

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791728

研究課題名(和文)敗血症性脳症の病態におけるHMGB1の役割の解明

研究課題名(英文)The mechanism of HMGB1 in the pathogenesis of septic encephalopathy

研究代表者

坂本 英俊(SAKAMOTO, HIDETOSHI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：90349267

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)：HMGB1(High mobility group box 1)を脳室内投与する前処置により、覚醒期が低下し、non-rem睡眠期が増加することが判明した。HMGB1(前処置)群および生理食塩水(前処置)群にmelanin-concentrating hormone(MCH)を投与すると、両群とも海馬アセチルコリン放出を増大させた。HMGB1の脳室内投与前処置は、海馬アセチルコリン放出を減少させず、MCH脳室内投与後の海馬アセチルコリン放出にも影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that intracerebroventricular (icv) injection of HMGB1(High mobility group box 1) reduced awakening period, and increased the non-rapid eye movement episode time. We also demonstrated that icv injection of melanin-concentrating hormone(MCH) increased hippocampal acetylcholine release in both HMGB1 (pre-treatment) group and normal saline(pre-treatment) group. Icv injection of HMGB1 did not reduce the hippocampus acetylcholine release, and had no effect on hippocampal acetylcholine release after icv injection of MCH.

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：脳・神経 敗血症 HMGB1 睡眠・覚醒 MCH 記憶 集中治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症患者ではしばしば譫妄、痙攣、意識障害などの中枢神経障害を来すことはよく経験するところである。しかし、その実態は十分に理解されていない。その理由として敗血症患者では多臓器不全に伴って生ずる肝障害、電解質バランス異常、内分泌障害によって起こる代謝性障害、血圧低下に伴って生ずる脳灌流障害、血液凝固系障害による血栓塞栓症などによって覆い隠されてしまうことが多いからである。

(2) Ebersoldt ら(2007)は敗血症に関連した譫妄について検討し、脳が敗血症に伴って侵される最初の臓器の内の一つであり、敗血症の程度にもよるが譫妄の生ずる頻度は9-71%であると報告している。最近では敗血症に関連した中枢神経障害を敗血症性脳症(septic encephalopathy: SEP)と呼んでいる。また、SEPは敗血症における死亡原因の独立した因子であるとも言われており(Sprung CL et al. 1990)、死亡率は16-35%にもおよぶと推測されている(Eidelman LA et al. 1996)。しかし、敗血症の患者の多くはその重篤性から鎮静薬を用いて人工呼吸管理をされており、その臨床的診断は困難なことが多く、その実態については未だ解明されていないのが現状である。

(3) 申請者は従来から脳虚血再灌流後の細胞傷害のマーカーとして種々の生理的活性物質の役割について研究を行ってきた。その一環として、心臓手術時の虚血再灌流において、冠静脈洞より得られた血清 MDA および尿中 isoprostane を測定した。その結果、虚血再灌流後に MDA が有意に上昇し、プロポフォールは再灌流後の MDA の上昇を有意に抑制することを見いだした。(申請者業績1)

(4) 一方、最近では、これらのマーカーの他に敗血症時の late mediator と言われている high-mobility group box 1 (HMGB1) が脳虚血再灌流後のマーカーの一つとしての可能性を見いだしつつある。敗血症では脳微小循環が発症早期に障害される(Rosengarten B et al. 2007)ことが知られており、脳虚血と同様に TNF α や IL1 β のような炎症性サイトカインの関与が関連することが予想される。

(5) HMGB1 は215個のアミノ酸からなる蛋白であり、2つの異なった役割を担っている。一つは健常時には細胞内の核にあって転写の

調節機能としての役割を担っている事、他は脳梗塞などで細胞が破壊され細胞外に放出された場合の炎症の助長作用である(Czura CJ et al. 2001)。炎症細胞であるマクロファージに HMGB1 を暴露させると、サイトカインである TNF α は2時間以内に増加することが知られ、他のサイトカインである IL1 β に結合することによりマクロファージを活性化しその産生を促すことが報告されている(Sha Y. et al. 2008)。また、マウスに大腸菌の菌体成分であるリポ多糖(LPS)を投与すると血漿 HMGB1 が増大する(Andersson UH, et al. 2002)ことが知られており、炎症により脳血液関門が破壊された脳ではその増加が予想される。

(6) 一方、健常時、TNF α や IL1 β 等のサイトカインは脳で産生され睡眠時のノンレム睡眠を誘発する作用がある(Krueger JM. 2008)ことが知られており、敗血症時に増加する HMGB1 によりこれらサイトカインの睡眠誘発作用が助長されることが予想される。敗血症時の HMGB1 ならびに他のサイトカインが脳内でどのような動態を示すのか、また、睡眠・覚醒に關与する神経核にどのような影響を及ぼすかについては全く未知の分野であり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 敗血症性脳症における HMGB1 をはじめとした種々のサイトカインの動態を明らかにし、その中枢神経系障害メカニズムを明らかにすることである。

(2) 敗血症性脳症時の血中・脳脊髄液中の HMGB1 をはじめとしたサイトカインの変化を測定する。敗血症の経時変化に伴う血中・脳脊髄中の HMGB1、TNF α 、IL1 β の変動を測定し敗血症により脳にどのように炎症が波及してゆくのかを明らかにする。

(3) 脳室内に HMGB1、TNF α 、IL1 β 単独ならびに HMGB1、TNF α 、HMGB1 + IL1 β を脳室内に投与した時に睡眠・覚醒サイクルがどのように影響を受けるかを測定し、HMGB1 の脳室内での他のサイトカインの助長作用があるかどうか、また大脳皮質からの覚醒伝達物質放出がどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。

(4) 脳内炎症反応が記憶障害に關与し、HMGB1 が脳内炎症性サイトカインを誘導する重要な前駆物質である可能性が示

唆されている。我々は以前、メラニン凝集ホルモン(MCH)脳室内投与が海馬アセチルコリン(ACh)放出増大を来たし、記憶を促進させる作用があることを示唆した。HMGB1の脳室内投与前処置がMCH脳室内投与による海馬ACh放出への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) 体重280~350g前後のWistar雄ラットを使用した。実験開始5~7日前に、実験5~7日前にペントバルビタール(50 mg/kg:腹腔内)麻酔下でPaxinos & Watsonの脳地図に従って、微量注入用ステンレス管を脳室内側脳室内(Bregmaから前後; -0.8 mm, 外側; 1.5 mm, 深さ -4.0 mm)に固定した。マイクロダイアリスガイドカニューラを海馬(Bregmaから前後; -5.6 mm, 外側; 4.5 mm, 深さ; -3.5mm)に留置した。脳波電極を頭蓋に、筋電図電極を頂部筋肉内に留置した。最後に歯科セメントにて固定した。

(2) HMGB1 (1 µg/5 µl)または生理食塩水(NS)(5 µl)を24時間前に脳室内に投与した。

実験当日、約2時間安定化させた後、MCH(1ng/5 µl)またはNS(5 µl)を脳室内投与し、海馬からのアセチルコリン放出を3時間観察した。マイクロダイアリスプローブは2 µl/minで灌流し、20分毎にfraction collectorにて灌流液を採取した。アセチルコリン分析には高速液体クロマトグラフィーを用いた。

アセチルコリンの測定結果は20分毎の推移と、3時間の曲線下面積(Area under the curve;AUC)で比較した。

(3) 脳波・筋電図は恒温・恒湿チャンセル内にて連続的に記録した。睡眠・覚醒サイクルの解析は、SleepSign® ver. 3にて解析し、覚醒期、REM期、non-REM期が経時的にどのように変化するかを測定した。

4. 研究成果 海馬アセチルコリンの変化

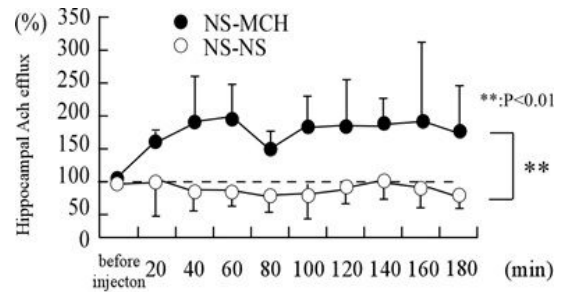


図1 NS(前処置)-MCH群とNS-NS群の海馬アセチルコリンの推移

NS(前処置)-MCH群(n=6)はNS-NS群(n=8)と比較し、ACh放出量が有意に増加した(p<0.01:二元配置分散分析)。

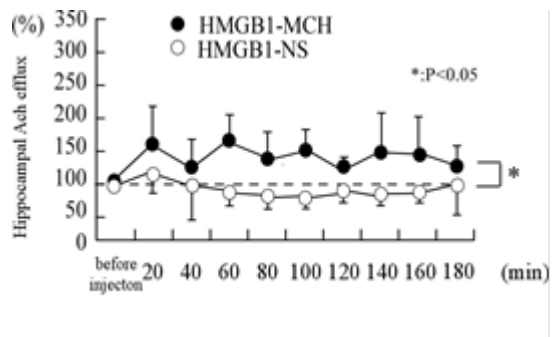


図2 HMGB1(前処置)-MCH群とHMGB1-NS群の海馬アセチルコリンの推移

HMGB1(前処置)-MCH群(n=6)とHMGB1-NS群(n=6)では、HMGB1-MCH群のACh放出量が有意に増加した(p<0.05:二元配置分散分析)。

4群の3時間の曲線下面積(Area under the curve;AUC)の多重比較

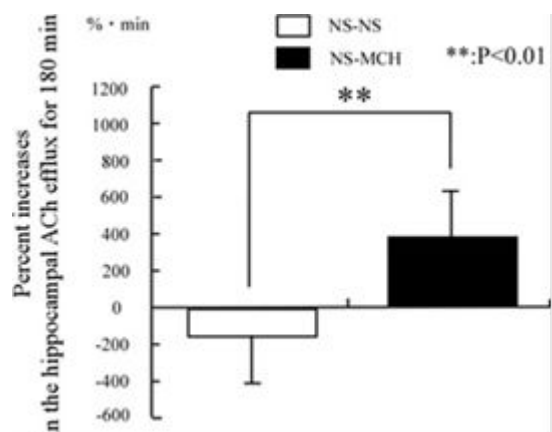


図3 NS(前処置)-MCH群とNS-NS群の海馬アセチルコリンの推移

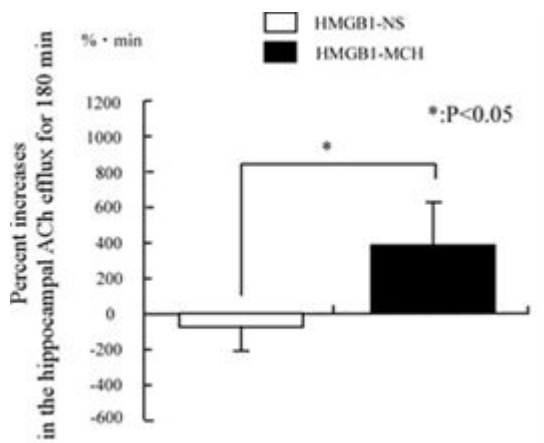


図4 HMGB1(前処置)-MCH 群と HMGB1 -NS 群の AUC

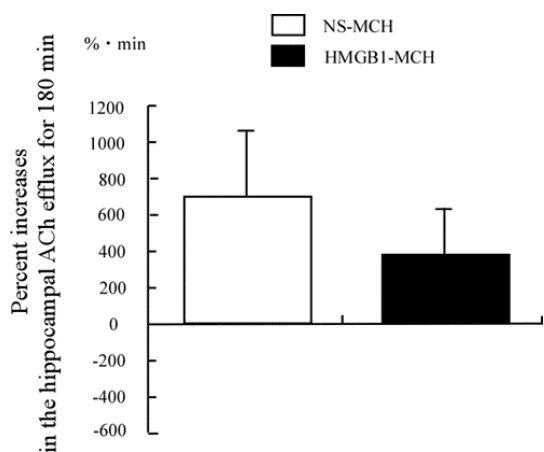


図5 NS(前処置)-MCH 群と HMGB1-MCH 群の AUC

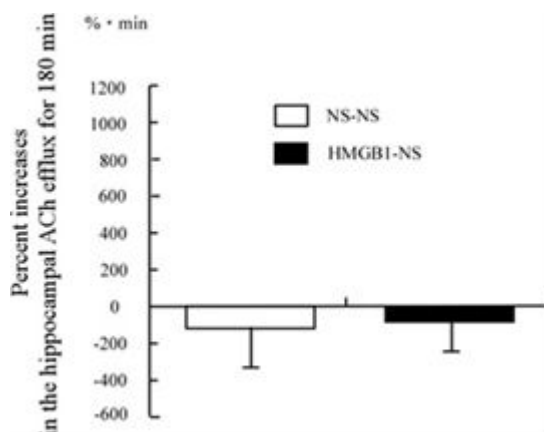


図6 NS(前処置)-NS 群と HMGB1-NS 群の AUC

AUC 比較では、HMGB1(前処置)-MCH 群と HMGB1-NS 群 ($P<0.05$)、NS(前処置)-MCH 群と NS-NS 群 ($P<0.01$) の間に有意差を認め、NS(前処置)-NS 群と HMGB1-NS 群の AUC、HMGB1-MCH 群と NS-MCH 群の間では、有意差はなかった

(一元配置分散分析；多重比較:Tukey 法)

HMGB1 による前処置では、ACh 放出量が減少する可能性があったが、今回の実験では、認めなかった。投与間隔の変更等による影響がないか、今後の検討を要する。

HMGB1 による脳室内投与前処置は、MCH 脳室内投与後の海馬アセチルコリン放出にも影響を与えなかった。

脳波の解析

HMGB1(前処置)群 ($n=11$) と NS(前処置)群 ($n=14$) を比較し、HMGB1(前処置)群の方が覚醒期が有意に低下し ($p<0.01$: 二元配置分散分析)、non-REM 睡眠期が有意に増加した ($p<0.01$: 二元配置分散分析)。

NS(前処置)-MCH 群 ($n=6$) と NS(前処置)-NS 群 ($n=8$) を比較し、NS(前処置)-MCH 群の MCH 投与後の rem 睡眠期が有意に増加した ($p<0.05$: 二元配置分散分析)。これは、以前の我々の報告に矛盾しない。

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1件)

坂本 英俊、福田 悟、藤本 萌、安楽 和樹、澤村 成史、HMGB1 脳室内投与前処置はメラニン凝集ホルモンによるラット海馬アセチルコリン放出に影響しない、日本麻酔科学会第61回学術集会、2014年5月15日、パシフィコ横浜(神奈川県)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 英俊 (SAKAMOTO HIDETOSHI)
(帝京大学・医学部・講師)
研究者番号：9 0 3 4 9 2 6 7

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：