

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592266

研究課題名(和文)敗血症性脳症誘発機序の基礎的解明

研究課題名(英文)Basic analysis for the mechanisms of septic encephalopathy

研究代表者

内野 博之(Uchino, Hiroyuki)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60266476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症性脳症(Septic Encephalopathy:SE)発生機序解明のためにミトコンドリア機能不全に焦点を当て解析を展開した。23年度はSE作成24時間後にCa<sup>2+</sup>負荷による脳ミトコンドリアのswellingが起こりやすいことが判明した。24年度はミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取りこみ能(Calcium Retention Capacity:CR)を解析しSE作成1,6,12,24時間後のCRの低下が判明し、25年度はミトコンドリア呼吸能(Respiratory Control Ratio:RCR)にSEが及ぼす影響を解析しSE作成12,24時間後のRCRは有意な低下を認めた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanisms of septic Encephalopathy(SE), we focused on the mitochondrial dysfunction. First year, The swelling assay suggested that brain has showed significant swelling due to Ca<sup>2+</sup> loading compared to control(control vs 1,6,12,24h, p<0.05). Second year, Calcium Retention Capacity. Sepsis significantly inhibited the CR according to the recovery time(control vs 1,6,12,24h, p<0.05). Last year, we have investigated the mitochondrial respiratory control ratio(RCR) due to Clark electrode assay. RCR was strongly reduced according to the recovery time. Especially, 12 and 24h after recovery, CLP group showed significant reduction of RCR compare to control(P<0.05). Septic encephalopathy showed the inhibition of mitochondrial function.

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：敗血症性脳症状 ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup> CR RCR swelling

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、我々のこれまでの虚血性神経細胞死のメカニズム解析の研究結果を基盤として、SEの脳障害発症機序を従来の神経細胞障害のみに着目した解析から、末梢循環不全 (microcirculation dysfunction) に伴う組織低酸素 (Edul 等 2010) と神経細胞のみでなくグリア細胞までも包含した Mitochondrial Permeability Transition (以後 MPT) を考慮したミトコンドリア機能不全に焦点を置き、SEの実態を MPT との連関解析に応用展開することを目的とした。この試みは、SEのメカニズムに新しい解釈を加えるものであり、この解釈を基にして、新規の防御法を開発し、麻酔科学・蘇生学・神経集中治療医学領域での安全性と信頼性を高めることを目指した。

## 2. 研究の目的

敗血症は、感染した微生物およびその毒素の全身への波及により全身に激しい炎症反応を惹起した病態で、そのメカニズムは、炎症性サイトカイン等の多くの共通の炎症性メディエータを介して生ずるためと理解されており、これらの全身性の炎症反応に対し、全身性炎症反応症候群 (systemic inflammatory response syndrome : SIRS) という概念が提唱された。敗血症 (sepsis) とは感染が原因となって SIRS の項目のうちの2つ以上を満たす症状を呈した病態で、敗血症のうち臓器障害、乳酸アシドーシス・意識障害などの臓器血液同流低下、または低血圧を伴うものを“重症敗血症 (severe sepsis)”と定義している。臓器障害などを合併した重症敗血症症例の死亡率は高く、30-40%という報告がなされ、敗血症性ショックに伴う循環不全と種々の要因によって進行する多臓器障害 (Multiple organ dysfunction syndrome : MODS) が主な死因となる。敗血症における MODS では、呼吸器、肝臓、腎臓、中枢神経系、心血管系や線溶凝

固系障害などを認め、3臓器以上の機能障害を合併した患者の死亡率は60-80%と特に高い。MODSは、末梢組織・細胞での酸素代謝異常とも定義され、細胞レベルでの酸素代謝解析が必要とされ、微小循環障害 (Microcirculation Dysfunction: MD) とも呼ばれており、組織の低酸素が懸念され、microcirculation を担うミトコンドリアにおける酸素代謝に主眼を置いた解析が必要とされる。MODSの中でも、SEは、多臓器不全の前に出現する「早期脳症」と多臓器不全に伴う「後期脳症」に分類されている。SEの発症率は、7-80%と報告によって差がある。SEの発症機序は、白血球が炎症性メディエーターやO<sub>2</sub>-ラジカルを産生 分子鎖アミノ酸・芳香族アミノ酸不均衡 偽神経伝達物質の増加 フリーラジカル 血液脳関門の破綻 脳血流の変化と脳自動調節能の障害などが中枢神経に作用し、脳障害を惹起するという説が提唱されているがいまだ明確ではない。腹膜炎性敗血症モデル (CLPモデル) 関連脳症 (Septic associated Encephalopathy: SAE) での脳内 apoptosis の発現と caspase の活性化が報告され、本病態とミトコンドリア機能不全との関連が指摘されているが詳細は明らかではない。研究代表者らは、これまでの虚血性神経細胞死のメカニズム解析実験の中で免疫抑制剤であるシクロスポリン A (CsA) の強力な抗虚血作用の解析結果から虚血性神経細胞死が細胞内脱リン酸化酵素のカルシニューリンの活性化とミトコンドリア特異的に発現しているシクロフィリン D (CypD) を介した MPT に伴うミトコンドリア機能不全が原因となることを見出した (Uchino et. al 2002)。連携研究者の芝崎等は、Int6-siRNA 発現ベクターの実験から preliminary に得られた血管新生と脳保護作用に着目し、低酸素によって誘導される反応に関与する遺伝子の中の転写因子 HIF (hypoxia

inducible factor ; 低酸素反応性因子)の重要性を見出した (Chen et. al 2007)。一方で、SEにおける組織酸素代謝異常を伴うMDを反映しうるミトコンドリア機能と低酸素を反映しうるHIFとの関係解析ならびにSEとMPTの連関は全く手付かずの状態、早急な解明が必要であるため、本研究では、虚血性神経細胞死解析実験で蓄積されたミトコンドリア機能不全に対する成果を新規脳保護法確立を要するSEのメカニズム解析に展開し、SEの実態をMPTとInt6・HIF2 $\alpha$ 情報伝達系との連関解析から明確にし、未知の病態であるSEに対する新規の防御法開発を目的とするという研究着想に至った。

### 3. 研究の方法

#### (1)平成23年度研究計画

**敗血症性脳症誘発時の脳内での経時的なHIF2 $\alpha$ 発現の分布、局在と脳血流の経時的変動解析**(内野が敗血症性脳症モデル作製を行い、濱田、金子が免疫染色を担当し、免疫組織化学的解析を内野と芝崎等が行う。)第8-10週令の雄性Wister rat(体重250-300g)を用いて回盲部結紮+2回穿刺による(CLP)誘発敗血症性脳症モデル(SAEモデル)を作製する。モデル作製1、6、12時間後、1、2日後(各時間とも5匹の動物を使用)に脳の凍結切片(25 $\mu$ m)を作製し、HIF2 $\alpha$ を用いた免疫組織化学的解析を施行し、脳における低酸素に伴う脳性因子(BDNF)の発現や分布の相違を比較を試みた。また、レーザードップラー血流計を用いて大脳皮質の血流(測定位置:Bregma 3.5mm 後方、4.5mm 側方)を同じ解析時間に脳を取り出す前に測定を試みた。さらに、脳切片をGFAPやNeuにて二重染色を行い、両因子の発現が神経由来かグリア由来かを特徴付け、SEが脳内Int6・HIF2 $\alpha$ 情報伝達系および脳循環に及ぼす影響を解析を試みた。

**敗血症性脳症誘発とMPTを介した脳内ミトコンドリア機能不全の連関解析**(研究代表者の内野がミトコンドリア抽出を行い、

Eskil等が実験を補助する。また、濱田、金子がswelling測定を行う。)敗血症性脳症とMPTを介したミトコンドリア機能不全との連関解析のために、第8-10週令の雄性Wister rat(体重250-300g)にてSAEモデルを作製し、SAEモデル作製1、6、12、24時間後(各時間・両群とも5匹のラットを使用)に脳ミトコンドリアを抽出してCa<sup>2+</sup>overloadをin vitroにて作り出し、ミトコンドリアの膨化(swelling)を計測、解析比較する。ラット大脳皮質からParcol法でミトコンドリア分画を抽出し蛋白定量後、25 $\mu$ g/mlのミトコンドリアをKCl bufferに加えてCaCl<sub>2</sub>(0-10 $\mu$ mol/mgprotein)を加えて520nmでlight scatteringを行いMPTに伴うミトコンドリアの膨化率を測定しSEとMPTに伴うミトコンドリア機能不全との連関を解析した。

#### (2)平成24年度研究計画

**敗血症性脳症誘発時の脳内ミトコンドリアCalcium Retention Capacity(CRC)の変動解析**(敗血症性脳症モデル作製は内野が担当し、Eskil等が実験を補助する。ミトコンドリア抽出、CRC測定、は濱田、金子が担当する。)第8-10週令の雄性、第8-10週令の雄性Wister rat(体重250-300g)needle lesionモデルを作製し、作製1、6、12、24時間後に脳内ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取りこみ能を測定し脳機能の観点から検討を行う(各時間・各群毎3匹ずつの動物を使用)。大脳皮質を取り出して、Isolation Bufferにてhomogenize後に40、26、12%の濃度の異なるParcolを重層した溶液にhomogenizeを重層して、3回の超遠心後ミトコンドリアを分離する。蛋白定量後、300 $\mu$ gのミトコンドリア蛋白を用いて解析を行う。200mMATPと50mMADPおよび1mg/mlのオリゴマイシンをミトコンドリア懸濁液に加える。ミトコンドリアのCa<sup>2+</sup>取りこみ(Calcium Retention Capacity: CRC)は、200nmolCaCl<sub>2</sub>を10mM/分で持続投与し、蛍光色素のFura6Fを懸濁液に加え509nmで励起して測定を行い、SEが脳内ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>取りこみ能とMPTに

与える影響を解析し、SE と MPT に伴うミトコンドリア機能不全との連関を CRC に焦点を当てて評価した。

### (3)平成 25 年度研究計画

**敗血症性脳症誘発時の脳内ミトコンドリア呼吸能の変動解析**(敗血症性脳症モデル作製は内野が担当し、Eskil 等が実験を補助する。ミトコンドリア抽出、RCR 測定は濱田、金子が担当する。)

第 8 10 週令の雄性 Wister rat (体重 250-300g)を用いて SAE モデルを作製し、モデル作製 1、6、12、24、48 時間後に脳内ミトコンドリアの呼吸能を測定し脳機能の観点から検討を行う(各群毎 3 匹ずつの動物を使用: 対照は同数の sham 手術群を用いる)。大脳皮質を取り出して、諸田等の方法(Morota et.al J Neuro Chem 2007)に準じて Isolation Buffer にて homogenize 後に 40,26,12%の濃度の異なる Percoll を重層した溶液に重層して 3 回の超遠心後ミトコンドリアを分離する。蛋白定量後、25  $\mu$ g/ml のミトコンドリアを KCLbuffer に加えてクラーク酸素電極を用いてミトコンドリアの呼吸基質である 5mM マレイン酸とグルタミン酸を加えた後 200 $\mu$ MADP 添加して酸素消費量を ADP 添加前 (state3)と添加後 (state4)で計測して両者の比として Respiratory Control Ratio(RCR)を計算し、SE が脳内ミトコンドリア呼吸能に与える影響を解析した。

#### 4. 研究成果

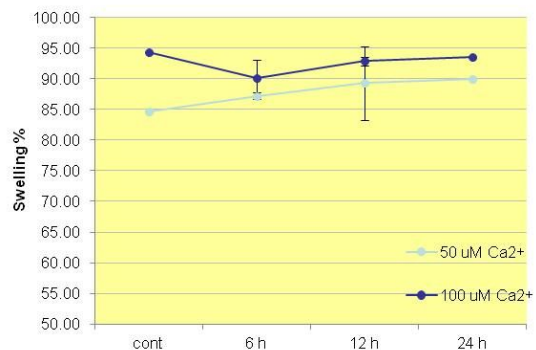
##### (1)平成 23 年度研究成果

経時的な HIF2 $\alpha$  発現の分布、局在と脳血流の経時的変動解析では、SE 発症における脳内の Int6・HIF2 情報伝達系の役割、脳血流の変動 Int6 発現が SE による apoptosis・necrosis と神経栄養因子(BDNF)発現に及ぼす影響を解析したが、CLP モデルがうまく作製できなかったことが影響し、脳血流測定の結果がばらつきが多く有効なデータが得られなかったまた、と免疫染色に用いた抗体がうまく作用せず HIF や

BDNF の変動に於いて明らかな結果を見いだせなかった。

Ca<sup>2+</sup>verload による MPT に伴うミトコンドリアの膨化率を測定し、SE と MPT に伴うミトコンドリア機能不全との連関を解析した。Ca<sup>2+</sup>負荷によるミトコンドリアの膨化率解析の結果は、50mM Ca<sup>2+</sup>において cont:84.7%,6h:87.2  $\pm$  0.6%、12h:89.3  $\pm$  6.0%、24h:90%、100mM Ca<sup>2+</sup>において cont:94.3%、6h:90  $\pm$  3.0%、12h:93  $\pm$  1.0%、24h:94%であった(下図)。

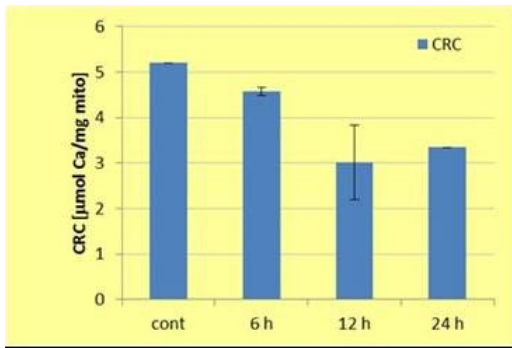
SAE モデルでは、24 時間後に脳は浮腫状となっていて swelling も誘発されやすい状況であることが判明した。SAE に伴うミトコンドリアの膨化が SE 形成に重要な役割を担うことが明らかとなった。



##### (2)平成 24 年度研究成果

Ca<sup>2+</sup>overload による MPT に伴うミトコンドリアの膨化率を測定し、SE と MPT に伴うミトコンドリア機能不全との連関を解析した結果は、Control:5.2 mmol Ca/mg mito, 6h:4.6  $\pm$  0.1 mmol Ca/mg mito,12h:3.0  $\pm$  0.8 mmol Ca/mg mito,24h:3.3 mmol Ca/mg mito となり、6、12、24 時間後において有意に Ca<sup>2+</sup>取り込み能が低下していることが明らかとなった(下図)。

SAE に伴うミトコンドリアの Ca<sup>2+</sup>取り込み能が低下が SE 形成に重要な役割を担うことが明らかとなった。

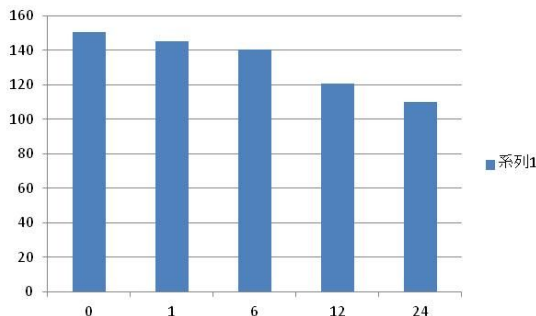


### (3)平成 25 年度研究成果

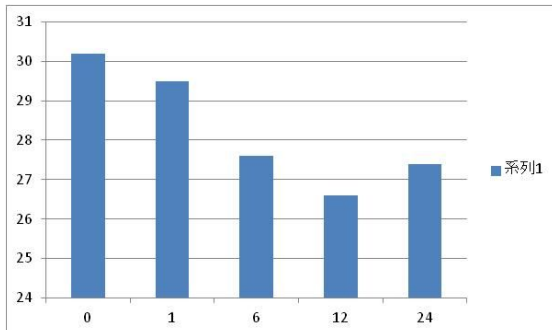
脳内ミトコンドリア呼吸能の変動解析を SAE モデル作製前 (control) 1, 6, 12, 24 時間後まで解析した。state3 はおのこの  $150.6 \pm 23.5$ ,  $145.2 \pm 25.5$ ,  $140.4 \pm 25.8$ ,  $120.9 \pm 26.2$ ,  $110.2 \pm 23.8$  (nmO<sub>2</sub>/min/mg) であった。state4 は、 $30.2 \pm 3.5$ ,  $29.5 \pm 5.8$ ,  $27.6 \pm 6.5$ ,  $26.6 \pm 7.2$ ,  $27.4 \pm 3.9$  (nmO<sub>2</sub>/min/mg)

RCR(state3/state4)は、4.9, 4.9, 4.5, 4.0 ( $p < 0.05$ )となりミトコンドリア呼吸鎖における酸化的リン酸化は経時的に低下し、ミトコンドリア機能障害が誘発されることが明らかとなった。

state3



state4



これらの研究結果から、SAE に伴う SE においては、脳ミトコンドリア機能不全が重要な役割を担うことが明らかとなった。

### 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を引く)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Cyclophilin-D inhibition in neuroprotection: dawn of a new era of mitochondrial medicine.

Uchino H, Hatakeyama K, Morota S, Tanoue T, Nishiyama T, Usui D, Taguchi C, Suzuki M, Hansson MJ, Elmér E.

Acta Neurochir Suppl. 2013;118:311-5. doi: 10.1007/978-3-7091-1434-6\_61. (査読 有)

2. Mitochondrial respiration in human viable platelets--methodology and influence of gender, age and storage.

Sjövall F, Ehinger JK, Marelsson SE, Morota S, Frostner EA, Uchino H, Lundgren J

Arnbjörnsson E, Hansson MJ, Fellman V, Elmér E. Mitochondrion. 2013 13(1):7-14 doi:

10.1016/j.mito.2012.11.001. (査読 有)

3. Int6 silencing causes induction of angiogenic factors in neuronal cells via accumulation of hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  and decreases brain damage in rats.

Miyashita R, Chen L, Oshiro H, Uchino H, Shibasaki F.

Neurosci Lett. 2012 528(1):83-8. doi: 10.1016/j.neulet.2012.08.033. (査読 有)

4. Organ protective effects of volatile anesthetics and perioperative outcomes].

Uchino H, Suzuki M, Okita A, Yuhnaiyama Y, Shibuya M, Usui D, Miyashita R, Hatakeyama K, Masui. 2012 61(5):478-95. Review. Japanese. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22702090> (査読 有)

5. Cyclophilin D-sensitive mitochondrial permeability transition in adult human brain and liver mitochondria.

Hansson MJ, Morota S, Chen L, Matsuyama N, Suzuki Y, Nakajima S, Tanoue T, Omi A, Shibasaki F, Shimazu M, Ikeda Y, Uchino H, Elmér E.

J Neurotrauma. 2011 28(1):143-53. (査読 有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22702090>

6. 分子生物学的観点から脳蘇生・脳保護を考  
える

**内野 博之**, 田上 正, 安藤 千尋, 富野 美

紀子, 岩瀬 直人, 古川 雄一, 本間 豊彦,

近江 明文, 畑山 聖

脳死・脳蘇生 123 巻 2 号 Page49-59 2011 (査  
読 有)

[http://search.jamas.or.jp/index.php?format=detail  
&pp=30&uid=115&nocert=on&module=Advanced  
&action=DetailOne&sid=268435459&change  
\\_f=on&nocert=on](http://search.jamas.or.jp/index.php?format=detail&pp=30&uid=115&nocert=on&module=Advanced&action=DetailOne&sid=268435459&change_f=on&nocert=on)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. **内野 博之**

教育講演

神経集中治療における脳保護を考える

第 41 回日本集中治療医学会

2014 年 2 月 28 日 京都

2. **内野 博之**

教育講演

分子生物学的観点からみた脳保護・脳蘇生

第 40 回日本集中治療医学会 松本

2013 年 2 月 28 日

3. **内野 博之**

招請講演

麻酔薬の脳虚血に対する保護効果

第 32 回日本臨床麻酔学会

2012 年 11 月 3 日 福島

4. **内野 博之**

シンポジウム

脳低体温療法とその周辺 脳虚血のメカニズ  
ム

第 31 回日本蘇生学会

2012 年 11 月 23 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 【sepsis・SIRS-いま生かす!最新の病態把握

に基づく適切な診療へ-】 sepsis の急性期治

療 循環管理の目標とカテコラミンの使い

分け(Q&A/特集)

宮田 和人, **内野 博之**

救急・集中治療(1346-0935)24 巻 9-10

Page1108-11132012、2012 年 総合医学社

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内野博之 (Uchino, Hiroyuki )

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60266476

(2) 研究分担者

濱田 隆太 (Hamada, Ryuta )

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20459572

金子 恒樹 (Kaneko, Kohki )

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40617536

(3) 連携研究者

芝崎 太 (Shibasaki, Futoshi )

(財) 東京都医学研究機構・東京都臨床医

学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 90300954