

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590315

研究課題名(和文) Nox 遺伝子制御が敗血症性脳症の病態に果たす役割と治療標的としての意義

研究課題名(英文) Regulation of NADPH oxidase gene: the role and meaning as a therapeutic target in septic encephalopathy.

研究代表者

横尾 宏毅 (YOKOO, Hiroki)

常葉大学・健康プロデュース学部・教授

研究者番号：30332894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症マウス脳組織において、サイトカイン発現が増加、また脳血管評価では透過性が有意に亢進していた。加えて、Nox構成サブユニット、p47phox、p67phox発現、酸化ストレス指標8-OHdG産生、iNOS発現が増加していたことから、活性酸素産生増加がNOと反応、活性窒素種が生じ、脳血管が破綻していく機序が示唆された。さらに、光学および電子顕微鏡による解析では、敗血症マウス脳に生じる変性神経細胞の出現は、ラジカルスカベンジャーのエダラボンを投与しておくことで軽減されるいことが確認された。以上のことから、Nox遺伝子制御は、敗血症性脳症治療標的となりうるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We focused on NADPH oxidase (Nox) activity and studied about sepsis encephalopathy. Proinflammatory cytokines and brain vessel permeability were significantly up-regulated in septic mice brain. And, Nox subunits, p47phox and p67phox, oxidative stress marker 8-OHdG, and iNOS expression were up-regulated in septic brains. These indicate that superoxide, produced by Nox, reacts with NO to form peroxynitrite, that might provoke a failed blood brain barrier. Light and electron microscopic examination showed that serious neuronal degeneration was occurred in septic mice brain. However, these histopathological changes were mitigated by treatment with the free radical scavenger edaravone. Thus, it was suggested that Nox gene might be therapeutic target for treating septic encephalopathy.

研究分野：基礎医学・薬理学一般

キーワード：炎症 酸化ストレス 敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 感染症を基盤とした全身性炎症反応症候群である敗血症は、罹患者の多くが多臓器不全からショック症状を呈する極めて致死性が高い病態である。特に、敗血症患者に生じるびまん性脳傷害については、敗血症性脳症(Septic Encephalopathy)と称され、救命し得た場合でも、認知機能や記憶障害など高率に脳機能に後遺症を生じさせるため、その発症に至るまでの分子メカニズムを解明し治療標的を探索していくことは、救命救急領域で強く求められているニーズである。

(2) 一方、脳虚血性疾患、外傷性脳傷害において、その発症時には、活性酸素種/活性窒素種(ROS/RNS)が過剰に産生され、組織傷害に大きく関与することが、それらの病態モデルにおいて明らかにされてきていました。敗血症病態においても当然のことながら活性酸素種/活性窒素種の関与が示唆されていたのですが、それらと敗血症脳症における機能障害との関連については、明らかにされていませんでした。

## 2. 研究の目的

(1) 生体において外因性分子に対し反応性の高い活性酸素は、好中球での殺菌作用など、生体を守るために重要な役割を果たしています。しかしながら、虚血性疾患や代謝性疾患において制御不能な産物として過剰になった活性酸素は、その酸化損傷力により、組織傷害を引き起こすことから、活性酸素による悪影響いわゆる酸化ストレスは、糖尿病をはじめとする生活習慣病、悪性腫瘍など、万病の根源として認知されてきました。

(2) 活性酸素の生成源となっている酵素群が、NADPH oxidase (Nox) ファミリーです。組織が傷害されると、過剰に産生されたサイトカインやケモカインの刺激により、Nox は、NADPH を基質として電子伝達反応を進行させ、過剰な活性酸素を産生します。敗血症性脳症においても Nox 活性増加が予想されていますが、解明されていない部分が多く存在しています。

(3) 本研究においては、マウスに盲腸結紮穿孔術 (Cecal ligation and puncture: CLP) を施行し、臨床像に極めて類似した敗血症病態モデルを作成、加えて酸化ストレスおよび Nox 活性に着目し、敗血症性脳症形成における役割を明らかにしていくとともに、Nox の活性制御により脳傷害が軽減するかを検討、脳症治療に新しい方向性を提示することを目的としました。

## 3. 研究の方法

### (1) 敗血症モデルマウス

敗血症動物モデルとして盲腸結紮穿孔 (CLP) により人為的に腸内細菌による腹膜炎

を起こしたマウスを作成する。雄性 8~12 週齢の BALB/c マウスに、セボフルレン吸入麻酔下に、マウス腹部を小切開にて開腹、盲腸部を確認後、その先端部より約 5 mm の部位を結紮、その盲腸先端部に 21 ゲージ注射針を用いて穿刺、2ヶ所穿孔部位を形成後、腹腔内に戻す (CLP 術)。対照群には腹膜切開と盲腸先端膨出に留めた Sham 手術群を設定しておく。

### (2) エダラボン等の薬物投与

ラジカルスカベンジャー、エダラボン投与は、手術 4 日前より手術後解析時まで、1 日 2 回の腹腔内投与で行う。脳血管透過性測定のための色素薬は、開腹による影響も考慮し、手術 30 分前に尾静脈より投与する。

### (3) 解析組織サンプル採取

組織採取については、CLP 施術後の経過時間ごとに、セボフルレン全身麻酔下に開腹、開胸、右心室へ留置針を穿刺して循環血液をヘパリン含有緩衝液で灌流置換後、組織を採取し、すぐに液体窒素中で氷冷、-80 で保存する。尚、ホルマリン固定が必要な組織サンプルについては、緩衝液灌流後、ホルマリン液による灌流を行い固定する。

### (4) 顕微鏡下の形態学的解析

敗血症モデルマウス (CLP マウス) および治療マウス臓器組織における組織損傷度、炎症細胞浸潤等の形態変化について、HE 染色による顕微鏡下解析を行う。さらに、脳血管内皮細胞や脳実質細胞の細かな構造変化については、電子顕微鏡による解析で明らかにしていく。

### (5) Nox および炎症関連分子の発現解析

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等のサイトカイン、iNOS、Nox サブユニットの p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、gp91<sup>phox</sup> ホモログ等の分子について、リアルタイム PCR 法により mRNA 量を、ウェスタンブロット法により蛋白質発現量を測定する。

### (6) Nox 活性および酸化ストレスマーカー測定

Nox 活性については、プロテアーゼ阻害薬を含む緩衝液を加えて氷冷しながらホモジエナイズし、1,000G で遠心後、その上清液を回収し、その後基質 NADPH および活性酸素に特異的に反応する化学発光試薬ルシゲニンを添加して生じる化学発光を、ルミノメーターにより検出、組織蛋白量に対する活性強度を測定する。また酸化ストレスの指標として、DNA 中のグアニン塩基が酸化損傷を受けて生成される 8-ヒドロキシ-デオキシグアノジン(8-OHdG) を、ELISA キット (日研ザイル社) により測定する。

(7) 血管内皮細胞に対する高濃度グルコース処置による Nox 活性測定

ブタ血管内皮細胞培養系において、酸化ストレス増加が細胞シグナル変化に及ぼす影響について、上記方法を用いて検討する。

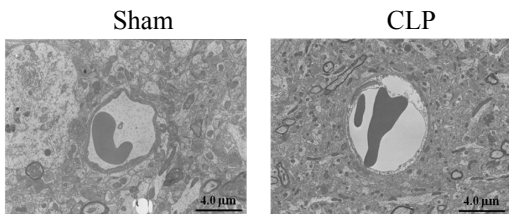
#### 4. 研究成果

(1) 敗血症モデルマウス脳における炎症性変化

敗血症モデルマウス CLP 術後 12 時間後の脳組織において、サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 量、蛋白質量の増加を認めた。また、CLP 術後 24 時間後の脳組織 HE 染色による顕微鏡解析では、大脳皮質および海馬の部位を中心に、委縮、変形、濃染色を呈する神経細胞の炎症性変化が観察された。

(2) 敗血症モデルマウス脳における血液脳関門の破綻

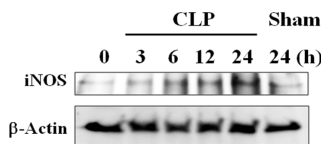
色素試薬のエチジウムブロマイド、sodium fluorescein を用いての脳血管透過性の解析では、敗血症マウス脳において、貯留色素濃度の増加がみられた。さらに、電子顕微鏡解析では、Sham マウス脳では、血管内皮細胞が無傷であるのに対し、CLP マウス脳血管内皮細胞は腫脹し、加えてそれらの細胞膜が断裂している像が確認された(図1)。加えて、脳実質細胞では、クロマチンの分散や変性したオルガネラの液胞などが観察された。



(図1)

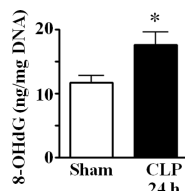
(3) 敗血症モデルマウス脳における酸化ストレス増加と Nox アイソフォーム p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> mRNA 量、蛋白質量発現および Nox 酵素活性の増加

CLP マウス脳では、時間経過とともに iNOS の発現が増加した(図2)。



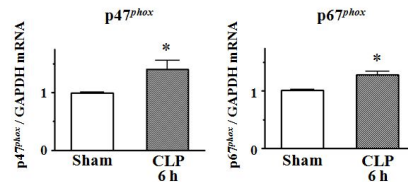
(図2)

加えて、CLP マウス脳組織においては、DNA 中のグアニン塩基が酸化損傷を受けて生成される 8-OHdG の生成量が増加していた。



(図3)

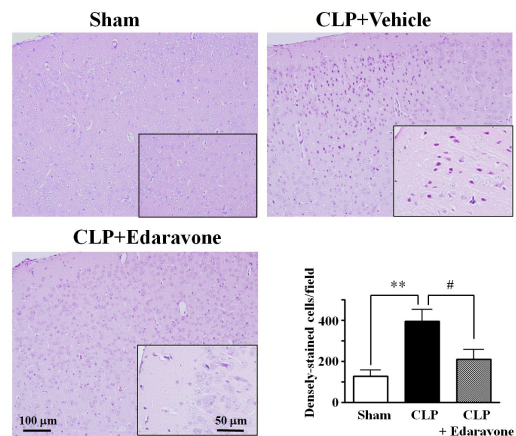
さらに、CLP マウス脳組織においては、Nox サブユニット p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> mRNA 量(図4)、蛋白質量が増加するとともに、Nox 酵素活性も増加していた。



(図4)

(4) フリーラジカルスカベンジャーエダラポン投与による敗血症モデルマウス脳神経細胞変性の減少

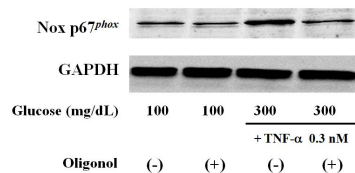
Nox 遺伝子制御を目的に、酸化・ニトロ化ストレスを軽減させるためラジカルスカベンジャー、エダラポンを処置すると、前述の脳神経細胞変性は軽減した(図5)。



(図5)

(5) 高濃度グルコース処置培養血管内皮細胞における Nox 酵素活性増加

高濃度グルコースおよび TNF- $\alpha$  3 日間処置により、Nox p67<sup>phox</sup> 蛋白質発現量が増加するとともに(図6) Nox 酵素活性も増加した。しかし、抗酸化ポリフェノール含有食品を同時に処置しておくと、この Nox 増加は抑制された。以上のことから、酸化ストレス曝露により、血管内皮細胞は容易に傷害されることが予想された。



(図6)

#### 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 4件)

Qiang Wang, Hiroki Yokoo, Michinori Takashina, Kimimasa Sakata, Wakana Ohashi, Lobna A. Abedelzاهر, Takahiro Imaizumi, Takuya Sakamoto, Kohshi Hattori, Naoyuki Matsuda, Yuichi Hattori: Anti-inflammatory profile of levosimendan in cecal ligation-induced septic mice and in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Critical Care Medicine*, in press, 査読有.

Kimimasa Sakata, Takashi Kondo, Natsumi Mizuno, Miki Shoji, Hironobu Yasui, Tooru Yamamori, Hiroki Yokoo, Naoki Yoshimura, Yuichi Hattori: Roles of ROS and PKC-beta11 in ionizing radiation-induced eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 70: 55-65, 2015, 査読有.  
DOI: 10.1016/j.vph.2015.03.016

Mariko Takebe, Hirofumi Oishi, Kumiko Taguchi, Yuta Aoki, Michinori Takashina, Kengo Tomita, Hiroki Yokoo, Yasuo Takano, Mitsuaiki Yamazaki, Yuichi Hattori: Inhibition of histone deacetylases protects septic mice from lung and splenic apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 187: 559-570, 2014, 査読有.  
DOI: 10.1016/j.jss.2013.10.050

Hiroki Yokoo, Seiichi Chiba, Kengo Tomita, Michinori Takashina, Hiroshi Sagara, Saburo Yagishita, Yasuo Takano, Yuichi Hattori: Neurodegenerative evidence in mice brains with cecal ligation and puncture-induced sepsis: preventive effect of the free radical scavenger edaravone. *PLoS One*, 7: e51539, 2012, 査読有.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0051539

〔学会発表〕(計 6件)

横尾宏毅. Ca 感受性増強薬レボシメンダンの敗血症性炎症に対する抑制効果. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 ~ 21 日, 東北大学百周年記念会館川内萩ホール 仙台国際センター, 仙台市, 宮城県.

Yokoo H. The oligomerized polyphenol oligonol ameliorates high glucose- and TNF- $\alpha$ -induced NADPH oxidase activation and insulin signaling downregulation in vascular endothelial cells. *Experimental Biology* 2013, April 20~24, 2013, Boston, MA, USA.

横尾宏毅. オリゴノールは糖尿病血管内皮での Nox 活性増加とインスリン抵抗性を改善する. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21 ~ 23 日, 福岡国際会議場, 福岡市, 福岡県.

横尾宏毅. 糖尿病と血管内皮 Death 受容体の発現. シンポジウム「糖尿病病態における血管内皮細胞機能研究の新しい展開」. 第 22 回日本循環薬理学会, 2012 年 11 月 30 日, 富山国際会議場, 富山市, 富山県.

Hiroki Yokoo. Inhibition of hyperglycemia/cytokine-induced NADPH oxidase activation and preservation of insulin signaling by treatment with Oligonol: analysis in cultured porcine aortic endothelial cells. 20th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine, July 21~22, 2012, Royton Sapporo, Sapporo, Hokkaido, Japan.

Hiroki Yokoo. Expression of TNF-R1 and Fas in coronary arterioles of type 2 diabetic mice. *Experimental Biology* 2012, April 21~25, 2012, San Diego, CA, USA.

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
常葉大学健康プロデュース学部健康栄養学科ホームページ  
<http://www.tokoha-u.ac.jp/department/health-produce/dietetics/index.html>  
富山大学大学院医学薬学研究部分子医科薬理学講座ホームページ  
<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横尾 宏毅 (YOKOO, Hiroki)

常葉大学・健康プロデュース学部・教授

研究者番号：30332894

(2)研究分担者

服部 裕一 (HATTORI, Yuichi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)

.

教授

研究者番号：50156361

高野 康雄 (TAKANO, Yasuo)

東京工科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：60142022

(3)連携研究者

無

(4)研究協力者

無