

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462842

研究課題名(和文)敗血症関連脳症の病態解明と新たな治療戦略

研究課題名(英文) Pathology Elucidation and a Novel Therapeutic Strategy Against Sepsis-associated Encephalopathy

研究代表者

新山 修平 (NIYAMA, SHUHEI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：40258455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、重症敗血症患者は全世界で毎年数千万人が罹患し、特に脳症の併存は死亡率を上昇させる。我々はマウス敗血症モデルを作成し、敗血症関連脳症の機序解明を試みた。モデルは盲腸結紮穿孔モデルを使用した。エストロゲン、L-キヌレニン投与が生存率を改善することを確認し、腹腔滲出細胞でキヌレニン受容体のアリール炭化水素受容体とトリプトファン分解酵素であるTryptophan 2,3-dioxygenaseのmRNA発現を測定したところキヌレニン経路の関与が示唆された。一方、その過程で本モデルの欠点の一つとされる腹腔内膿瘍形成を高率にコントロールできる改良型モデルの作成に成功した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, tens of millions of people worldwide develop severe sepsis every year, with comorbid encephalopathy increasing mortality in particular. We developed a mouse sepsis model in an attempt to elucidate the mechanisms of sepsis-associated encephalopathy. The model we used was the cecal ligation and puncture (CLP) model. After confirming improvements of survival rate via estrogen and L-kynurenine administrations, detection of mRNA expressions of a kynurenine receptor, the aryl carbohydrate receptor, and a tryptophanase, the tryptophan 2,3-dioxygenase, in peritoneal exudate cells were determined, indicating the involvement of the kynurenine pathway. In this process, we successfully generated a modified model in which intraperitoneal abscess formation, which is considered to be a defect of the original model, can be highly-controlled.

研究分野：救急、集中治療

キーワード：敗血症 脳症 エストロゲン キヌレニン経路 盲腸結紮穿孔モデル

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症は、現在でも治療に難渋する全身性炎症疾患である。近年、炎症性サイトカインをはじめとする種々の炎症性メディエーターの関連が強く示唆されている。臨床における敗血症、特に敗血症性ショックに対する治療は現在のところ、適切な感染巣のコントロール、抗菌薬投与、輸液、カテコラミン投与、血液浄化療法がその大半を占め、抗炎症作用を有するその他の有効な薬物療法は現時点では定かでない。

そこで我々は敗血症動物モデルを作成し、炎症性サイトカイン制御を介した病態解明と治療法を模索した。一つは炎症性サイトカイン制御を介し抗炎症作用が示唆されている性ステロイドホルモン(予後に性差の関与が示唆されている) またもう一つは、そこに炎症性サイトカインの介在が示唆されているキヌレニン経路に着目した。

## 2. 研究の目的

近年、敗血症の病態生理解明は長足の進歩を遂げている。最新の定義では、感染症に対する制御不能な宿主反応に起因した生命を脅かす臓器障害とされ、炎症誘発性サイトカインや抗炎症性サイトカインが産生されていることが病態の基本であると理解されるようになった。実際の集中治療領域の重症患者でも高サイトカインの制御を行うことで生命予後が改善されるといった報告が注目されるようになった。

そのような中、敗血症関連脳症合併が予後不良の原因の一つとされ、また生存者においても ICU 退出後も続く認知機能障害に関連した社会的問題が生じているが、いまだその病態は明らかでなく、また決定的治療法も定かでない。これまでに敗血症については心臓、腎臓では多くの実験がなされているものの、脳についての報告は少ない。

そこで、申請者らは敗血症動物モデル(盲腸結紮穿孔モデル)を作成し、敗血症関連脳症に対しての病態解明に主眼を置き、サイトカイン制御を介した治療法を模索した。前述のように近年では敗血症における生存率が男性に比し女性で高いといった報告がなされており、予後に性差の関与が示唆される。病態解明に使用する物質として一つは炎症性サイトカイン制御を介した神経細胞保護効果が示唆されている性ステロイドホルモン(今回エストロゲンを中心に)に着目した。またもう一つは、うつ病や自閉症との関連、さらに重症疾患患者でのせん妄のリスクファクターとして注目されているキヌレニン経路(セロトニンの前駆物質トリプトファンの代謝経路の一つ)に焦点を当て検討を行った。キヌレニン経路には性ステロイドホルモ

ン(エストロゲン)が作用するという報告もあるが、いまだ中枢神経系では不明な点も多い。この経路では炎症性サイトカインがトリプトファン代謝のキヌレニン経路の律速酵素であるインドールアミン酸素添加酵素(Indoleamine 2,3-dioxygenase: IDO)、トリプトファン代謝酵素(Tryptophan 2,3-dioxygenase: TDO)を賦活化し、結果的にセロトニンを減少させることで敗血症時に中枢神経系活動に負の影響を与えていることが示唆される。本研究モデルにおいてエストロゲンの神経細胞保護効果あるいは IDO、TDO の神経細胞障害性への関与に着目し、新たな治療法を模索した。

## 3. 研究の方法

(1) 使用動物の性質: 盲腸結紮穿孔モデル(以下、CLP)は敗血症研究のゴールドスタンダードモデルとして汎用されている。今回 C57BL/6 マウス(12 週齢)を使用した。

吸入麻酔(イソフルラン)下にマウス CLP モデル作製: 下腹部に約 1-2cm の皮膚切開を加え、続いて腹膜も切開する。その後、回盲部を結紮し、盲腸部を 21G 針で貫通穿刺する(Rittirsch ら<sup>1)</sup>は穿刺部位によって致死率 100%の high grade モデルと致死率約 60%の mid grade モデルを作製できることを発表している)。Sham 手術では上記と同様に行うが盲腸の穿刺を行わない。

各種薬物投与: CLP モデル・sham モデルを作製し、薬物投与は CLP モデルにエストロゲンアゴニスト(17 $\beta$ -エストラジオール)を、浸透圧ポンプを用いて行い、L-キヌレニンは腹腔内投与にて行い、また sham モデルに対して生食を腹腔内投与した。17 $\beta$ -エストラジオールはプロピレングリコールを溶媒とし、およそ 100 mM/L の薬液を作成した。L-キヌレニンは PBS を溶媒とし、5 mg/0.5ml の濃度で作成した。

生存率: 生存率の比較は、主に CLP に両薬物を各々投与した群と CLP 単独群(コントロール群)で行い、生存率のエンドポイントは術後 7 日目とした。17 $\beta$ -エストラジオール投与については CLP モデル作製時に、薬物注入した浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込み閉腹した。コントロール群は溶媒のみを注入した浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込み閉腹した。L-キヌレニンについては CLP 作製 1 時間前、CLP 作製同時期、CLP 作製後 1 時間および 3 時間投与を行い、各々の生存率を調べた。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて計算し、2 つの生存曲線は、log-rank 検定を行った。

CLP モデル作製後の炎症性変化を測定する目的で、腹腔滲出細胞 (PECs) でキヌレニン受容体の aryl hydrocarbon receptor (AhR) と TD02 の mRNA を測定した。

(2) 敗血症研究のゴールドスタンダードモデルとされる CLP モデルであるが、大きな欠点である「腹腔内膿瘍形成」については従来それを防止する方法がなかった。「腹腔内膿瘍形成」は一旦形成されると治療方向に働くために、動物実験系における治療効果の解釈を難しくする。今回、上記実験過程で、腹腔内膿瘍形成を軽減するための改良型 CLP モデル作製の検討も新規に行った。我々は腹腔内脂肪組織が膿瘍形成に重要な役割を演じているとの仮説をたて検証した。腹腔内脂肪切除群と腹腔内脂肪非切除群で生存率、肉眼的所見と CLP の炎症の強弱を表すと考えられているインターロイキン - 6 (IL-6) を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) CLP モデルでの 17 - エストラジオールと L-キヌレニンの薬物効果の検証を行った。

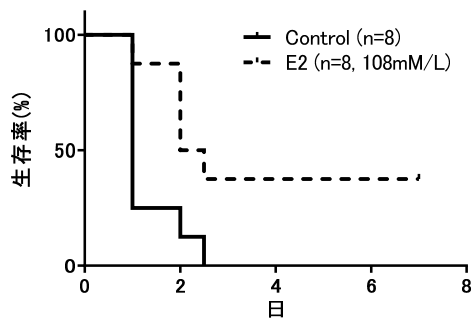


図 1. コントロール群とエストラジオール群の生存率

術後 7 日目の生存率は、17 - エストラジオール (E2) 群で約 38%、コントロール群で 0% であり、E2 群の生存率が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

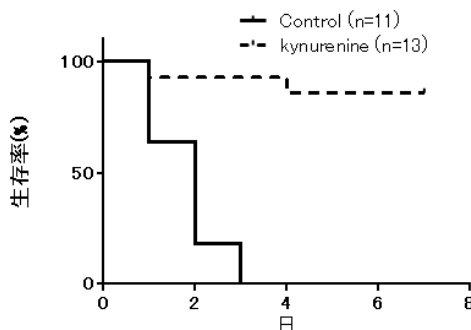


図 2. コントロール群とキヌレニン前投与群の生存率

術後 7 日目の生存率は、キヌレニン前投与群で 85%、コントロール群で 0% であり、キヌレニン前投与群で有意に高かった ( $P < 0.0001$ )。

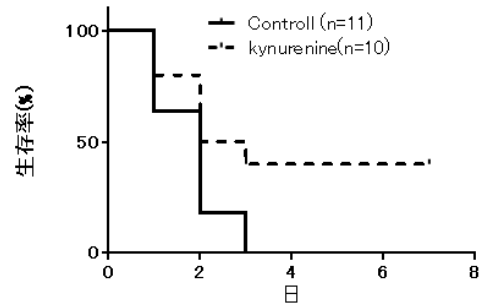


図 3. コントロール群とキヌレニン同時投与群  
術後 7 日目の生存率は、L-キヌレニン同時投与群で 40%、コントロール群で 0% であり、L-キヌレニン群の生存率が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

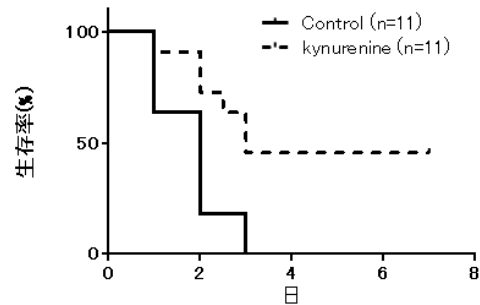


図 4. コントロール群とキヌレニン 1 時間後投与群

術後 7 日目の生存率は、CLP 作製から 1 時間後に L-キヌレニンを投与した群で 38%、コントロール群で 0% であり、1 時間後キヌレニン投与群の生存率が有意に高かった ( $P < 0.001$ )。

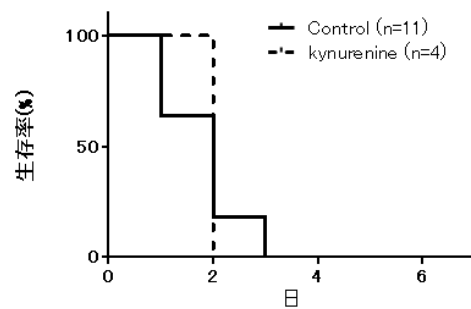


図 5. コントロール群とキヌレニン 3 時間後投与群

術後 7 日目の生存率は、CLP 作製から 3 時間後に L-キヌレニンを投与した群で 0%、CLP 単独群で 0% であり両群間で有意差を認めなかった。

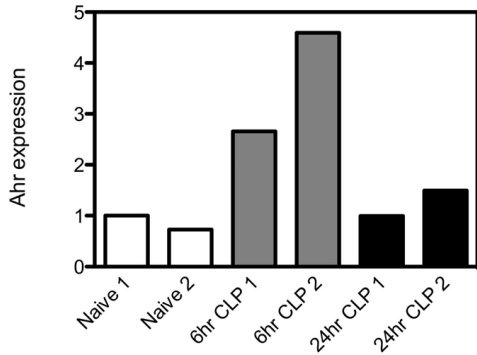


図 6 . Naive, CLP 後(6、24 時間) の Ahr 発現比較

腹腔滲出細胞から得られた Ahr 発現比較において、CLP 作製から 6 時間後は Ahr 発現が数倍になり、24 時間後はほぼ元に復するよう傾向が認められた。

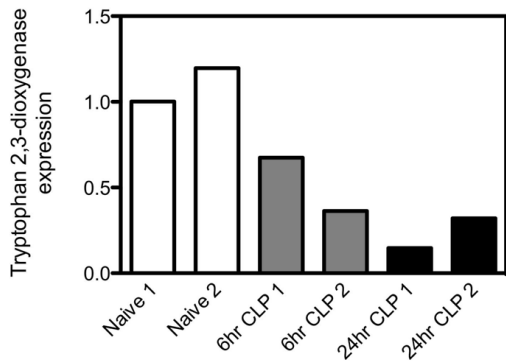


図 7 . Naive, CLP 後(6、24 時間) の TDO2 発現比較

腹腔滲出細胞から得られた TDO2 発現は CLP 作製から 6 時間、24 時間後に経時的に減少している傾向が認められた。

以上の結果より、17 エストラジオールと L-キヌレニンが敗血症モデルマウスの生存率を有意に改善することを見出した。また、腹腔滲出細胞でキヌレニン受容体の Ahr と TDO2 の mRNA の測定結果よりキヌレニン経路の関与が示唆された。

(2) 我々は本実験過程中にマウス CLP モデルにおいて腹腔内脂肪組織が腹腔内膿瘍形成に重要な役割を演じているとの仮説をたて新規に検証した。腹腔内脂肪組織切除群と腹腔内脂肪組織非切除群で生存率、肉眼的所見と CLP の炎症の強弱を表すと考えられている IL-6 を調べた。以下に結果を示す。

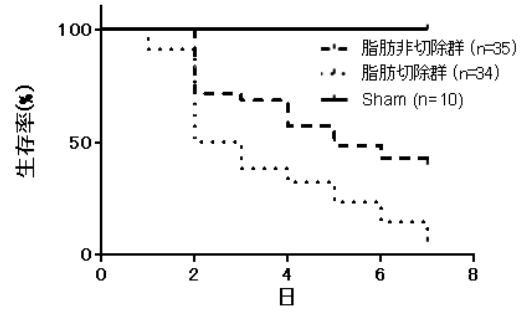


図 8 . シャム群、脂肪非切除群と脂肪切除群の生存率

CLP 作製後 7 日目の腹腔内脂肪組織非切除群 (n=35)、腹腔内脂肪組織切除群 (n=34) およびシャム群 (n=10) の生存率はそれぞれ 40%、5.8%、100%であった。脂肪非切除群と脂肪切除群の 2 群間で生存率に有意差を認めた (P<0.001)。

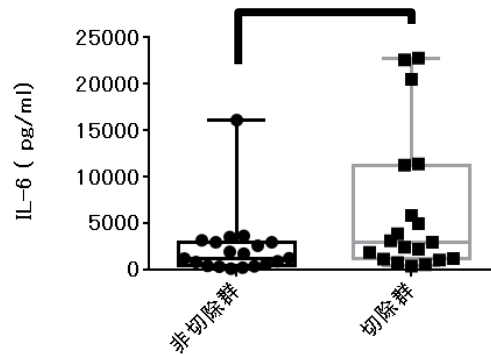


図 9 . 脂肪非切除群と脂肪切除群の IL-6 の比較

CLP 作製後 12 時間後の血中 IL-6 値を測定した。脂肪非切除群での中央値は 1300 (552-3000) pg/ml (n=19)、脂肪切除群での中央値は 3000 (1224-8595) pg/ml (n=19) で、脂肪群が有意に高かった (P<0.05)。

腹腔内脂肪非切除群では術後 7 日目の生存率は 40%と高値であり、その後生存マウスの腹腔内を麻酔下に確認したところ、肉眼的には完全に盲腸が脂肪組織で被覆されており、その被覆された組織を開放すると全例で壊死した盲腸と膿瘍が確認できた。死亡例についてはその他の要因、例えば盲腸の被覆が不十分であったなどの所見がみられた。

以上のことから、CLP 作製後、腹腔内の脂肪組織が主体となって癒着が起こり、結果として膿瘍形成が生じていると考えられた。

<引用文献>

1) Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, Nat Protoc. 2009;4(1):31-6. DOI: 10.1038/nprot.2008.214

## 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1件)

Shuhei Niiyama, Osamu Takasu, Teruo Sakamoto, Intraperitoneal adipose tissue is strongly related to survival rate in a mouse cecal ligation and puncture model, Clinical & Translational Immunology, 査読有, 5, 2016, e64  
DOI:10.1038/cti.2016.3

[学会発表](計2件)

新山 修平, 花田 雄樹, 外角 直樹 他, 敗血症動物モデルでのエストロゲン, キヌレニンによるマウス生存率改善作用, 第36回日本トリプトファン研究会, 2014/10/17, 旭川医科大学看護学科棟大講義室(旭川).

Takasu O, Tashiro K, Niiyama S et al, Phase angle in bioimpedance analysis and fluid status in critically ill patients, World Congress of the Intensive and Critical Care Medicine, 2015/8/31, Souel, Korea.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

新山 修平 (NIIYAMA, Shuhei)

久留米大学・医学部・麻酔学講座・准教授  
研究者番号: 40258455

(2)研究分担者

高須 修 (TAKASU, Osamu)

久留米大学・医学部・救急医学講座・教授  
研究者番号: 90236216