

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462343

研究課題名(和文)水チャンネルに注目した重症感染症に伴う中枢神経障害の発生機序解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of central nervous system disorder caused by severe infections focused on water channel and development of novel therapeutic methods.

研究代表者

徐 民恵 (So, MinHye)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60381886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：重症感染症に伴う高次脳機能障害の発症機序の解明と、新たな治療戦略の確立を目的とした。

培養細胞への炎症性サイトカインやエンドトキシンの投与により、水チャンネルであるアクアポリン9(AQP9)の発現低下を確認した。また、敗血症モデルマウスの脳で、炎症性サイトカインの上昇とAQP9の発現低下を確認し、AQP9の低下は、デキサメサゾンの投与により抑制できた。次に、敗血症モデルマウスの行動実験で高次脳機能障害を確認し、デキサメサゾンの投与により改善傾向を認めた。さらに、培養アストロサイトにエンドトキシンを投与し、cDNAマイクロアレイを行い、発現が変動した多くの因子が確認できたため、絞り込みを行っている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the pathogenesis of higher brain dysfunction accompanying severe infection and establish a new treatment strategy.

The expression of aquaporin 9 (AQP 9), a water channel, was confirmed to be decreased by administration of inflammatory cytokine or endotoxin to cultured cells. In addition, we confirmed elevation of inflammatory cytokine and decreased expression of AQP9 in the brain of sepsis model mouse, and the decrease of AQP 9 could be suppressed by administration of dexamethasone. Next, behavioral experiments of sepsis model mice confirmed higher brain dysfunction, and an improvement trend was confirmed by administration of dexamethasone. Furthermore, endotoxin was administered to cultured astrocytes, cDNA microarray was performed, and many factors whose expression fluctuated were confirmed, so we will narrow down.

研究分野：麻酔科学

キーワード：水チャンネル 高次脳機能 敗血症 炎症

1. 研究開始当初の背景

医学が進歩した現代においても、重症感染症患者の救命率の向上は重要な課題である。重症感染症に伴う腎機能障害、心機能障害、呼吸機能障害などと同様に、中枢神経機能障害も大きな問題である。中枢神経機能障害の中でも、せん妄などの高次脳機能障害は、重症敗血症患者の 23% に発生するとの報告がある (Sprung CL *et al.*: Crit Care Med, 1990)。集中治療室における高次脳機能障害は、在室日数の延長や死亡率の増加との関与も報告されており (Eidelman LA *et al.*: JAMA, 1996)、患者の不利益となるばかりでなく、医療経済的にも大きな問題である。しかしながら、その発症機序はほとんど解明されておらず、その予防法も明確ではなかった。

申請者らは、脳浮腫における水チャネル<アキュアポリン (AQP)> の果たす役割に注目して、脳における AQP に関して国内外のグループの中でも早期から研究を開始していた。以前から、AQP9 の発現調節機構や脳浮腫の病態に果たす AQP9 の機能について検討を進めてきており、基礎的知見を蓄積していた (Arima H *et al.*: J Biol Chem, 2003、Ito H *et al.*: J Neurochem, 2006)。また、水通過以外の AQP の新規機能に注目した一連の研究の中で、AQP が高次脳機能障害に関与する可能性を示唆するデータを得ていた。このことから、重症感染症に伴う中枢神経障害の発生機序に、AQP が関与する可能性を着想した。

2. 研究の目的

重症感染症に伴う高次脳機能障害は、患者の社会復帰を妨げ、入院期間延長など社会的な不利益も大きい。これまで十分な対策や治療法確立は行われていなかった。そこで、本研究課題では、重症感染症に伴う高次脳機能障害の発生機序を明らかにし、新たな治療戦略を確立することを目的とした。これまで申請者は水チャネルであるアキュアポリン 9 (AQP9) の中枢神経における機能を解析してきたが、最近、水を通す機能以外に高次脳機能に関与する可能性を得ているので、AQP9 と高次脳機能障害との関与に注目し検討を進め、発展的に AQP9 以外の関与分子も検索し、より治療効果の高い方法の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 培養アストロサイトにおける炎症による AQP9 発現の変化

単純なアストロサイト培養系を用い、エンドトキシンや各種サイトカインによって AQP 発現がどのように変化するかを検討した。培養アストロサイトにエンドトキシンあるいは炎症性サイトカイン (IL-1、TNF- α 、IL-6) を投与し、AQP の発現量を転写活性・mRNA・蛋白質のレベルで、ルシフェラーゼアッセイ、RT-PCR、ウエスタンブロットにて、それぞれ評価した。

(2) 敗血症マウスにおける AQP9 発現の変化と高次脳機能障害への関与

(1) でアストロサイトにおける AQP9 発現の低下を確認した後、動物モデルにおいても同様の現象を確認した。盲腸結紮穿孔刺腹膜炎マウスモデル (cecal ligation and perforation; CLP モデル) を作成し、重症感染症が起こった際に、脳における AQP9 の発現が低下するかどうかを検討した。AQP9 の発現は、ウエスタンブロット法と免疫化学組織染色により検討した。

高次脳機能検査は、活動性、水迷路、恐怖条件付け、運動調節能の評価を行った。方法は、当該研究室で確立したものを適応した (Narimatsu N *et al.*: J Pharmacol Exp Ther, 2009)。

(3) AQP9 ノックアウトマウスにおける高次脳機能障害の確認

(2) において検討する AQP9 発現と高次脳機能障害浮腫との関連性をより確実に証明するために、AQP9 ノックアウトマウスにおける高次脳機能を解析を計画した。このマウスに対し、(2) と同様に様々な高次脳機能を評価することにより、AQP9 の高次脳機能への関与を検討することを予定した。

(4) 敗血症マウスにおける AQP9 発現増強薬の効果の確認

申請者の研究室では、ステロイドがアストロサイトにおける AQP9 の発現を増加させることを確認している。そこで、(2) と同様に CLP モデルを作成し、デキサメタゾンを腹腔内投与し、その効果を検討した。

まず、ウエスタンブロット法と免疫化学組織染色を用い、デキサメタゾンの投与により AQP9 の発現量が増加することを確認し、生存率や高次脳機能の改善を検討した。ま

た、副作用についても慎重に観察した。本研究は、(1)～(3)と同様の実験手技を用いた。

さらに、ステロイド以外の AQP9 発現増強薬を探索し、その効果を同様に検討した。デキサメタゾンを含めた AQP9 発現増強薬の臨床応用も視野に入れ、研究を進めた。

(5) 重症感染症に伴う高次脳機能障害発症へ関与する分子の検索

AQP9 だけでなく、重症感染症に伴う高次脳機能障害に関与する分子を検索することにより、AQP9 発現増強薬との相乗効果がある治療法の開発へのヒントとするべく研究を行った。候補分子の検索は、名古屋市立大学共同研究教育センターにおいて、既に確立されている DNA マイクロアレイを用いて行った。

4. 研究成果

(1) アクアポリン 9 の中枢神経系における発現調節機構

AQP9 の中枢神経系における発現調節を解析した。AQP9 はアストロサイトにのみ発現し、神経細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイトには発現していないことを確認した。培養アストロサイトにおける AQP9 の発現を mRNA は RT-PCR で、蛋白質はウエスタンブロットにより定量的に測定し、量測定系が問題なく機能することを確認した。次に、培養アストロサイトにエンドトキシン、TNF- α 、IL-1、IL-6 を投与し、同様に AQP9 の発現量を測定した。エンドトキシンと TNF- α により、AQP9 の発現が低下する傾向を確認できた。また、この AQP9 低下はプロテインキナーゼ A が関与する可能性が示唆された。炎症により AQP9 が低下することで、脳内へのエネルギー供給の低下や乳酸代謝の異常が生じることにより、脳内炎症時には恒常性が破たんする可能性が示唆された。

(2) 敗血症マウスモデルの確立

CLP による敗血症マウスモデルの確立を行った。モデルは C57BL/6 マウスを用いた。2cm の腹部正中切開を行い、盲腸を取り出し、盲腸間膜を切離した。盲腸末端から 2cm の部分を結紮後、22G 針で 1 回穿刺し、還納した。この方法により、安定した腹膜炎による敗血症モデルを確立した。

(3) 敗血症マウスにおける AQP9 発現の変化

CLP モデルの脳における AQP9 の発現を検討したところ、上昇している傾向を確認した。さらに、培養アストロサイトに炎症惹起物質を投与するモデルに、デキサメタゾンを投与したところ、AQP9 の低下が抑制された。そこで、CLP モデルにデキサメタゾンを投与したところ、脳内の AQP9 の発現低下が抑制された。

(4) 敗血症マウスにおける高次脳機能障害

マウス (C57BL/6 マウスおよび ddY マウス) の高次機能検査として、情動性を検討するオープンフィールドテスト、不安行動を検討する明暗箱テスト、うつ状態を評価するテールサスペンションテスト、学習・記憶を検討する新規物体認識試験の設定を行った。コントロールの状態を、安定して検査できるようになった。そこで、C57BL/6 マウスを用いて CLP モデルを作成し、各種テストを行ったところ、全ての検査で異常を示す傾向にあったが、さらなる確認が必要と考えている。

また、デキサメタゾンの投与により、これらの異常は改善傾向にあった。

(5) AQP9 ノックアウトマウスにおける高次脳機能障害

AQP9 ノックアウトマウスの入手に時間がかかり、検討にいたらなかった。

(6) 重症感染症に伴う高次脳機能障害発症へ関与する分子の検索

AQP9 以外の高次脳機能を悪化させる因子を見出すべく、培養アストロサイトにエンドトキシンを投与し、mRNA を回収し、cDNA マイクロアレイを行った。発現が変動する多くの因子を見出すことができたため、今後、候補の絞り込みを行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徐 民恵 (SO, MinHye)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60381886

(2)研究分担者

祖父江 和哉 (SOBUE, Kazuya)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90264738