

令和元年5月31日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10950

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能に焦点をあてた熱射病の病態生理的解明と治療法の開発

研究課題名(英文) The role of mitochondrial function on the endothelial and brain injury in experimental heat stroke model mice.

研究代表者

川崎 知佳 (KAWASAKI, CHIKA)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：60258621

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)：この研究は、熱射病における血管内皮細胞障害、中枢神経障害、臓器障害発生へのミトコンドリア機能障害の関与について検討し、それを制御する戦略を開発、熱射病の発生、死亡率の低下を図ることである。マウス熱射病モデルマウスを用いて、熱曝露による血管内皮細胞障害、中枢神経障害、死亡率に与えるミトコンドリア機能制御薬物の効果を解析した。ミトコンドリア機能を改善するCoQ10、NACは熱曝露による血管内皮障害、中枢神経障害、死亡率を改善した。CoQ10、NACは、熱射病の治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、異常高体温時に発生する血管内皮障害、中枢神経障害へのミトコンドリア機能異常の関与解明が期待できる。また、ミトコンドリア機能異常を抑制する因子を同定することで、暑熱環境下での死亡率や異常高体温を抑制する予防薬や治療薬開発の可能性がある。これらの研究で、わが国のみならず、将来、暑熱環境地域の増大が予想される世界にも貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the role of mitochondrial function on the endothelial and brain injury in experimental heat stroke. After heat stress, the markers of endothelial and brain injury levels were increased. In CoQ10 or NAC treatment group, these markers level were suppressed compares to non-treated control mice. This study demonstrated that CoQ10 and NAC suppressed endothelial and brain injury after heat stress. CoQ10 and NAC also improved survival rate. CoQ10 and NAC may be a beneficial treatment for heat stress patients for down-regulating heat stress induced organ failures.

研究分野：麻酔科学

キーワード：熱射病 中枢神経障害 血管内皮障害 ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

熱射病は高温への暴露や高温下での運動により発症する。暑熱環境下労働者が熱射病患者の多くを占めるが、スポーツ選手、小児、高齢者にも発症する。近年、地球温暖化や都市化によるヒートアイランド現象により、熱射病の危険性が増加している。熱射病は異常高体温と多臓器不全を併発し致死率は高い。しかし、この病態の機序は未だに解明されていない。従って、早急に熱射病の病態メカニズムを明らかにし、治療及び予防戦略を開発する必要がある。

熱射病発生には図に示すように、多臓器不全と中枢神経異常の二つの原因が考えられる。われわれはマウス熱射病モデルを確立し、暑熱環境が臓器障害を起こす機序の解明に取り組み、炎症メディエーターである High mobility group box-1(HMGB1)を介し肝障害が発生することを明らかにした (Shock 33: supplement 1 63-4 2010)。さらにリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)により、HMGB1発現が抑制され肝障害発生が抑えられることを明らかにした (Shock 35: supplement 1 42-3 2011, Anesth Analg 118:956-63 2014)。熱射病による臓器不全発生の機序として炎症性メディエーター (HMGB1,炎症性サイトカイン)を介した機序が明らかにされた。また、中枢神経系、特に体温調節中枢であり体浸透圧調節に重要な vasopressin を産生する細胞が集まっている視床下部に焦点を当て、免疫細胞である microglia 活性の面から熱射病発生機序への関与を検討してきた (Shock 37: supplement 1 41-42 2012)。

近年、ヒトにおいて熱中症の発症感受性が異なることが報告され、原因としてミトコンドリア酵素遺伝子多型が考えられている (Hum Mutat 2008)。そして熱曝露により細胞内 ATP 産生が低下し細胞障害から臓器障害をもたらす可能性が示唆されている。われわれの研究でも熱曝露による死亡率は曝露時間が一定の時間を超えると急激に上昇することが明らかになっており、この死亡率の上昇は熱曝露による細胞内エネルギー危機が急激に起こっていると考えられる。マウスモデルにおいても臨床でみられるような異常高体温の持続が認められ、高体温により細胞内 ATP 産生が低下していることが考えられる。本研究は、ATP 産生に重要なミトコンドリア機能に焦点を当て、ミトコンドリア機能維持の面から熱射病発生予防、治療戦略の開発を検討する。

### 2. 研究の目的

- (1) 異常高体温時に発生する血管内皮細胞障害、中枢神経障害、臓器障害を評価する。
- (2) 血管内皮細胞障害、中枢神経障害、臓器障害におけるミトコンドリア機能障害の関与を確認する。
- (3) ミトコンドリア機能維持による熱射病の治療戦略を開発する。

以上3項目について検討し、熱射病における血管内皮細胞障害、中枢神経障害、臓器障害発生のミトコンドリア機能障害の関与について解明し、それを制御する戦略を開発、熱射病の発生、死亡率の低下を図ることである。

### 3. 研究の方法

熱射病モデル作成 ; C3H/HeN mice (male, 8-10 weeks old, weighing 20-25g)を使用する。

マウスを人工気象室で暑熱環境下(42~43℃, 湿度 50%、水分制限なし)、熱曝露を4時間行う。

熱曝露後は室温環境(25℃)に戻す。生存実験では熱曝露を7時間まで行う。

臓器採取 ; 熱曝露後、セボフルラン麻酔下に血液、臓器採取を行う。血液はEDTA添加シリンジに心臓穿刺で採取後、遠心を行い血清分離し測定まで-80℃で保存する。また、中枢神経(脳)を取り出しホモジネートし、遠心後上清を-80℃で保存する。

( 1 ) 研究 1 : 熱曝露による全身性炎症の評価

炎症メディエーターである HMGB1 の血中濃度を ELISA で測定する。

( 2 ) 研究 2 : 熱曝露により発生する血管内皮細胞障害の評価

血管内皮細胞障害を評価するため、血中 protein C (PC)、thrombin-antithrombin complex (TAT)濃度を ELISA で測定する。

( 3 ) 研究 3 : 熱曝露による発生する中枢神経障害の評価

中枢神経障害を評価するため、脳虚血・低酸素マーカーである glutamate の中枢神経内濃度を測定する。また神経障害マーカーである glycerol 濃度を測定する。また、炎症メディエーターである IL-1beta の中枢神経内濃度を ELISA で測定する。さらに中枢神経内 tissue factor (TF) 濃度、vasopressin 濃度変化検討も行う。

( 4 ) 研究 4 : ミトコンドリア機能制御薬物による血管内皮細胞障害制御の評価

薬物投与が熱曝露による血管内皮細胞障害にどのように影響するか検討する。ミトコンドリア機能を制御する可能性がある薬物として ミトコンドリア内膜・呼吸鎖に關与する薬物 ; CoQ10、ミトコンドリアの抗酸化、活性酸素除去に關与する薬物 ; N-acetylcystein(NAC) を検討する。

( 5 ) 研究 5 : ミトコンドリア機能制御薬物による中枢神経障害制御の評価

薬物投与が熱曝露による中枢神経障害にどのように影響するか検討する。ミトコンドリア内膜・呼吸鎖に關与する薬物 ; CoQ10、ミトコンドリアの抗酸化、活性酸素除去に關与する薬物 ; NAC を検討する。

( 6 ) 研究 6 : ミトコンドリア機能制御薬物による生存率に与える影響の評価

薬物投与が熱曝露による生存率にどのように影響するか検討する。ミトコンドリア内膜・呼吸鎖に關与する薬物 ; CoQ10、ミトコンドリアの抗酸化、活性酸素除去に關与する薬物 ; NAC を検討する。

( 7 ) 研究 7 : ミトコンドリア機能制御薬物投与タイミングの検討

薬物を熱曝露前に投与する方法 ( 予防的効果 : 研究 4 - 6 ) に加え、曝露 2 時間後に投与する方法 ( 治療的効果 ) を検討し、血管内皮細胞障害、中枢神経障害、生存率に与える効果を評価する。薬物の様々な投与タイミングを検討し、臨床応用への足がかりとする。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) 研究 1 : 熱曝露による全身性炎症の評価

炎症メディエーターである HMGB1 の血中濃度は熱曝露により上昇した。熱曝露により全身の炎症反応が惹起されていることが示唆された。

( 2 ) 研究 2 : 熱曝露により発生する血管内皮細胞障害の評価

血中 protein C (PC)、thrombin-antithrombin complex (TAT)濃度は熱曝露により上昇した。熱曝露により血管内皮障害が惹起されていることが示唆された。

( 3 ) 研究 3 : 熱曝露による発生する中枢神経障害の評価

脳虚血・低酸素マーカーである glutamate の中枢神経内濃度は熱曝露により上昇した。神経障害マーカーである glycerol 濃度は熱曝露により低下した。熱曝露により脳虚血・低酸素が惹起されていることが示唆された。

( 4 ) 研究 4 : ミトコンドリア機能制御薬物による血管内皮細胞障害制御の評価

熱曝露による血中 TAT 上昇は CoQ10 前処置で抑制された。TAT 上昇は NAC 前処置でも抑制傾向にあった。熱曝露による血中 PC 上昇は NAC 前処置で抑制された。CoQ10 前処置は熱

曝露による PC 上昇を抑制できなかった。熱曝露による血管内皮障害をミトコンドリア機能制御薬物により制御できる可能性が示唆された。

#### (5) 研究5: ミトコンドリア機能制御薬物による中枢神経障害制御の評価

熱曝露による中枢神経内 IL-1beta 上昇は CoQ10、NAC 前処置で抑制された。熱曝露による中枢神経内 Glutamate 上昇は CoQ10 前処置で抑制されたが NAC 前処置では変化なかった。Glycerol は熱曝露により低下したが、CoQ10、NAC 前処置で低下が抑制された。

中枢神経内 Vasopressin は熱曝露により増加したが、CoQ10、NAC 前処置で増加が抑制された。中枢神経内 TF は熱曝露により増加し CoQ10 前処置で増加が著明に抑制され NAC 前処置でも増加が抑制された。熱曝露による中枢神経障害をミトコンドリア機能制御薬物により制御できる可能性が示唆された。

#### (6) 研究6: ミトコンドリア機能制御薬物による生存率に与える影響の評価

7 時間の熱曝露により薬物前処置を行わなかったマウスは全て死亡した。CoQ10 前処置したマウスは 7 時間の熱曝露でも全て生存した。また、NAC 前処置マウスも 7 時間の熱曝露で 67% が生存した。熱曝露による死亡をミトコンドリア機能制御薬物が抑制できる可能性が示唆された。

#### (7) 研究7: ミトコンドリア機能制御薬物投与タイミングの検討

CoQ10 を熱曝露 2 時間後に投与したとき、血中 HMGB1 上昇は抑制された。また、TAT 上昇も抑制傾向にあった。中枢神経内 TF、IL-1beta、Glutamate 上昇も抑制された。Glycerol 低下も抑制された。

NAC を熱曝露 2 時間後に投与したとき、血中 PC 上昇は抑制され TAT 上昇も抑制傾向にあった。中枢神経内 TF、IL-1beta、Glutamate 上昇も抑制された。Glycerol 低下も抑制された。生存率は、CoQ10 を熱曝露 2 時間後に投与したマウスは 7 時間の熱曝露でも全て生存した。また、NAC 熱曝露 2 時間後に投与マウスも 7 時間の熱曝露で 17% が生存した。

ミトコンドリア機能制御薬物は熱曝露による血管内皮障害、中枢神経障害、死亡に対し、予防的効果だけでなく治療的効果も期待できることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

T Kawasaki, C Kawasaki, T Sata

Lidocaine suppresses LPS-induced dendritic cell maturation in vitro.

2016 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. Oct., 2016, Chicago, IL USA

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 川崎 貴士

ローマ字氏名: KAWASAKI, Takashi

所属研究機関名: 産業医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 60299633