic animals, glial cells were found to be activated and the amount of pro-inflammatory cytokines increased in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学、敗血症

1. 研究開始当初の背景

敗血症患者に中枢神経症状が認められることはまれではない。急性期には見当識障害・せん妄症状が、慢性期または回復期には記録

力低下などの症状が認められるという報告がある。

敗血症に合併するこれら中枢神経障害症状は Sepsis associated encephalopathy（敗血症性脳症）と総称され、生命予後の不良因子

であること、障害からの回復に長い時間を要したり、症状固定により社会復帰の妨げになったりすることなどから、正確な診断と適切な治療法を確立することが重要な課題となっている。

我々は、炎症性サイトカインの一種 High Mobility Group Box-1 (HMGB-1)に注目し、大腸菌毒素 LPS による急性肺障害の発症に HMGB-1 が重要な役割を担っていること、HMGB-1 の中和抗体が急性肺障害を軽減し、敗血症に対する治療効果があることなどを示してきた(Ueno H, et al Am J Respir Crit Care Med. 170:1310-6. 2004)。このように、敗血症に伴って過剰に誘導された炎症性サイトカインが遠隔臓器に対して細胞毒性を示すことで、敗血症時の臓器不全が増悪することが知られている。

神経損傷や多発性硬化症の際にグリア細胞が活性化することが知られている。我々は、末梢神経炎モデルにおいて、炎症性サイトカインの影響下に活性化したグリア細胞が新たにサイトカインを合成することで炎症性神経疾患を誘発・増悪させるモデルを提示し(Amaya F, et al Pain. 142:59-67. 2009)、末梢神経炎により誘導される HMGB-1 が痛覚過敏など末梢神経損傷に伴う神経症状を引き起こすことを示した(Shibasaki M, et al Pain. 149:514-521. 2010)。しかしながら、敗血症により誘導される炎症性サイトカインがグリア細胞の活性化にどのような影響を与え、敗血症性脳症の病態にどのように関連しているのか、その詳細は知られていない。

2. 研究の目的

(1)敗血症モデル動物における行動解析

敗血症の pre-clinical モデルである Cecal ligation and puncture (CLP) マウスやリポポリサッカライド(LPS)腹腔内投与ラットを作成し、これらの動物が神経症状を呈するかどうかを行動解析実験により明らかにする。

(2)敗血症モデル動物の脳組織におけるグリア細胞の検出

モデル動物の脳を摘出し、免疫組織化学法によってグリア細胞の活性化が生じているかどうかを検討する。

(3)敗血症モデル動物の脳組織における炎症性サイトカインの検出

モデル動物から摘出した脳組織を用いて、免疫組織化学ならびにリアルタイム PCR 法を用いて炎症性サイトカインの発現変化を解析する。

3. 研究の方法

(1)モデル動物の作成

1. CLP マウス

従来報告されていた作成法による CLP マウスは致死率が 40-50%程度であり、薬剤投与などの介入による生存率の改善効果をみるには有用だが行動解析の結果を評価するには適さない。われわれは、消化管の損傷をより軽度にすることで致死率を低下させることができるのではないかと考えた。

マウスを全身麻酔下に開腹し、盲腸を同定、従来は 20G 針にて 2 回穿刺する処置と 22G で 1 回穿刺する処置を行い、それぞれの生存率を比較した。

2. LPS 処置ラット

LPS の効果は用量依存性を有する。我々は LPS の全身投与が神経系に及ぼす影響を行動解析する上で最適な LPS の容量を決定するため、異なる LPS を腹腔内に投与し、ラットの致死率と痛覚に対する逃避行動の変化を観察した。痛覚刺激は von frey フィラメントによる機械刺激と radiant heat による熱刺激を選択した。

全身麻酔下にラット腹腔内に LPS (5, 10, 25mg/匹) を投与、一週間の観察期間中、痛覚刺激を適宜与え、その反応を観察した。

(2) 脳の摘出と標本の作製

ラットおよびマウスはイソフルランによる深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定した後、脳を摘出した。摘出した脳は 20%シュクロースに 2 日間浸漬させ、ドライアイスにて凍結、クライオスタットを用いて厚さ 20 μ m の組織切片を作成した。作成した切片は -70 $^{\circ}$ C にて保存した。

(3) 免疫組織化学

作成した脳切片に対して、マイクログリアの選択的マーカーである OX42 抗体ならびにアストロサイトの選択的マーカーである GFAP 抗体を用いて免疫組織化学を行った。

切片を 0.1M PBS にて洗浄、1 時間のブロッキング処置の後、OX42 抗体 (1:1000) および GFAP 抗体 (1:1000) を含む溶液と反応させた。反応は 4 $^{\circ}$ C にて 12 時間行った。PBS による洗浄のち、ビオチン化二次抗体、アビジン・ビオチン複合体による反応を行い、ジアミノベンジジンによって目的とするタンパクを可視化した。免疫組織化学が終了した後、カバーガラスを用いて封入し、光学顕微鏡にて観察した。

炎症性サイトカインの脳内局在を調査するため、GFAP と IL-1beta の二重染色を行った。抗 GFAP 抗体と抗 IL-1 抗体 (1:1000) による反応の後、蛍光標識された二次抗体を反応させ GFAP と IL-1beta の両者を同一切片上において可視化させた。シグナルは蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(4) 脳組織からの mRNA 抽出

ラットおよびマウスより摘出した脳組織をホモジネートし、trizol 試薬を用いて mRNA を抽出した。逆転写酵素を用いて抽出した mRNA から相補的 DNA (cDNA) を作成した。

(5) リアルタイム PCR 法

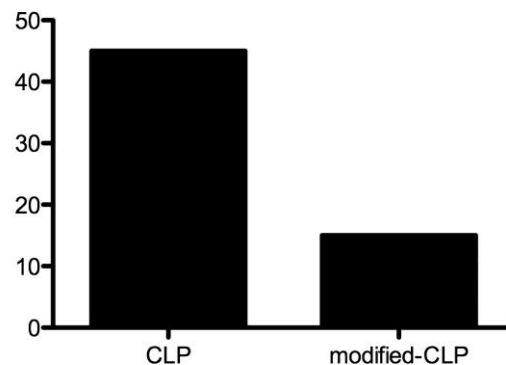
cDNA の中に含まれる炎症性サイトカイン遺伝子の定量はアプライドバイオシステム社の定量的 PCR 装置を用い、CYBR green 法により行った。炎症性サイトカインとして IL-1 beta、TNF- α 、HMGB-1 の遺伝子発現量を測定した。内因性コントロールとして beta-actin を用いた。

4. 研究成果

(1) モデル動物

1. CLP マウス

20G で 2 回穿刺した CLP マウスの致死率が 45%

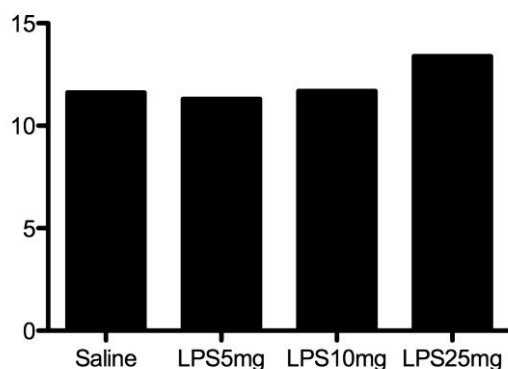


CLP マウスの 3 日後生存率 (%)

であったのに対して、22G で 1 回穿刺したマウスでは致死率が 10%まで減少した。

2. LPS 処置ラット

LPS を 25mg 投与したラットの 3 日後死亡率は 75%となり、行動解析には適さないことが判明した。一方、5mg、10mg を投与したラットでは、痛覚刺激に対する反応性は LPS を投与しない群とほぼ同等であり、痛覚反射に異常な点は認めなかった。



LPS ラットの熱刺激への反応時間 (秒)

(2) 脳内グリア細胞の同定

モデル動物の脳組織において OX42 陽性細胞および GFAP 陽性細胞を認めた。コントロール群に比べて両者の発現量は増加する傾向を認めた。

(3) 炎症性サイトカイン発現の検討

リアルタイム PCR による炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を定量下結果、IL-1beta、TNFalpha、HMGB-1 いずれもモデル動物で増加する傾向を認めた。炎症性サイトカイン mRNA の発現量は個体間のばらつきが大きいため定量的な群間比較には至っていない。

蛍光二重染色の結果、IL-1beta の多くは GFAP 陽性細胞に発現が認められた。

(4) 結果のまとめ

以上の研究結果から、CLP モデルマウス、LPS 処置ラットの両者において、脳内グリア細胞が活性化する傾向にあることが明らかにされた。また、グリア細胞が活性化する結果として、脳内において炎症性サイトカインが合成されている可能性が示唆された。今後、脳内サイトカイン増加と敗血症性脳症の関連について、行動解析を用いて検討する必要があると考える。

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 1 件)

- ① 竹下淳、中嶋康文、中山力恒、安本寛章、柴崎雅志、溝部俊樹、人工心肺離脱時の僧帽弁前尖収縮期前方運動 (SAM) に対し異なった治療を施行した 2 症例、Cardiovascular Anesthesia、査読有、15 巻、2011、195-198

[学会発表] (計 2 件)

- ① 竹下淳、天谷文昌、橋本壮志、橋本悟、佐和貞治. 心臓手術後の心房細動発症抑制に対する塩酸ランジオロール少量持続投与の有用性. 日本集中治療医学会. 2011 年 2 月 24 日
- ② 竹下淳、中嶋康文、松田愛、安本寛章、中山力恒、柴崎雅志、溝部俊樹、橋本悟. 人工心肺離脱時に僧帽弁前尖収縮期前方運動 (SAM) をみとめた 2 症例. 日本心臓血管麻酔学会. 2010 年 10 月 10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 淳 (Jun Takeshita)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻
医

研究者番号：40433263