

平成30年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20390

研究課題名(和文)重症熱中症に対する骨髄由来単核球細胞移植療法の確立と作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Bone Marrow-Derived Mononuclear cells therapy can attenuate acute inflammation in Rat Heatstroke.

研究代表者

梅村 穰 (Yutaka, Umemura)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20743561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来単核球細胞(BMMNCs)移植は抗炎症作用、組織修復作用を介して侵襲制御に関与するとされる。我々はラット熱中症モデルを用いてBMMNCs移植による侵襲制御の可能性を検証した。12週齢ラットの熱中症モデルを使用に対して、侵襲暴露直後に、健常ラットより採取しBMMNCsを静注投与した。BMMNCs移植群は7日間生存率が有意に高く、また血清IL-6、ヒストンH3などの炎症性サイトカイン濃度は有意に低かった。またコントロール群では侵襲暴露後の肺組織に間質浮腫や炎症細胞浸潤などの著明な炎症所見を認めたが、BMMNCs移植群ではこれらの所見が抑制されていた。

研究成果の概要(英文)：Background: This study was performed to gain insights into novel therapeutic approaches for acute inflammation in heatstroke. Bone marrow-derived mononuclear cells (BMMNCs) secrete anti-inflammatory proteins and have protective effects against acute inflammation. Here, we evaluated whether BMMNCs attenuates systemic inflammation induced by heatstroke. Methods and Results: Anesthetized Wistar rats were subjected to heat stress with/without transplantation of BMMNCs. The control group was administered equal volume of PBS and the sham group underwent the same procedure without heat stress. Seven-day mortality improved significantly in the BMMNCs group versus control group. Transplantation of BMMNCs significantly suppressed induction of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 in the serum after heat stress. Histological analysis revealed that cell infiltration with edema in the lung was evident in the control group, whereas the morphological alteration was ameliorated in BMMNCs group.

研究分野：救急医療

キーワード：熱中症 骨髄移植 急性炎症反応症候群 幹細胞移植

### 1. 研究開始当初の背景

熱中症は高温環境下で発生する身体適応障害の総称で、体温上昇と高度脱水による循環不全をきたし、重症例では意識障害が生じる。これまでに我々は熱中症ラットモデルにおいて高体温時に中枢神経系異常をきたすことで、抗炎症性の神経回路や体温調節中枢が破綻する結果、全身性炎症反応、血管内皮障害、多臓器障害が進行することを報告した[1]。骨髄由来単核球細胞(BMMNCs)は抗炎症作用・細胞保護作用・組織再生作用を有しており[2-4]、既に心原性脳梗塞や脊髄損傷に対して神経再生を促す作用を期待され臨床応用されている。また動物実験では心筋虚血再灌流障害、出血性ショック、急性肺障害などの様々な急性炎症病態において、炎症性サイトカインの抑制、多臓器障害の軽減が報告されている[5-9]。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は熱中症にともなう全身性炎症に対して、BMMNCs 移植による抗炎症効果、血管内皮細胞保護効果を評価し、またその作用メカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

実験には specific pathogen-free (SPF) Wistar ラットの雄 12 週齢(250g-300g) (日本 SLC, Hamamatsu, Japan)を用いた。これらのラットは自由に食餌、飲水ができるように管理した。三種混合麻酔(ミダゾラム、酒石酸ブトルファンール、塩酸メドミジン)皮下注射による全身麻酔下に直腸温を持続測定しつつ、小動物用体温保持装置(Bio Reserch Center 社製、BWT-100)による暑熱暴露を行った。直腸温が5分間で約1度上昇するペースに調整しながら、41.9±0.2 度に到達するまで暑熱暴露を行い、30分間維持した。その後、生理食塩水 10ml を皮下注射して常温(24度)のケージ内に戻し、飲食自由、覚醒下で観察した。

BMMNC の採取は 12 週齢の SPF ラットに対して、三種混合麻酔皮下注射による全身麻酔下で両下肢から大腿骨及び脛骨を摘出した。大腿骨及び脛骨の骨髄を 18G 針でトンネリングした後に 10ml シリンジを用いて phosphate-buffered saline (PBS) で wash out し、複数回吸引・排出を繰り返し細胞を分離し、骨髄液を作成した後、密度勾配遠心分離法により、BMMNCs を抽出した。Cell counter (Invitrogen, USA) を用いて溶液内の BMMNCs の細胞数を測定し、 $1 \times 10^7$  個/ml となるように PBS で調整した。

#### a) 生存率の検定

実験プロトコルを Figure.1 に示す。暑熱暴露直後のラットに対して、上記の手順で単離した骨髄由来単核球細胞を  $5 \times 10^6$  個/rat (上記の BMMNCs 液 0.5ml) を尾静注投与した(BMMNCs 移植群)。コントロール群に対しては暑熱暴露直後に同量

(0.5ml) の PBS を投与した。sham 群に対しては三種混合麻酔による全身麻酔のみを行い、熱中症モデルと同量の BMMNCs、または PBS を投与した(sham-BMMNCs 群、sham 群)。生存率の確認は7日間行った。

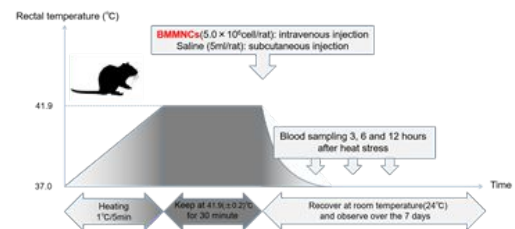
#### b) 血清学的検討

それぞれ独立した個体から血清検体を採取した。採取方法はラットに対して全身麻酔を行い、心臓穿刺により採取した。血液は一晩 4℃ に保存したのち、遠心分離(3000g, 15分, 4℃)し、上清を測定まで-80℃ で保存した。血清は圧迫解除後 3時間、6時間、12時間に採取し測定した。血清中の炎症性メディエータ(IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、ヒストン H3) および血管内皮障害のマーカー(Syndecan-1、ICAM-1)の濃度をそれぞれ ELISA 法によって測定した。

#### c) 組織学的検討

組織学的検討は焦熱暴露 6 時間後の個体を用いて行った。3 種混合麻酔薬を用いて全身麻酔を行った後に、心臓を穿刺し PBS を用いて全身還流した。その後 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。採取した臓器は約 20 時間 4%パラホルムアルデヒドで固定し、15%、20%、25%ショ糖液を用いて脱水した後に、OCT compound を用いて凍結ブロックを作成した。組織切片の作成にはクリオスタット(CM3050S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いた。スライス厚は 7 $\mu$ m とした。作成したスライドはヘマトキシリン-エオジン染色、および抗 Syndecan-1 抗体を用いた免疫染色を行い、光学顕微鏡(BX-51; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

Figure 1

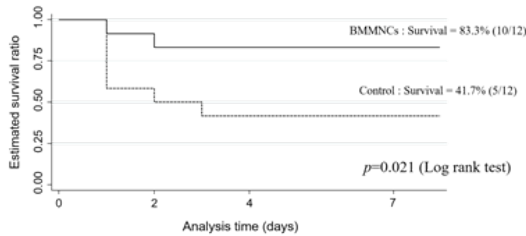


### 4. 研究成果

#### a) 7日間生存率

生存曲線を (Figure.2) に示す。7 日間生存率は、sham 群 100% (6/6)、sham-BMMNCs 群 100%(6/6)、control 群 41.7% (5/12)、BMMNCs 群 83.3% (10/12) であった。BMMNCs 群では control 群に比べて有意に生存率改善効果が認められた ( $p=0.021$ )。

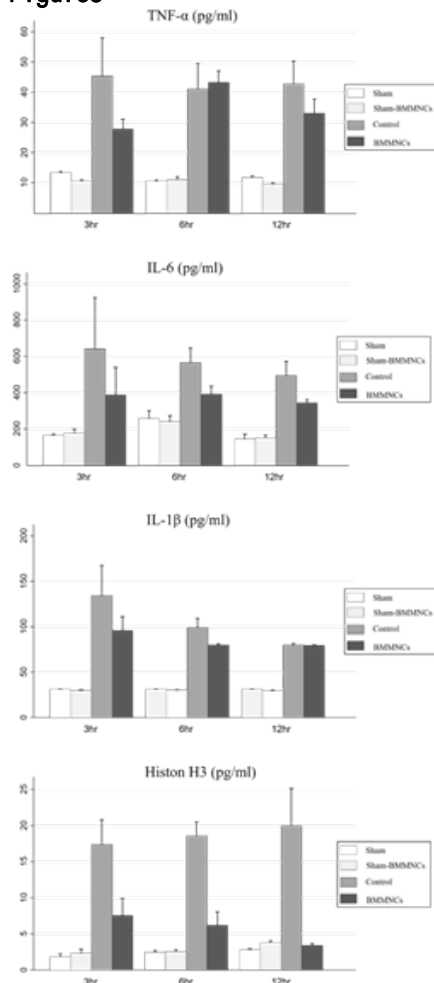
**Figure 2**



**b) 血清炎症性メディエータ**

血清 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、ヒストン H3 (平均値  $\pm$  SE) を (Figure.3) に示す。各メディエータの全ての測定時間において、sham 群と sham-BMMNCs 群に測定値には有意差はなかった。対照的に各メディエータの全ての測定時間において、Control 群の測定値は sham 群よりも有意に高かった。血清 IL-6 濃度は、3、6、12 時間後全てにおいて、Control 群と比較して、BMMNCs 群で有意に低かった。同様に血清ヒストン H3 濃度も、3、6、12 時間後全てにおいて、Control 群と比較して、BMMNCs 群で有意に低かった。血清 TNF- $\alpha$  濃度、血清 IL-1 $\beta$  濃度に関しては、共に 3 時間後のみ Control 群と比較して、BMMNCs 群で有意に低かったが、6 時間後、12 時間後の測定値は両群で有意差はなかった。

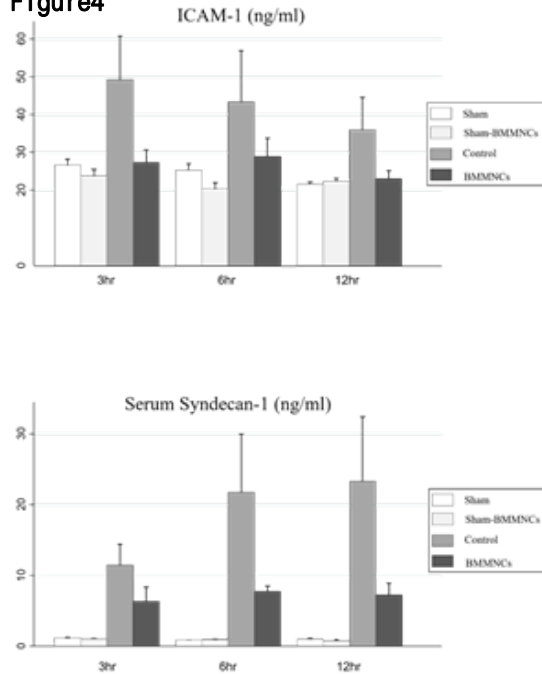
**Figure3**



**c) 血管内皮マーカー**

血清 Syndecan-1 濃度、血清 ICAM-1 濃度 (平均値  $\pm$  SE) を (Figure.4) に示す。全ての測定時間において、Control 群の ICAM-1 濃度は sham 群よりも高い傾向を示したが、BMMNCs 群の ICAM-1 濃度は sham 群とほぼ同等であった (統計学的有意差はなし)。また、全ての測定時間において、Control 群の Syndecan-1 濃度は sham 群、sham-BMMNCs 群より有意に高かった。3、6、12 時間後の全てにおいて BMMNCs 群の Syndecan-1 濃度は Control 群と比較して有意に低かった。

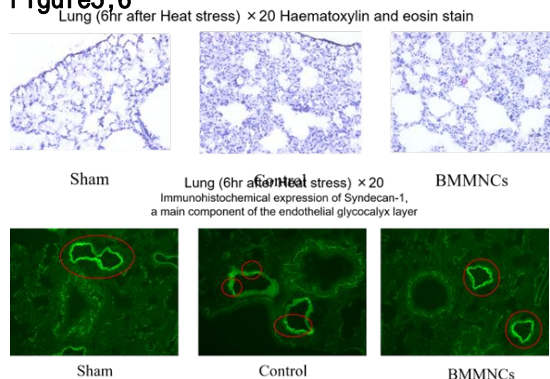
**Figure4**



**d) 組織学的検査**

暑熱暴露 6 時間後の肺組織は、control 群では sham 群に比べて間質の浮腫や炎症細胞の浸潤が増強されていた。これに対して BMMNCs 群ではこれらの所見が著明に抑制されていた。(Figure.5) また control 群の暑熱暴露 6 時間後の肺組織において、血管内皮の表層 (グリコカリックス層) 主要成分である Syndecan-1 の発現は、sham 群と比較して著明に低下していたが、BMMNCs 移植群では、Syndecan-1 の発現が保たれていた。(Figure.6)

**Figure5,6**



## 考察

本研究結果から、熱中症に対する BMMNCs 投与は、1)生存率の改善に寄与する、2)血清中の炎症性メディエータを抑制する、3)肺胞組織障害を軽減させる、4)血管内皮障害を軽減させることが示された。

近年、夏季の都市部の気温上昇と高齢化に伴って、熱中症の搬送件数は増加傾向である。重症例、死亡例の報告も最近 20 年の間に 7 倍以上に増加していると報告されているが、現行治療は積極的冷却による体温管理、大量輸液による循環維持、人工呼吸器による呼吸管理などの対症療法が主体であり、根本的治療は皆無である。熱中症においては体温上昇による直接的な組織障害に加えて、全身の障害組織から DAMPs が放出され、中枢性に抗炎症作用が抑制されることで著しい全身炎症反応が励起されるとされている。従って急性炎症反応を制御する治療法が確立されれば熱中症の病態を根本的に改善させる手掛かりの一つになりえる。近年、好中球-血小板-血管内皮細胞の相互作用は急性炎症病態における多臓器障害の進行に大きく関わっていることが知られ注目を集めている。炎症病態において活性化した好中球は NETs (neutrophil extracellular traps) を放出し菌体捕獲や、殺菌などの局所免疫作用を發揮するとされている[10]。一方、持続する炎症反応により NETs が過剰に放出されると、構成成分のヒストン H3 や好中球エラスターゼによる血管内皮障害や微小血栓形成の促進作用から、臓器障害を引き起こされる[11,12]。

本研究において、BMMNCs 投与群では血清ヒストン H3 濃度の上昇が有意に抑えられていた。このことは BMMNCs 投与によって、過剰な好中球活性化が抑えられ、細胞障害性のヒストン H3 の放出が抑制されたことを示している。また本研究では BMMNCs 投与により肺血管内皮のグリコカリックス層の主要成分である Syndecan-1 の脱落が抑えられ、血中濃度の上昇も有意に低かったことが示された。この結果は、活性化好中球からのヒストン H3 の放出が抑えられたことで、血管内皮障害が軽減されたことを裏付けるものである。

## 参考文献

1. Kazuma Yamakawa, Naoya Matsumoto, Yukio Imamura, Takashi Muroya, Tomoki Yamada, Junichiro Nakagawa, Junya Shimazaki, Hiroshi Ogura, Yasuyuki Kuwagata, Takeshi Shimazu. Electrical Vagus Nerve Stimulation Attenuates Systemic Inflammation and Improves Survival in a Rat Heatstroke Model. *PLoS One*. 2013;8(2):e56728
2. Araujo IM, Abreu SC, Maron-Gutierrez T, Cruz F, Fujisaki L, Carreira H, Jr., Ornellas F, Ornellas D, Vieira-de-Abreu A, Castro-Faria-Neto

- HC et al: Bone marrow-derived mononuclear cell therapy in experimental pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *Critical care medicine* 2010, 38(8):1733-1741.
3. Nandra KK, Takahashi K, Collino M, Benetti E, Wong WS, Goh FY, Suzuki K, Patel NS, Thiernemann C: Acute treatment with bone marrow-derived mononuclear cells attenuates the organ injury/dysfunction induced by hemorrhagic shock in the rat. *Shock* 2012, 37(6):592-598.
4. Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y, Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S et al: Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 2007, 24(6):1026-1036.
5. Lovell MJ, Yasin M, Lee KL, Cheung KK, Shintani Y, Collino M, Sivarajah A, Leung KY, Takahashi K, Kapoor A, et al.: Bone marrow mononuclear cells reduce myocardial reperfusion injury by activating the PI3K/Akt survival pathway. *Atherosclerosis* 213(1):67Y76, 2010.
6. Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K: Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(2):H886YH893, 2006.
7. Breneman M, Sharma S, Harting M, Strong R, Cox CS Jr, Aronowski J, Grotta JC, Savitz SIC: Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 30(1):140Y149, 2010.
8. Araujo IM, Abreu SC, Maron-Gutierrez T, Cruz F, Fujisaki L, Carreira H Jr, Ornellas F, Ornellas D, Vieira-de-Abreu A, Castro-Faria-Neto HC, et al.: Bone marrow-derived mononuclear cell therapy in experimental pulmonary and extrapulmonary acute lung injury. *Crit Care Med* 38(8):1733Y1741, 2010.
9. Maron-Gutierrez T, Castiglione RC, Xisto DG, Oliveira MG, Cruz FF, Pecanha R, Carreira-Junior H, Ornellas DS, Moraes MO, Takiya CM, et al.: Bone marrow-derived mononuclear cell

- therapy attenuates silica-induced lung fibrosis. Eur Respir J 37(5):1217Y1225, 2010.
10. Julia E, Kimberly M, Siu LW, Stephen CM, Mirta S, Denisa DW: P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice.blood, 2015, 126:242-6.
11. Tadie J-M, Bae H-B, Jiang S, Park DW, Bell CP, Yang H, Pittet J-F, Tracey K, Thannickal VJ, Abraham E, Zmijewski JW: HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2013, 304:L342-9.
12. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, Maiuri L, Maseri A, D'Angelo A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Manfredi AA: Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. J Thromb Haemost 2014, 12:2074-2088.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

**Yutaka Umemura**, Hiroshi Ogura, Kentaro Shimizu, Takeshi Shimazu. Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Therapy Can Attenuate Systemic Inflammation in Rat Heatstroke. 47th Critical Care Congress, San Antonio, Texas, USA (February 25-27, 2018) The Star Research Achievement Award.

**梅村 穰**、清水 健太郎、中川 淳一郎、小倉 裕司、嶋津 岳士、急性炎症病態に対する骨髄由来単核球細胞移植による侵襲反応制御の可能性、第 45 回日本日本救急医学会総会・学術集会 (2017 年 10 月 24-26 日)

〔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 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  
 梅村 穰 (Yutaka ,Umemura)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20743561

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 ( )