

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592734

研究課題名(和文)敗血症性脳症の積極的治療介入方法の探索

研究課題名(英文)Exploratory research for the better outcome of septic encephalopathy

研究代表者

今村 行雄 (Imamura, Yukio)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：90447954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、敗血症性脳症の病態機構および積極的治療介入方法を見出すため、1)敗血症性モデルマウスの構築と評価、2)脳神経細胞受容体の観点から脳症の病態および治療介入効果の検討、3)抗炎症性経路賦活化による治療介入効果の検討を試みた。その結果、ヒストンアセチル化による神経細胞受容体および炎症性サイトカインの制御による治療介入可能性が見出された。抗炎症経路賦活化により病態は改善される可能性を示したが、今後の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)： In this study, we examined molecular mechanisms and challenged to find a novel way of medical intervention for septic encephalopathy. To tackle these issues, we conducted the following experiments: 1) establishment and evaluation of mouse model for septic encephalopathy, 2) possible involvement of glutamatergic synaptic receptor and interleukin-1 receptor for the molecular mechanisms, 3) tested whether activation of anti-inflammatory pathways improved septic encephalopathy. Our findings suggest that histone acetylation mediated regulation of ionotropic and interleukin receptors for the better outcome of septic encephalopathy. In addition, activation of anti-inflammatory pathway may be beneficial for the better prognosis of septic encephalopathy

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症性脳症

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、細菌が体内に侵入し引き起こされる全身性炎症反応症候群(SIRS)である。全身性炎症反応症候群では、免疫応答が過剰となる。その結果、発熱や低血圧を呈する。一方、脳においては脳虚血や脳浮腫が観測されることがあるが、多発性神経炎を併発することもある。このように敗血症の病態は神経病理学的な症候を含む。

敗血症の病態発生における分子メカニズムが明らかになってきている。バクテリアなどの病原体が血液中に侵入すると免疫系細胞の樹状細胞やT細胞において病原体関連分子パターンとして認識される。この病原体関連分子パターンがトル様受容体に結合すると、サイトカインの放出を促進させる。このサイトカイン放出による下流の細胞内シグナル伝達経路はNF- κ Bの核内移行シグナルを活性化する。NF- κ Bによりインターロイキンファミリー(IL-1,2,6,8,12)や腫瘍壊死因子の転写が促進される。これらの促進はサイトカインストームを引き起こす。

サイトカインストームは、抗生物質治療、消炎剤などの処置を行わなければ、多臓器不全をもたらす。脳においては、敗血症性脳症を呈し、記憶障害、注意障害など高次脳機能障害や意識障害に陥る。我々は、敗血症性マウスモデルを用いた実験から、血液脳関門の透過性上昇、脳内に見出されたミクログリアおよびマクロファージにおけるインターロイキン1の発現上昇、神経細胞におけるインターロイキン1受容体の発現上昇を見出した。さらに、海馬におけるシナプス可塑性障害とそのインターロイキン阻害薬による治療介入効果を明らかにした(Imamura Y et. al, (2011))。これらの結果は、敗血症性脳症が脳に流入した過剰なサイトカインによって引き起こされること、またサイトカイン阻害剤による治療介入効果の有効性を示

唆していた。

一方、敗血症による全身性炎症反応症候群は自律神経系にも影響する。例えば、リポポリサッカライド(グラム陰性菌の細胞壁)を腹腔内に注射し、敗血症様の症状を呈したラットにおいては迷走神経活動の閾値が上昇する。逆に、迷走神経を刺激すると敗血症の症状は改善する。このように迷走神経は敗血症の予後に非常に重要な役割を果たすことが国際的な研究グループによる研究結果から明らかとなってきている(Tracy et. al., *Nat. Immunol.* 9 (2009) 418-428)

敗血症性脳症の解決を目指して、本研究では、敗血症性脳症における生体の脳神経系による免疫の制御不能を脳における分子機序を解明することから明らかにすることを目的とした。本研究結果から期待される成果は、炎症を制御する神経伝達機構のバランスの乱れという新しい視点を含み、重篤な免疫系の異常によりもたらされた精神疾患や外傷による重篤な全身性障害による意識障害など、これまではその機序が明らかでなかったために対処療法的な手段しかなかった難治性の炎症性疾患に対し、積極的な治療介入の手段を講じる可能性が期待できる。

2. 研究の目的

敗血症は全身性炎症、多臓器不全症候群を経て敗血症性脳症を呈する。敗血症性脳症の病態は依然明らかにされておらず、対症療法が主となるケースが多いため、生存が可能になった場合でも重い高次脳機能障害が続く場合が多い。近年、抗炎症性経路の活性化をはじめ、様々な分子機序が明らかになり、それらをコントロールすることにより、敗血症の予後を改善させる効果から期待されている。本研究では敗血症による脳症に着目し、抗炎症経路にかかわる分子機構を検証することにより、積極的な治療介入への足がかりを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルマウスの作成と評価

敗血症性モデルマウスは2通りの方法：
盲腸穿孔穿刺， リポポリサッカライド腹腔内投与で作成した。本マウスモデルにおいてはほとんどが20hrで致死に達し、その1-2時間前に脳症を発症することが他のグループによるこれまでの研究から明らかになっている。そこで、敗血症誘導後18hrにおける脳の器質的变化を調べた。

(2) 敗血症性脳症の病態および治療介入効果の脳神経細胞受容体の観点からの検討

敗血症性脳症マウスを作製し、20時間後にマウス側脳室に NR2B 特異的アンタゴニスト Ro25-6981 を 0.2 g 投与し、敗血症に伴う感覚機能の回復効果を検討した。行動学的解析に Hot plate 試験（脳機能検査）、tail immersion 試験（反射機能検査）を用い、生化学的解析として、免疫染色法、免疫沈降法を用いた。

(3) 敗血症性脳症におけるコリン作動性抗炎症経路肺活化による治療介入効果の検討

敗血症性脳症におけるコリン作動性抗炎症経路肺活化による治療介入効果を主に生理学実験により検討した。これまで、行ってきた研究手法に基づき、電気生理実験および分子生物学実験を組み合わせた研究を行った。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルマウスの作成と評価

細胞外マトリックス分解酵素群のうち MMP-9 (ゼラチナーゼ)の活性が顕著に増加していることが免疫染色法、ウェスタンブロットティング法により明らかとなった。次に、麻酔下のマウス脳に記録電極を差し込み、下肢痛覚神経刺激時の誘発電位を測定した。この記録電極は記録部分のみ(100-200 μ m)が導出し、他の部分はテフロンで絶縁している

ため、局所的な脳神経細胞による誘発電位のみが記録できる。敗血症脳症マウスでは体性感覚野、視床、前頭皮質における誘発電位の振幅が著しく減少した。以上の敗血症性脳症による生化学的、電気生理学的変化は MMP の阻害剤 (GM6001) によって抑えられた。以上の結果から敗血症性脳症の病態発生に伴う感覚神経障害には細胞外マトリックスが関わっており、早い段階でその活性を制御することが障害を抑える上で重要であることが示唆される。以上の成果は Biochemistry&Pharmacology 2(1)(2013)1-7 (査読有、責任著者：代表研究者)に掲載された。

(2) 敗血症性脳症の病態および治療介入効果の脳神経細胞受容体の観点からの検討

敗血症性脳症マウスを用い、感覚機能異常における NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2B サブユニット(以後 NR2B と記載)、および炎症性生理活性タンパク質インターロイキン 1 受容体(以後 IL-1R と記載)の役割を検討した。

その結果、行動学的解析：敗血症性脳症において Hotplate 試験にのみ遅延が生じ、Ro25-6981 注入マウスは正常マウスまで回復した。生化学的解析：敗血症性脳症において、NR2B、および IL-1R の発現上昇がみられ、Ro25-6981 マウスでは正常レベルに回復した。さらに免疫沈降法により、NR2B と IL-1R それぞれにおいてバンドが検出された。

結論：敗血症性脳症の感覚機能異常においては NR2B サブユニットが IL-1R の発現上昇に関わり、重要な役割を果たしていることが本研究により初めて分かった。

(3) 敗血症性脳症におけるコリン作動性抗炎症経路肺活化による治療介入効果の検討

リポポリサッカライドを腹腔注射したマウス、および盲腸穿孔穿刺 (Cecal ligation and puncture)により敗血症マウスを作製し、18時間飼育する(敗血症脳症マウスの作成)。本マウスでは脳機能障害おこり、敗血症性脳症様の現象が起きていることは、すでに報告済みである (Imamura ら Neuroscience (2011)& Wang and Imamura ら Biochemistry and Pharmacology (2013))。その後、コントロールマウス(同様の実験操作を加えているが、敗血症は誘導していない)および敗血症を誘導したマウスをそれぞれペントバルビタールで麻酔した。両マウス群を用い、麻酔下において、マウスに痛みがないことを確認した。その後、頸部迷走神経を露出させ、迷走神経に接触させた部分のみ導通があり、そ

れ以外はシリコンコーティングにより絶縁させた記録電極をセットした。電気または超音波パルスを加えた際に起こる誘発電位を確認しながら、迷走神経活動を腑活化させ、敗血症の改善効果を観測した。その結果、迷走神経活動の上昇、生存率の向上、脳障害の割合の減少が見いだされた。これらの結果から、敗血症性脳症マウスにおいて迷走神経の腑活化は改善効果傾向を示すことが分かった。本研究成果は現在、論文投稿準備中である。

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20件)

(1) Yukio Imamura*, Nao Yoshikawa, 他10名: Effect of histone acetylation on n-methyl-d-aspartate 2B receptor subunits and interleukin-1 receptors in association with nociception related somatosensory cortex dysfunction in a mouse model of sepsis. *Shock* 45(6):660-667 (2016)

* corresponding author. doi: 10.1097/SHK.0000000000000547. 査読有

(2) Junichiro Nakagawa, Yukio Imamura, 他9名: The beneficial effects of ETS- GS, a novel vitamin E derivative, on a rat model of crush injury. *Shock* (2016), 46(6): 681-687. doi:10.1097/SHK.00000000000000681, 査読有

(3) Yuki Murakami, Yukio Imamura, 他16名: Depressive symptoms as a side effect of Interferon- γ ; therapy induced by induction of indoleamine 2,3-dioxygenase1. *Scientific Reports* (2016), 6: 29920-29932. Doi:10.1038/srep29920. 査読有

(4) Yukio Imamura, 他5名. Near infrared emitting PbS quantum dots for in vivo fluorescence imaging of the pathological state in septic mouse brain. *Molecules* (2016) 21:1080-1092. Doi: 10.3390/molecules21081080 査読有

(5) Takashi Jin and Yukio Imamura: Applications of Highly Bright PbS Quantum Dots to Non-Invasive Near-Infrared Fluorescence Imaging in the Second Optic Window. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 5(1): R3138-R3145 (2016) doi:10.1149/2.0171601jss 査読有

(6) Yukio Imamura: Challenges and opportunities for understanding septic encephalopathy. *Scientia*, September, pp36-38 (2015)

(7) 一医学研究者の感性メカニズムへの挑戦 - 新たな都市アメニティの創造は可能か? 今村行雄, 書名: 安寧の都市-医学・工学からのアプローチ, 発行所: 京都大学大学院工学研究科・医学研究科 安寧の都市ユニット, Jan 24, (2015) 122-129. ISBN: 978-4-9908156-0-8

(8) Yukio Imamura#,*, Satoru Kubo, Jun Imamura, Yoshio Yabe, Kazuhiko Kita, Toshio Igarashi, Yutaka Kanazawa, Tomoyuki Tashiro, Yuki Murakami and Satoko Mitani: Novel Portable Electroencephalograph for Monitoring Human Brain Activity Prior to Anxiety with Balloon Popping Stimuli. *Horizons in Neuroscience Research*, vol 18, chapter 9 (2015): 155-167. ISBN: 978-1-63482-368-5, #corresponding author, * equally contribution. 査読有

(9) Yukio Imamura*, Shota Hori, Natsuki Tsujita, Nao Yoshikawa, Yuki Murakami, Satoko Mitani, Wang Huan, Keijiro Yamada, Takashi Jin, Shoken Koh, Akitoshi Seiyama: Continual dynamics of prefrontal oxyhemoglobin patterns during emotion and feeling in humans. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science Studies* Vol 1(1) (2015) 6-11. ISSN: 2912-1309. * corresponding author. 査読有

(10) Akitoshi Seiyama, Nao Yoshikawa, Yukio Imamura: Ischemic pretreatment delays ischemic brain vasospasm injury in gerbils. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2014)812:247-252. doi: 10.1007/978-1-4939-0620-8_33 査読有

(11) 阪神・淡路大震災、東日本大震災の直接死・震災関連死からみる高齢者の脆弱性、三谷智子、村上由希、今村行雄、日本保健医療行動科学会、(2014) **第29巻、1号**、23-30. ISSN: 2187-7653 査読有

(12) 大規模災害時における行政職員の派遣に伴うストレス軽減について、浜田雄一郎、孔相権、小山真紀、村上由希、今村行雄、三谷智子、日本集団災害学会誌、(2014) **第19巻、2号**、142-149. ISSN: 1345-7047 査読有

(13) Yukio Imamura#,*, Huan Wang*, Naoya Matsumoto 他9名: Matrix metalloproteinase-9 triggers the gap junction impairment and somatosensory neuronal dysfunction in septic encephalopathy. *Biochemistry and Pharmacology*(2013), **2(1)**:1-7. #: corresponding author, *equally contribution, doi:10.4172/2167-0501.1000108 査読有

(14) Yuki Murakami, Masato Hoshi, Yukio Imamura, 他3名. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolites are new

therapeutic targets of macrophage-mediated inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* (2013) 巻1, ページ: 391984-391994. Doi: 10.1155/2013/391984. 査読有

(15) Kazuma Yamakawa, Naoya Matsumoto, Yukio Imamura ら他 6 名. Electrical Vagus Nerve Stimulation Attenuates Systemic Inflammation and Improves Survival in a Rat Heatshock Model *Plos one* (2013), 8(2):1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0056728. 査読有

(16) 三谷智子, 村上由希, 今村行雄, 尾崎悦子. インフルエンザ A(H1/N1)pdm09 時の行動分析から今後の地域対応に関する提案. 日本公衆衛生学会誌 (2013), 巻 72, ページ 524. ISBN: 1347-8060 査読有

(17) Yukio Imamura, Nao Yoshikawa, Yuki Murakami, Satoko Mitani, Akitoshi Seiyama. Inflammation and brain: regulation of systemic inflammation in sepsis. *J. Biochem. Pharmacol.* (2012), 1(6): e127. DOI: 10.4172/2167-0501.1000e127. 査読有

(18) Huan Wang, Yukio Imamura, Naoya Matsumoto, Hong Wang, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu and Akitoshi Seiyama. Novel Sonomicrometry of Ex-vivo Diaphragm after Phrenic Nerve Injury: Role of Matrix Metalloproteinases. *Synapse* (2012), 66(8): 677-685. doi: 10.1002/syn.21552. 査読有

(19) Junya Shimazaki, Yukio Imamura, 他 8 名. Systemic Involvement of HMGB1 and Therapeutic effect of anti-HMGB1 antibody in a rat model of crush injury. *Shock* (2012), 37(6): 634-638. doi: 10.1097/SHK.0b013e31824ed6b7. 査読有

(20) 松本直也, 今村行雄, 他 5 名. 重症敗血症に対する新たな抗炎症治療の開発 (骨髄間質細胞移植, 脳症への IL-1ra 治療) *日本救急医学会雑誌* (2012) 22(8) 409. 査読有

[学会発表](計 10 件)

(1) 第二近赤外光学窓を利用した生体深部イメージング: 野村保友, 若井凌, 大和滉, 坂田裕太郎, 友亮人, 今村行雄, 神隆. 招待講演. 第 13 回バイオオプティクス研究会, (2016), 12/2, 前橋工科大学, 群馬県, 前橋.

(2) Application of near infra-red optical probes in a second optical window for pathological analyses of mice; Yukio Imamura, Sayumi Yamada, Setsuko Tsuboi, Takashi Jin. *In vivo imaging forum* (2016) 11月11日コクヨホール, 東京都, 品川

(3) Application of near infra-red optical probes in a second optical window for pathological analyses in a mouse brain; Yukio Imamura, Sayumi Yamada, Setsuko Tsuboi, Takashi Jin. ECS international conference, Hawaii, USA, Oct 2-7, (2016)

(4) 第 2 光学窓蛍光プローブを用いた近赤外生体非侵襲イメージングによる

新たな脳血管病態解明への試み: 今村行雄, 小松崎章仁, 坪井節子, 神隆. *Optics&Photonics Japan* (2015) 10月 27-30, 筑波大学, 東京都, 文京区

(5) Survival Improvement by anti-RAGE antibody administration in a rat model of crush injury; Hisatake Matsumoto, Naoya Matsumoto, Junya Shimazaki, Junichiro Nakagawa, Yukio Imamura, Kazuma Yamakawa, Tomoki Yamada, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu. 44th Society of Critical Care Medicine, Phoenix Convention Center, Arizona, USA, Jan 17-21 (2015)

(6) 重症病態に対する頭蓋内炎症制御を狙った神経指向型集中治療法の探索. 松本直也, 今村行雄, 山川一馬, 小倉裕司, 嶋津岳士, 第 42 回日本救急医学会, 10月 28-30日 (2014), 福岡国際会議場, 博多, 福岡県

(7) A survey on the practitioner's attitude toward a novel influenza pandemic. Tsujii M, Murakami Y, Imamura Y, Mitani S: The 12th Asia Pacific Conference on Disaster Medicine, Tokyo Dome Hotel, Tokyo, Sep. 17-Sep. 19 (2014)

(8) Akitoshi Seiyama, Nao Yoshikawa, Yukio Imamura: Effect of brain temperature, energy metabolism and vasospasm on post-ischemic reperfusion injury in gerbil brain; 41st Annual meeting on Oxygen Transport to Tissue, Hanover, USA, 20130622-20130626.

(9) Possible involvement of NR2B subunit in septic encephalopathy. Nao Yoshikawa, Yukio Imamura, Yuki Murakami, Satoko Mitani, Naoya Matsumoto, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu and Akitoshi Seiyama, Japan Neuroscience Society June 20-June 23 (2013) 京都国際会議場, 左京区, 京都

(10) Satoko Mitani and Yukio Imamura 他 7 名. The relationship between PTSD and lifestyle-related diseases. The 11th Asia-Pacific Conference on Emergency and Disaster Medicine, Sep. 26-Sep. 29 (2012) Bali, Indonesia,

[図書](計 4 件)

(1) Yukio Imamura, Shota Hori, Naoya Matsumoto, Kazuma Yamakawa, Junichiro Nakagawa, 他10名, Book title: Encephalopathies: Symptoms, Causes and Potential Complications, Chapter title: Septic encephalopathy; 出版社: Nova Publisher (2013) 総ページ186(頁163-176). ISBN: 978-1-62257-766-8 査読有

(2) Kevin McCairn, Yukio Imamura, 他1名. Book title: Tourette Syndrome: Animal model of tics; 出版社: Oxford University Press (2013) 15: 総ページ 714 (頁 329-358) ISBN: 978-0-19979-626-7 査読有

(3) Yuki Murakami, Yukio Imamura, Satoko Mitani, Masato Hoshi, Yuko Arioka, Yasuko Yamamoto, Akitoshi Seiyama and Kun iaki Saito, Book title: Tumor necrosis Factor: Structure, Enzyme Regulation an

d Role in Health and Disease; 出版社: *No va Publisher* (2013) 総ページ140:(頁1-28) ISBN: 978-1-62417-721-7
(4) Yukio Imamura, Huan Wang, Naoya Matsumoto, Hiroshi Ogura, Takeshi Shimazu, Takashi Jin and Akitoshi Seiyama. 署名: Neurochemistry, Neurochemistry in the pathophysiology of septic encephalopathy. 出版社: In tech open access publisher. (2012) 総ページ 440 (頁 149-165). 査読有

〔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

今村 行雄 (IMAMURA yukio)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員
研究者番号: 90447954

(2)研究分担者

松本 直也 (MATSUMOTO naoya)
大阪大学医学系研究科・救急救命センター・招聘教員
研究者番号: 50359808

精山 明敏 (SEIYAMA akitoshi)
京都大学医学研究科・人間健康科学専攻・教授
研究者番号: 70206605

神 隆 (JIN takashi)
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー
研究者番号: 80206367

三谷 智子 (MITANI satoko)

岐阜医療科学技術大学・保健科学部・教授
研究者番号: 30378757

村上 由希 (MURAKAMI yuki)
同志社大学・研究開発推進機構・助教
研究者番号: 50580106

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

吉川 直 (YOSHIKAWA nao)
京都大学医学研究科・人間健康科学専攻・大学院生

王 歆 (WANG huan)
京都大学医学研究科・分子医学系専攻・大学院生