

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592687

研究課題名(和文)敗血症に伴う重症末梢神経炎の発生病序の解明と活性化第X因子阻害薬の保護効果の検討

研究課題名(英文) Study on the mechanisms of pathogenesis of critical illness polyneuropathy and protective effect of activated factor X.

研究代表者

日野 博文(HINO, Hirofumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70308500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症誘発重症末梢神経炎モデルを作成し、電位依存性Na受容体サブタイプ(Nav)8種の発現量をRT-PCR法にて測定した。また、このNavの発現異常に対する薬剤X、Yの効果を検討した。当該モデルでは、発現量低下、発現量増加と6種のNavで変動を認めた。以上の結果より、当該モデルの急性期にはNa受容体におけるchannelopathyが生じていることが推測される。しかしながら、本病態に関しては多種のNavが関与しており、閾値変化へのNavサブタイプ関与の正確な機序は不明である。また、薬剤X、Yの投与はこれらのNavの発現異常に影響を与えなかったことから神経伝導改善効果は別の機序によるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We measured the expression of eight kinds of voltage-dependent sodium channel receptor subtypes (Nav) of the sciatic nerve by the real-time PCR method in sepsis induced critical illness polyneuropathy rat model (L-group) and compared to the control group (C-group). We achieved the results shown the significant reductions of gene expression in three subtypes of Nav and increases in three different kinds of Nav in L-group compared to C-group. These data implied the different types of sodium channel gene expression plays an important role in the mechanisms of pathogenesis of critical illness polyneuropathy as channelopathy. Since the administration of Drug-X and/or Drug-Y did not improve the alteration in Nav gene expression, other actions of Drug-X and Drug-Y might be involved in the improvement of nerve function during sepsis.

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：敗血症 重症末梢神経炎 電位依存性Naチャンネルサブタイプ チャネルopathie

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症や全身性炎症症候群に対する様々な戦略的アプローチの結果、回復に向かう症例が増加するに従い、敗血症の急性期を乗り切った後に生じる原因不明の人工呼吸器からの離脱困難が明らかになってきた。1984年にBoltonらにより報告された敗血症に伴う重症末梢神経炎 (Critical illness polyneuropathy : CIP) は、敗血症性ショック後など全身性炎症反応症候群に合併する神経筋疾患であり、その特徴として敗血症や多臓器不全の約70%に合併し、呼吸筋麻痺のため人工呼吸器離脱困難を中心とする遠位優位の末梢神経障害であり、病理学的には運動神経優位の軸索変性を認めるものである (Bolton CF, et al : J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1984)。本疾患における社会復帰を含む予後は、決して良好ではないことから (Herridge MS, et al : N Engl J Med, 2003)、本疾患が包含する問題点は、単にICU滞在日数増加に伴う医療経済性の問題にとどまらず、患者のQOLをも左右する問題にも関わってくるため、早急な病態の解明と治療法の確立が望まれる。CIPの発生に末梢神経上の微小循環障害が関与していることが予想されているが、その詳細は現在もなお不明であり、現在まで重症末梢神経炎の発生機序や治療法を解明するための実験的アプローチはほとんどない。現在まで、報告されている研究の多くは、CIPの発生機序に関して微小循環障害やステロイド投与など単一の要因にその原因を求めている。我々は、現在までに得られた研究結果より、CIPの発症機序は、発生初期から始まる微小循環障害と発症3日以内に生じる活動電位閾値の上昇、また、中長期にわたる微小循環障害の結果生じる虚血性

神経変性が関与し、多数の要因が複雑に絡み合って発生するという点に注目してきた。この点では我々の研究の方向性は臨床像に非常に近く、他に類を見ない独創的な研究を弾力的に展開している。

ステロイド投与下除神経ラットの筋組織において活動電位の閾値の変化が生じることが報告され、その原因として異種の電位依存性Na受容体サブタイプ (Nav) の発現が指摘されている (Rich MM, et al : Neurobiol Dis, 1999)。一方、CIPの病態においては末梢神経組織における異種Nav発現の有無はいまだ明確ではない。ICU入室後72時間以内に80%の患者にCIPが発症することが報告されており (Tepper M, et al : Neth J Med, 2000)、異種Navの発現、および経時変化を明確化することにより敗血症急性期におけるCIPの発症機序の解明が可能となる。

従来、敗血症に対する薬剤X、薬剤Yの保護効果の研究の多くはその機序の解明に焦点が当てられ、微小循環レベルの検討にとどまっている。興味深いことに我々が得た知見では薬剤X、薬剤Yは重症末梢神経炎の微小循環の改善のみならず、電気生理学的神経機能を改善することが判明した。これらの改善効果の機序としてのNavに対する効果を調査することにより、薬剤X、薬剤Yの新たな効果が提示される端緒となる可能性がある。

また、近年、その存在が明らかになったプロテオグリカンと糖タンパクからなるglycocalyxは血管内皮細胞におけるバリア層として注目されており、敗血症などで増加する炎症性メディエーターにより消失し (Chappell D, et al, Anaesthetist, 2008) その結果、活性化白血球 接着因子動態や血管透過性に影響を与えることにより組織虚血を含む様々な病態に関与することが判

明してきた (Chappell D, et al, Curr Opin Anaesthesiol, 2009)。

## 2. 研究の目的

現在までの研究成果より、敗血症における重症末梢神経炎の急性期、慢性期における発生機序に関し、それぞれ活動電位閾値の上昇、神経虚血 変性が深く関与している可能性が示唆された。本研究の目的は、敗血症急性期において生じる活動電位閾値上昇の主原因と考えられる異種Nav発現を同定することである。また、敗血症急性期における神経虚血 - 変性の初期変化として考えられるglycocalyxの形態学的微細構造の変化を検討することを目的とした。加えて、薬剤X、薬剤YのNav発現およびglycocalyxに対する保護効果を調査し、薬剤X、薬剤Yの治療応用へと展開するためのより詳細な基盤を確立することである。

すなわち以下の点に焦点をしぼる。

- (1) lipopolysaccharide (LPS) 持続投与による敗血症状態ラット (敗血症誘発重症末梢神経炎ラットモデル) の末梢神経におけるNav遺伝子発現種別の特定と経時変化
- (2) 当該モデルにおけるNav遺伝子発現に対する薬剤X、薬剤Yの改善効果の検討
- (3) 当該モデルにおけるglycocalyxの形態学的特徴の観察と経時変化、および薬剤X、薬剤Yの改善効果の検討

## 3. 研究の方法

現在までの知見を基に以下の実験を行った。

- (1) 敗血症誘発重症神経炎ラットモデル作成：測定日7日前に麻酔下にてWistar系雄ラットの右外頸静脈にカテーテルを留置し実験48時間前よりLPS 3mg/kg/日を2日間投与して当該モデルを作成した。
- (2) Nav遺伝子発現分析：当該モデルにおいて

腹腔内にペントバルビタール25mg/kgを投与し、十分な麻酔を得たことを確認した後、気管切開を置き、人工呼吸を行う。同条件下において両側の坐骨神経を注意深く摘出する。坐骨神経からRNAを抽出し、cDNA化した後にリアルタイムPCR法にてNavの遺伝子発現量を比較検討する。

- (3) 電子顕微鏡によるglycocalyxの厚さ計測を行い、群間比較を行う。測定はヒストグラムを用いた画像分析装置により遂行する。

## 4. 研究成果

末梢神経はリアルタイム PCR において使用する RNA が抽出しにくく時間を要したが以下の研究成果を得られた。

Nav は一般的に Nav1.1 から Nav1.9 までのサブタイプが知られているがこれらを網羅的に調査した結果、以下の知見を得られた。

9 種類の Nav のうち、Nav1.5 (心筋に発現) を除く 8 種類の発現を RT-PCR にて測定した結果、発現低下に関しては 8 種類中、3 種類の Nav に、発現増加も 3 種類で有意であった (図 1、図 2)。残り 2 種類の Nav は対照群と有意な差は認められなかった。

図 1. 敗血症誘発重症神経炎ラットモデルにおける Nav1.1 遺伝子発現量比較

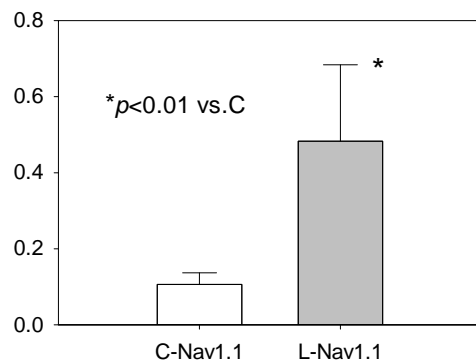
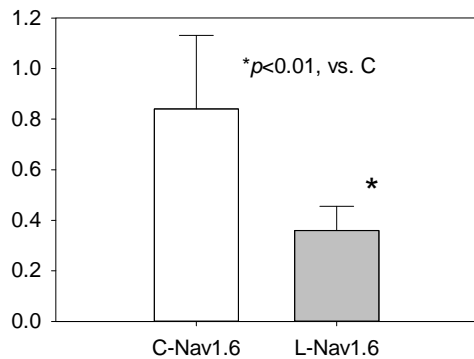


図 2. 敗血症誘発重症神経炎ラットモデルに

## おける Nav1.6 遺伝子発現量比較



以上の結果より、敗血症誘発重症神経炎ラットモデルにおいては Nav サブタイプの発現異常が生じており、Na 受容体における channelopathy であることが推測される。しかしながら、本病態に関しては予想以上に多種の Nav が関与しており、その相互作用に関しては不明のことが多いため閾値に関するこれらの関与に関する考察は困難である。また、薬剤 X、薬剤 Y の投与はこれらの Nav の発現異常に影響を与えなかった。よって薬剤 X、薬剤 Y の神経伝導異常への改善効果は Nav サブタイプの発現異常とは別の機序によるものと考えられる。

また今回の研究期間ではグリコカリックスの関与が検証できなかった。虚血-変性に関するこの物質の変化は今後の課題と考えている。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

日野 博文 (HINO, Hirofumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70308500

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: