



Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in mice causes apoptosis

Nishimura, Yoshiro

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2017-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6984号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006984>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in mice causes apoptosis

低酸素後の 100%酸素による蘇生はマウス脳のアポトーシスを引き起こす

西村 与志郎、植木 正明、今西 正樹、富田 修平、上野 正樹、森下 淳、西山 隆

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

災害・救急医学

(指導教員： 西山 隆 特命教授)

西村 与志郎

【背景】

低酸素脳症は溺水、窒息、頭部外傷、一酸化炭素中毒などの各種病態により、脳に十分な酸素が供給されない場合に生じる。低酸素後の治療のゴールは、組織に十分な酸素を供給すると同時に、酸素毒性と酸化ストレスを最小化することにある。適切な酸素投与は、低酸素暴露後の脳の回復を考慮すると非常に重要である。しかし、成人の低酸素症に対してどのような濃度の酸素投与が適切であるのか、未だよくわかっていない。

かつて新生児蘇生には一般的に 100%酸素が用いられてきた。しかし、新生児蘇生の際に空気を使用すると 100%酸素を使用した場合と比較して、第一呼吸までの時間と第一啼泣までの時間が有意に短いことが、いくつかの臨床研究で明らかになった。加えて蘇生後の新生児死亡率も空気を使用したほうが 100%酸素を使用した場合に比べて低かった。それゆえ、International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR)は 2010 年、満産期および満産期近くの新生児蘇生には 100%酸素より空気を使用するよう推奨するに至った。

また、いくつかの新生児をモデルにした動物実験において、100%酸素を使用した蘇生により空気を使用した場合と比較して、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) および caspase-3 活性の変動や炎症に関連した強い遺伝子発現が見られた。これらの所見は、成人においても低酸素後の 100%酸素を使用した蘇生がその予後に影響を与えていた可能性を示唆しており、新生児同様 100%酸素の投与が何らかの神経変性をもたらすのではないかとの仮説のもと、その分子機構を明らかにするため本実験を計画した。我々は成人齢マウスにおける 100%酸素による再酸素化（蘇生）の影響を検討するため、脳の炎症性サイトカイン、caspase-3、BDNF それぞれの mRNA を測定した。

【材料および方法】

本実験では 8 週齢の雄 C57BL/6 マウスを使用した。マウスを無作為に 8% 酸素 (4L/min.) 30 分間投与する群 (低酸素暴露群) と実験中空気を投与する群 (コントロール群: C 群, n=23) の 2 群に分けた。低酸素暴露群はさらに、暴露後 60 分を経過してから 21% 酸素 (空気) で 30 分間再酸素化する群 (H21 群, n=23) と 100% 酸素で 30 分間再酸素化する群 (H100 群, n=23) に分けた。30 分間の再酸素化終了後はいずれの群のマウスも、遺伝子発現解析と組織学的解析まで空気下で飼育された。

再酸素化 2.5 時間後に TNF- α mRNA, 5 時間後に IL-1 β mRNA を、9 時間後に caspase-3 mRNA と BDNF mRNA をそれぞれ測定した (各群 n=7)。また、再酸素化 24 時間後に組織学的解析を行うため各群のマウスから脳を取り出し、hematoxylin-eosin 染色を行った上で海馬を観察した (各群 n=5)。

統計学的解析は、TNF- α , IL-1 β , caspase-3, BDNF mRNA の各測定値について Kruskal-Wallis 法のうち Dunn 法を用いて、C 群、H21 群、H100 群の各群間で比較を行った。P<0.05 を統計学的に有意とした。

【結果】

100% 酸素による再酸素化は炎症性サイトカイン mRNA レベルを増加させる

低酸素暴露および再酸素化 2.5 時間後に測定した TNF- α mRNA は、H100 群で H21 群と比較して有意に増加していたが、H21 群と C 群ではその発現に有意差を認めなかった。また、再酸素化 5 時間後に測定した IL-1 β mRNA でも、H100 群で H21 群と比較して有意に増加していた。H21 群と C 群では発現に有意差はなかった。

100% 酸素による再酸素化は caspase-3 mRNA レベルを増加させる

再酸素化 9 時間後に caspase-3 mRNA を測定した。全脳 caspase-3 mRNA 発現は、H100 群、H21 群ともに C 群と比較して有意に増加していた。さらに、H100 群と H21 群との比較では、H100 群のほうが有意に発現増加していた。

低酸素症は BDNF mRNA レベルを増加させる

再酸素化 9 時間後に BDNF mRNA を測定した。BDNF mRNA は、H100 群、H21 群とも C 群と比較して有意に減少していた。H100 群と H21 群との比較ではその発現に有意差はなかった。

組織学的検討

再酸素化 24 時間後に脳を取り出し、組織学的検討を行ったが、3 群いずれも神経細胞死に関連した異常所見は認められなかった。

【考察】

本実験では、低酸素暴露後に 100% 酸素を使用して再酸素化を行うと、21% 酸素を使用した場合に比べて TNF- α , IL-1 β , caspase-3 mRNA の発現を誘導した。さらに、100% 酸素、21% 酸素とも BDNF mRNA 発現を低下させた。本研究は成人の低酸素症に対する 100% 酸素の使用が、神経変性をもたらすかもしれないことを直接的に示す初めてのものである。

脳が正常な機能を維持し生存するためには、迅速かつ持続的な酸素供給が必要である。TNF- α や IL-1 β といった炎症性サイトカインは急性中枢神経障害において著明に増加し、またこれら両メディエーターは低酸素症による虚血性脳症の急性期において非常に重要な役割を果たしている。中枢神経系では様々な刺激によりミクログリアが活性化され、これら 2 つのサイトカインを生

成する。Perez-Pol らはラット低酸素虚血モデルにおいて、虚血後高濃度酸素を投与すると強い炎症性反応を示すことを見いだした。さらに新生児マウス脳で高濃度酸素投与が炎症関連遺伝子の発現を誘導することが示された。別の新生児低酸素症・再酸素化動物モデルにおいて、60%酸素の投与でさえも空気投与と比較して、炎症関連遺伝子 (IL-1 β など) だけでなく、転写調節、DNA 修復に関連した遺伝子発現も増加していた。我々の実験結果は過去に発表されたものと一致していた。炎症は低酸素症・再酸素化によって生じる脳障害の重要な原因の一つと考えられる。我々が本実験で見いだした高濃度酸素投与後の炎症関連遺伝子の発現増加は、炎症が高濃度酸素投与後の脳障害を悪化させる原因の一つであるというエビデンスを支持している。

Caspases はアポトーシスにおける重要なメディエーターである。その中で caspase-3 は多くの重要な細胞蛋白を特異的に切断する death protease である。いくつかの頸動脈結紮低酸素・虚血動物実験モデルにおいて、虚血後 caspase-3 の活性が著明に増加していた。しかし、全脳の低酸素症では部分的な低酸素症（虚血）と異なり、caspase-3 mRNA とその活性とともに、細胞死を伴わず漸増していた。新生児のブタを用いた実験でも、蘇生の際に高濃度酸素の投与を行うと caspase-3 mRNA とその活性がともに増加していた。我々の実験では、100%酸素投与は 21%酸素に比べ caspase-3 mRNA の発現が増加していた。本結果は成人齢マウスにおいても 100%酸素投与による酸素化がアポトーシスを引き起こすことを示しており、過去の新生児動物実験モデルでの結果と一致している。我々の結果において、21%酸素投与では caspase-3 mRNA は TNF- α , IL-1 β の結果同様、発現の増加をみなかったという点が重要であり、このことは高濃度酸素投与がアポトーシスを引き起こしたことを示している。加えて我々は投与した酸素濃度にかかわらず、組織学的には差異を認めなかつ

た。低酸素症後の 100%酸素投与群と 21%酸素投与群間に差が見られなかつた理由はおそらく低酸素の暴露時間に由来すると考えられる。

BDNF は神経細胞の成長と生存を支持する分泌性ペプチドで、neurotrophin family に属する。Solberg らは、新生児ブタにおいて 100%酸素で蘇生された場合は 21%酸素による蘇生と比較して BDNF mRNA の発現が低下していたと報告した。この結果は、100%酸素投与群、21%酸素投与群ともコントロール群に比べて低かった我々の結果と異なっていた。その原因はおそらく我々が使用したマウスの年齢によると思われる。BDNF のレベルは成長とともに変化する。齧歯動物の実験では BDNF は成長とともにおよそ逆 U 字型の変動を示す。新生児において BDNF は caspase-3 を阻害して神経保護的に働き、神経ニューロンを酸化ストレスから保護する。一方成人では BDNF のレベルは低い。BDNF レベルは様々なストレスにより変動する。成人において BDNF が低下していることは、低酸素症・再酸素化による脳障害の治療において潜在的重要性を示しているものと考えられる。

本実験では、3 群間で組織学的差異や細胞死は認められなかった。過去の新生児ブタ実験モデルでは、蘇生時の酸素濃度に由来する組織学的差異はみられなかったと報告しており、我々の結果と一致する。低酸素・虚血とその後の蘇生に伴う細胞死は日単位やむしろ週単位で進行すると言われているため、我々の組織学的検討も 48 時間後にしたほうがよりよかつたかもしれない。

さて、多くの臨床家が今まで成人の蘇生や補助換気に対して、使用できる最高濃度の酸素を使用してきた。ILCOR も使用できる最高濃度の酸素を使用するよう推奨してきた。しかし我々は成人齢マウスの低酸素症に対する過剰な酸素投与は、新生児、小児モデル同様炎症とアポトーシスを引き起こすこと

を示した。これらの所見から、低酸素症後の酸素濃度は成人において神経学的予後に影響することが示唆された。

【結語】

本研究では、成人齢マウス低酸素症後の 100%酸素投与と比較して炎症性サイトカインおよび caspase-3 mRNA の発現を増加させた。本研究では、新生児同様成人に対しても、低酸素症後の 100%酸素投与が有害である理由についてのいくつかの知見を示している。成人低酸素症に本結果を適用するにはさらなる実験が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2712 号	氏名	西村 与志郎
論文題目 Title of Dissertation	<p>低酸素後の 100%酸素による蘇生はマウス脳のアポトーシスを引き起こす</p> <p>Reoxygenation with 100% oxygen following hypoxia in mice causes apoptosis</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 甲村 天乙 Chief Examiner</p> <p>副査 林信 勝 Vice-examiner</p> <p>副査 古屋 敏智 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

満産期および満産期近くの新生児蘇生には100%酸素より空気を使用するよう推奨されている。しかし、成人の低酸素症に対してどのような濃度の酸素投与が適切であるか、未だよくわかっていない。新生児同様100%酸素の投与が何らかの神経変性をもたらすのではないかとの仮説のもと、その分子機構を明らかにするため本実験を計画した。低酸素負荷後の100%酸素による再酸素化(蘇生)の影響を検討するため、成人マウスを用いて脳の炎症性サイトカイン、caspase-3、BDNFそれぞれのmRNAを測定した。8週齢の雄C57BL/6マウスを使用した。マウスを8%酸素30分間投与する群(低酸素暴露群)と実験中空気を投与する群(コントロール群: C群, n=23)の2群に分け、低酸素暴露群はさらに21%酸素(空気)で30分間再酸素化する群(H21群, n=23)と100%酸素で30分間再酸素化する群(H100群, n=23)に分けた。以後はいずれの群も空気下で飼育した。

再酸素化2.5時間後に測定したTNF- α mRNAは、H100群でH21群と比較して有意に増加していたが、H21群とC群ではその発現に有意差を認めなかった。また、再酸素化5時間後に測定したIL-1 β mRNAもH100群でH21群と比較して有意に増加していた。H21群とC群では発現に有意差はなかった。再酸素化9時間後にcaspase-3mRNAを測定したところ、全脳caspase-3mRNA発現は、H100群、H21群とともにC群と比較して有意に増加していた。さらに、H100群とH21群との比較ではH100群のほうが有意に発現増加していた。再酸素化9時間後にBDNFmRNAを測定したところ、BDNFmRNAはH100群、H21群ともC群と比較して有意に減少していた。H100群とH21群との比較ではその発現に有意差はなかった。再酸素化24時間後に脳を取り出し組織学的検討を行ったが、3群いずれも神経細胞死に関連した異常所見は認められなかった。

本実験で見いだした高濃度酸素投与後の炎症性サイトカイン遺伝子の発現増加は、高濃度酸素投与後の炎症による脳障害悪化を推測させる。時間経過の関係から組織学的変化は得られていないがcaspase-3の発現増加は、低酸素負荷後の高濃度酸素投与がアポトーシスを誘導し得ることを示唆した。

本研究は、低酸素負荷後の脳蘇生について、成人齢マウスを用いて高濃度酸素投与の影響を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった炎症性サイトカインおよびcaspase-3 mRNA の発現について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認め。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。