

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10996

研究課題名(和文) 外傷後臓器障害発生における骨軟部組織損傷の役割に関する研究

研究課題名(英文) A clarify of a role of remote organ failure after tissue injury

研究代表者

塚本 剛志 (Tsukamoto, Takeshi)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20626270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの筋骨を細かく碎き(TBX)、それを同種ラットに移植した、動物骨軟部組織損傷モデル(TBXモデル)に出血性ショックを加えたモデル(two-hit model)を使用し、その後の、動物生体に起こる炎症性変化を見る実験を行った。TBXモデルは移植後に、TBX移植量依存性に全身性の炎症変化、腸管運動麻痺を引き起こしたが、出血性ショックを加えたtwo-hit modelは明らかな炎症性変化を起こさなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of inflammatory response after trauma using "Two-hit model". Two-hit model consists of tissue-bone matrix (TBX) model and hemorrhagic shock model. TBX model is a novel model, we developed before. TBX induced a systematic inflammatory response and attenuated a intestinal motility at 21 hours after transplantation of TBX. However "Two-hit model" did not induced inflammatory response in our experiment.

研究分野：外傷学

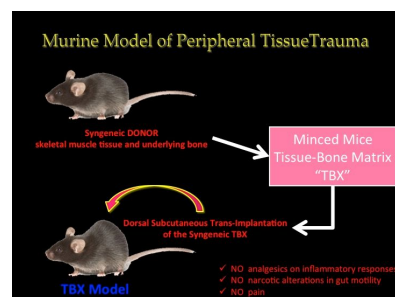
キーワード：骨軟部組織損傷 外傷後臓器障害

## 1. 研究開始当初の背景

外傷による侵襲は、サイトカインをはじめとする炎症性メディエーターを活性化することにより全身性炎症を惹起し、その炎症進展を制御できない場合には多臓器不全 (MODS を引き起こすと考えられる。その死亡率は集中治療の進歩した現在においても依然高いままであり、その発生機序は未だ明らかとなっていない<sup>1)</sup>。MODS は外傷症例において出血性ショックを伴う重症外傷症例の集中治療経過中に見られることが多いため、これまでは主に出血性ショックによる虚血再灌流が臓器障害に与える影響に研究の視点が向けられてきた。しかし、このような重症外傷患者では多くの場合著しい軟部組織損傷を伴っており、この軟部組織損傷が臓器障害の発生に重要な役割を果たしているのではないかとこの発想に至った。実際、近年の研究により、重症外傷後に生じる全身性炎症反応の発症には組織損傷、および組織損傷より放出される内因性因子が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。すなわち、損傷により自らの組織より放出されるミトコンドリア DNA (mtDNA) や high mobility group box 1 (HMGB1)、ヒアルロン酸などの内因性 danger signal は damage-associated molecular patterns (DAMPs) として toll-like receptors (TLRs) や receptor for advanced glycation end products (RAGE) 等のレセプターを介して炎症細胞を活性化し、局所ならびに全身の炎症発生に重要な役割を果たしていると考えられてきている。

動物実験において、出血性ショックに骨軟部組織損傷を組み合わせ、各臓器や全身への影響を観察するモデルはこれまでも多数報告されている。これらの

実験モデルで使用された骨軟部組織損傷は開腹、骨折、筋挫滅等であるが、それらは必ずしも臨床的な外傷を反映しておらず、外傷に伴う疼痛や、鎮痛目的で投与される麻酔薬が外傷後に起こる炎症反応を修飾してしまうなどの欠点が見られた。さらに、これらのモデルでは骨軟部組織損傷の程度 (外傷の重症度) をコントロールすることができず、骨軟部組織損傷そのものが外傷後の炎症、臓器障害に与える影響を検討する有用なモデルが存在しないのが現状である。そこで我々は新しい骨軟部組織損傷モデルを開発した。それは、マウスの四肢・胸郭をミンチし (以下 TBX: tissue bone matrix)、随意量の TBX を同種マウスの背部皮下に移植するものであり (図 1)、以前の我々の研究では、TBX モデルは移植後に、TBX 移植量依存性に全身性の炎症変化、腸管運動麻痺を引き起こすことを報告した。



(図 1)

TBX 移植により、全身性炎症を惹起する可能性があることは分かったが、TBX 移植後にどのような内因性物質が放出されているのかは不明であるため、TBX 移植後の、DAMPs 発現を検討した。

## 2. 研究の目的

TBX 移植後の血漿中の DAMPs レベルを検討する。

## 3. 研究の方法

ラットの筋肉、骨をミンチし、(tissue-bone matrix 以下 TBX)、同種マウスの背部皮下に TBX を移植する外傷モデル (first hit) (図 1) を作製し、その後、同ラットの左大腿動・静脈にカニューレーションを行い、静脈ラインから脱血

を行い、血圧  $30 \pm 2\text{mmHg}$  を 45 分間維持し、その後、脱血した血液とその 2 倍量の生理食塩水を混合し、それを 2 時間かけてラットに返血する（蘇生）、出血性ショックモデル（second hit）を行う。

移植する TBX 量は体重の 5% とし、蘇生が終了後 3, 6, 12, 24 時間後にラットを犠牲死させ、採血を行い、血漿中の DAMPs の一つである High Mobility Group Box 1 (HMGB1) 濃度を測定した。また Two-hit 24 時間後の血漿中 HMGB1 濃度を測定し、TBX 単独または出血性ショック単独のそれぞれ 24 時間後の血漿中 HMGB1 濃度と比較し、Two-hit が炎症性変化を相乗効果として増大するか検討した。

HMGB1 は、PAMPs や DAMPs の刺激によってマクロファージ、あるいは壊死細胞から細胞外に放出される、およそ 215 残基のタンパク質であり、細胞外に放出された HMGB1 は炎症反応を立ち上げるとされている。そのメカニズムは血管内皮細胞に働きかけて VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1)、ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1)、E-selectin などの接着因子の発現を誘導し、好中球や単球の遊走を促し、これら炎症・免疫担当細胞の傷害局所への集積を誘導しているとされ、結果として炎症性サイトカインの産生を促し、炎症反応の増幅を誘導している。傷害局所における HMGB1 は生体防御因子として働いていると考えられるが、敗血症や外傷後に過剰に産生された HMGB1 は致死性因子として働くことが知られている。

#### 4. 研究成果

Two-hit 後の継時的な HMGB1 濃度（炎症性変化）の変化は、Two-hit 後 HMGB1 濃度は増加し、24 時間後も増加傾向であった（図 2）。

Two-hit による炎症性変化の相乗効果をみる実験では、TBX 単独群 (N=2)、出血性ショック単独群 (N=2)、Two-hit 群 (N=2) での 24 時間

後の血漿中 HMGB1 濃度は、Two-hit 群は上昇傾向であったが、3 群間に有意な差は認めなかった（図 3）。以上、今回の我々の実験をまとめると

- Two-hit モデルは継時的に炎症性変化は上昇する傾向にあった。
- しかしその変化は、TBX 移植と出血性ショックの相乗効果であることは考え難く、TBX それ自体でも、あるいは出血性ショックそれ自体でも炎症性変化惹起させる可能性が示唆された。



図 2

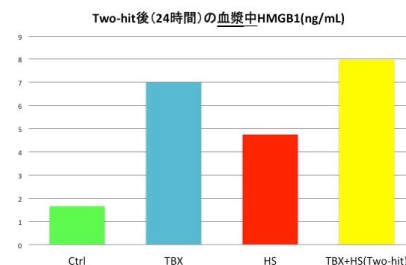


図 3

#### 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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

塚本剛志 (Takeshi Tsukamoto)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：24592753

研究者番号：

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )