

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893290

研究課題名(和文)重症敗血症後の長期認知機能障害機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms underlying chronic cognitive impairment after recovery from severe sepsis.

研究代表者

山田 真吏奈 (YAMADA, Marina)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70508621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Post Intensive Care Syndrome(PICS)に対する有効な治療法の開発が期待されている。本研究では、PICSの病態解明および治療薬開発を試みる為に、PICSの中で特に脳機能障害を再現するモデルを作成した。このモデル動物では、急性期に炎症性サイトカインの上昇、大脳中隔と海馬のグリオーシスなどが観察され、慢性期には短期記憶障害、大脳中隔のコリン作動性神経と海馬神経の減少、シナプス可塑性の低下が観察される。このモデルに対して、PICS治療薬シズとして期待される神経保護因子、Humanin G (HNG)を投与すると、いずれのパラメータも改善され、脳機能障害が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Marked increase in survival after critical conditions, such as severe sepsis, have led us to further improve long-term illness described as post-intensive care syndrome (PICS), which covers both physical and psychiatric dysfunction among patients recovered from intensive care. The aim of the study was to elucidate the mechanisms underlying neuropsychiatric impairment in PICS. We developed murine PICS model by cecal ligation and puncture (CLP). CLP-induced sepsis caused acute increase in inflammatory cytokines and induced gliosis in the central nervous system, leading to working memory impairment in Y-maze. Administration of a neuroprotective peptide named humanin G (HNG) significantly suppressed acute inflammatory responses in CLP mice. HNG treatment, also, attenuated memory impairment, chronic loss of cholinergic neurons in the basal forebrain and decrease in synaptic plasticity of hippocampal neurons in CLP mice.

研究分野：救急医学

キーワード：感染症 脳・神経障害 敗血症 行動薬理

1. 研究開始当初の背景

集中治療の進歩により、これまでは救命できなかった重症敗血症患者が急性期を乗り越え、生存する率が向上している。その一方で、集中治療室に入院後の生存患者においては、脳機能障害に起因する、記憶障害、ストレス症状、うつ病、倦怠感、長期的筋力低下が高頻度に生じて、生活の質(quality of life: QOL)が低下することや社会復帰に支障を来す例が報告されるようになった^{1,2}。これを受けて、2012年 Society of Critical Care Medicine の合同 Meeting において Post-intensive care syndrome (PICS) という概念が提唱された³。PICS の対策は、患者の QOL の保持、患者関係者の負担の軽減、国の医療費削減につながることから、社会全体としての急務とされている。

2. 研究の目的

本研究では、PICS の病態解明および治療薬開発を試みる為に、PICS モデルを構築した。とくに、PICS の中でも脳機能障害を再現するモデルの作成を試みた。また、このモデルを用い、治療薬シーズとして期待される神経保護因子:Humanin G (HNG)の効果を検討した。

3. 研究の方法

PICS モデルとしては、敗血症研究で使用されている盲腸結紮穿孔 (Cecal ligation and puncture: CLP)の手法を改良することで⁴、重症敗血症後に脳機能障害が誘導されるモデルマウスの作成を試みた。

マウスは雄の ICR マウスを使用した。マウスは通常の SPF (specific pathogen free) 環境で飼育し、12時間の昼夜間隔、室温制御は 23 ± 1 、湿度は $50\% \pm 10\%$ 、自由摂餌摂水条件のもとで飼育した。実験は「日本医科大学動物実験ガイドライン」に準拠した。

PICS モデルの作成は、麻酔下で腹側中心部の皮膚および腹壁を切開、盲腸を引き出し、引き出した盲腸を結紮、盲腸の結紮部に針を穿孔、盲腸を腹腔内に戻し、腹壁および皮膚の切開部を縫合した。

脳機能障害を評価する行動試験は CLP を施行前と後、7、14、21日に Open field test (OF, 図 1A)によって運動機能および探索能を、Y-maze test (YM, 図 1B)によって短期(作動)記憶 (working memory) の評価を実施した。

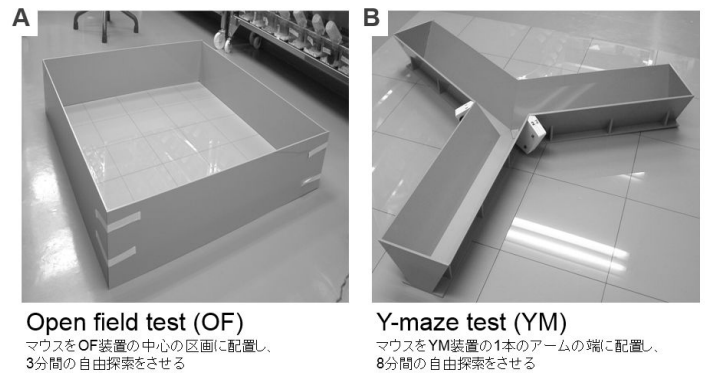


図1 行動試験

Humanin は 0.75 mg/kg/BW で4日間、腹腔内投与した(図 2)。

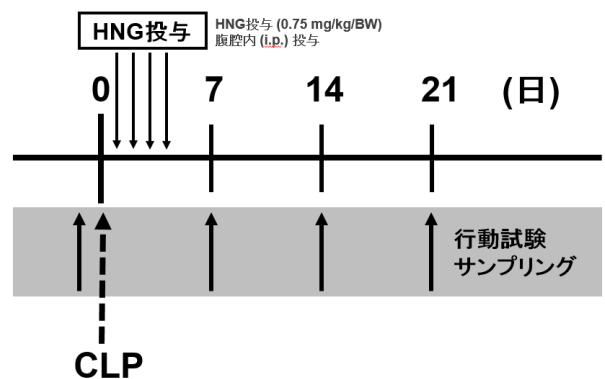


図2 実験日程

4. 研究成果

PICS モデルとして 盲腸の結紮する長さ、針の太さ、 穴を開ける数の条件を検討した結果、 盲腸を 1.8cm の長さで結紮、 針の太さ 22G 針で、 穴を 3 回穿刺する条件において(図 3)、7 日目から脳機能障害が観察され、21 日目以降も持続されることが観察された。経時的な病理変化を血液と臓器を用いて検討した。その結果、急性期には炎症性サイトカイン(TNF、IL1、IL6)の上昇、大脳中隔と海馬の GFAP と Iba1 陽性細胞の増加が観察された。また、PICS モデルで観察された行動学および病理的变化は HNG 投与によって改善していた。

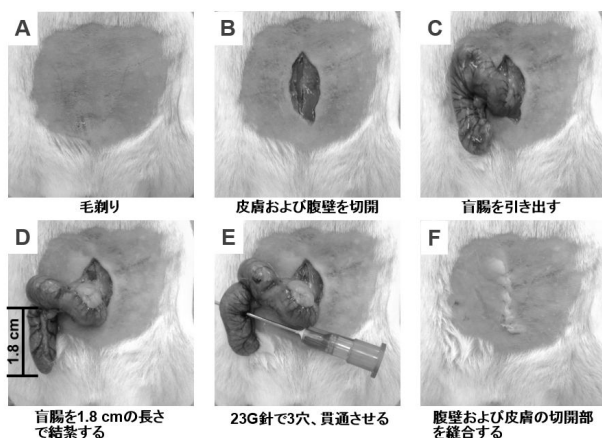


図3 PICSモデル(CLP)

CLP モデルの改良により、重症敗血症後の脳機能障害を再現する PICS モデルを作成した。このモデルは、人において敗血症の重症度と脳機能障害の正の相関が報告されており¹、また、PICS モデルでの脳機能障害と病理組織学的変化が人の臨床状態に類似していたことから、病態解明および治療薬を検討するモデルとして最適と考えられた。構築した PICS モデルは重症敗血症後の脳機能障害機序の解明および治療薬開発に大きな武器となり、PICS 対策において大きな一歩を踏み出すと考えている。

神経保護因子HNの配列14番目のセリンをグリシンに置換したことにより 1000 倍強い活性を持つ HNG⁵(図 4)の治療効果を同モデルで検討した結果、モデル作成後に生じる行動学および病理変化が HNG 投与群で改善していた。

Humanin (HN)



図4 HNおよびHNGの配列

本研究で作成した PICS モデルを応用して、HNG 投与量と効果の相関、経時的変化の研究を今後進める予定である。

【引用文献】

1. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, et al: Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. JAMA.: 304(16):1787-1794, 2010
2. Sukantarat KT, Burgess PW, Williamson RC, et al: Prolonged cognitive dysfunction in survivors of critical illness. Anaesthesia.: 60(9):847-853, 2005
3. Needham DM, Davidson J, Cohen H, et al: Improving long-term outcomes after discharge from intensive care unit: report from a stakeholders' conference. Crit Care Med.: 40(2):502-509, 2012
4. Toscano MG, Ganea D, Gamero AM.: Cecal ligation puncture procedure. J Vis Exp.: 2011
5. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, et al: A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. Proc Natl Acad Sci U S A.: 98(11):6336-6341, 2001

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 4件)

山田真史奈、松田明久、千葉知宏、相磯貞和、増野智彦、松本尚、宮下正夫、横田裕行、重症敗血症モデルマウスにおけるS14G-Humaninの効果、第20回エンドトキシン血症救命治療研究会、主題 バイオマーカーを考える-3、2016年1月29日、東京 野村コンファレンスプラザ日本橋、口頭発表

山田真史奈、松田明久、増野智彦、松本尚、横田裕行、宮下正夫、重症敗血症後の脳機能障害モデルの確立、第22回外科侵襲とサイトカイン研究会、口演 3-4、2015年12月12日、京都 京都市国際交流会館、口頭発表

山田真史奈、松田明久、千葉知宏、相磯貞和、増野智彦、松本尚、宮下正夫、横田裕行、脳神経障害に対するHumanin G (HNG) の治療効果、第28回日本脳死・脳蘇生学会総会、1005、2015年7月5日、名古屋 名鉄グランドホテル、口頭発表

山田真史奈、松田明久、千葉知宏、相磯貞和、増野智彦、松本尚、横田裕行、宮下正夫、重症敗血症後の脳機能障害に対するHumanin G (HNG) の治療効果、第30回日本Shock学会総会、K-03、2015年5月23日、東京 京王プラザホテル八王子、口頭発表

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田真史奈 (YAMADA, Marina)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70508621

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

宮下正夫 (MIYASHITA, Masao)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：70229847

横田裕行 (YOKOTA, Hiroyuki)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60182698