

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791329

研究課題名(和文) 熱傷と免疫異常：焼痂由来物質 alarmin の関与

研究課題名(英文) burn and immunity: the role of alarmin from burn wound

研究代表者 森實 瑠里 (MORIZANE RURI)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：30465520

研究成果の概要(和文)：Alarminの一つとして注目されている adenosine は数 μM の低濃度から強い炎症性サイトカイン産生抑制能を有する。また組織損傷の強い熱傷では血中 adenosine 濃度が有意に上昇していることが明らかになった。熱傷のさいに遊離された adenosine は局所における過剰な炎症を抑制する生理的な働きを果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An adenosine known as one of the alarmin has a strong anti-inflammatory action. Adenosine inhibits inflammatory cytokine production from monocytes at μM level. We found that serum adenosine level increased significantly under condition of massive tissue injury like burn. We suggest that released adenosine from injured tissue would have physiological role to regulate excessive inflammation at site of burn wound.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学救急医学

キーワード：熱傷、サイトカイン、アラミン、アデノシン

1. 研究開始当初の背景

熱傷は損傷を受けた組織の修復を行うため

に極めて強い炎症を受傷直後から惹起する

全身性炎症反応症候群の代表的疾患である。炎症性サイトカインをはじめとした各種炎症性 mediator は、受傷直後より上昇し血管透過性亢進による循環血液量の減少、低蛋白血症を招き熱傷ショックの主原因となるばかりでなく、熱傷中期（受傷後7～10日目）をピークに発生する免疫抑制の引き金としても重要視されている。しかしながらこの早期に発生する過剰炎症の正確な発生機序は不明である。近年、壊死組織由来の様々な内因性物質が免疫炎症系に大きな影響を与えていることが明らかになりつつある。本来、細胞内にとどまって生理的役割を果たしている生体構成成分の細胞外への放出は、組織の異常発生を生体に認知させる danger signal として働く。Danger signal は、alarmin、damage-associated molecular patterns (DAMPs)とも呼ばれる。病原体由来のエンドトキシン、ペプチドグリカンをはじめとした、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)が、生体に病原体の侵入を知らせ toll-like receptors (TLRs)を介して免疫系を賦活化するのと全く同一な機構によって DAMPs も免疫担当細胞を直接的に、または TLRs を介して免疫炎症系を調節している。DAMPs の代表としては、核内に存在し転写調節を行っている HMGB1 があげられる。細胞壊死の結果、核内の HMGB1 が、細胞外に漏出すると炎症性サイトカインとして働き炎症を惹起する。また ATP の代謝産物であるアデノシンも DAMPs として知られている。アデノシンの細胞外濃度は極めて微量であるものの、虚血状態下、細胞壊死下においてその

細胞外濃度は著しく増加する。HMGB1 と異なり、アデノシンは、アデノシン受容体を介して単球の炎症性サイトカイン産生抑制をはじめとして免疫抑制に働く。その他 thioredoxin、macrophage-inhibitory factor、ヒアルロン酸、heat shock protein など数多くの DAMPs が報告されている。

2. 研究の目的

熱傷焼痂から大量の DAMPs が放出され、免疫炎症系に影響を与えている事が予想される。従来から熱傷焼痂は、可能な限り早期に切除、除去することが推奨されてきた。しかしながらその理由は、感染の温床となることが危惧されるため、もしくは植皮を行うことにより早期創閉鎖をはかることが主目的であり、焼痂除去と SIRS、CARS の改善という着想は全くなかった。焼痂が存在する限り大量の DAMPs が絶えず細胞外に放出され、その結果、免疫炎症系が多大な影響を受け SIRS、CARS から容易に脱却出来ないことが推察される。本研究では焼痂由来の DAMPs と免疫炎症異常に焦点を当て、熱傷創部から放出される DAMPs の種類と量を臨床で検討した。In vitro の検討は、アデノシンのサイトカイン産生能に及ぼす影響を遊離末梢血単核球にて検討した。

3. 研究の方法

(1) 血中アデノシンは過塩素酸にて除蛋白した後、中和した血清を用いて高速液体クロマトグラフィーにて測定した。血中 HMGB1 は ELISA 法にて測定した。

(2) 単核球のサイトカイン産生能は細胞内

サイトカイン法を用い FACS にて測定した。すなわち、密度勾配遠心法にて単離した単核球は lipopolysaccharide (*E. coli* 026-B6; Difco laboratories, USA) にて活性化し、37°C、4 時間 CO₂ インキュベーター内でインキュベーション後、RPE 標識抗 CD4 抗体 (Beckman Coulter, USA) もしくは RPE 標識抗 CD14 抗体 (Beckman Coulter, USA) を用いて細胞表面抗原の染色を室温で 15 分間行う。なおインキュベーション前にゴルジ体蛋白輸送阻害剤である brefeldin A (10 µg/ml) を添加し産生されたサイトカインの細胞外への分泌を阻害しておく。ついで FACS lysing solution (BD Biosciences, USA)、FACS permeabilizing solution (BD Biosciences, USA) を加え細胞膜透過処置を行った後、FastImmune TNFFITC/IL-6 PE を添加して室温暗所で 30 分間インキュベートし細胞内に蓄積しているサイトカインを染色、PBS 2 回洗浄、1%パラホルムアルデヒド含有 PBS にて固定後フローサイトメーター (FACS Calibur; Becton Dickinson, USA) にて測定する。CD4 もしくは CD14 陽性細胞をゲーティングし、ついで各サイトカイン産生細胞を同定する。対照にはアイソタイプ抗体染色を用いる。

4. 研究成果

(1) アデノシンはその特異的受容体を介して単核球における TNF-α の産生を濃度依存性に抑制する。一方 IL-6 に対する抑制作用は示さなかった。(図 1)

Adenosine の単核球サイトカイン産生能に及ぼす影響

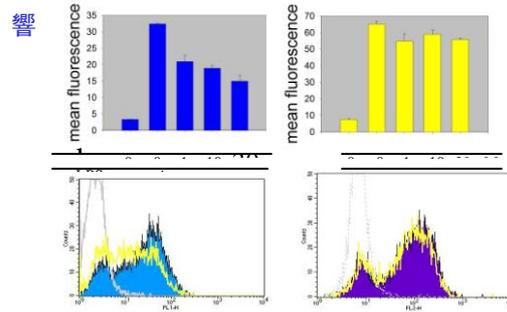


図 1 LPS で刺激した単核球をアデノシン (0-30 µM) 存在下で incubate した後細胞内サイトカイン法で TNF-α、IL-6 産生量を FACS で測定した。

(2) Alarmin の一つとして知られる adenosine を HPLC にて測定した結果を図 2 に示す。通常は血液中にはほとんど検出されないが熱傷により重症敗血症に陥った場合は高濃度の adenosine を血液中に認める。

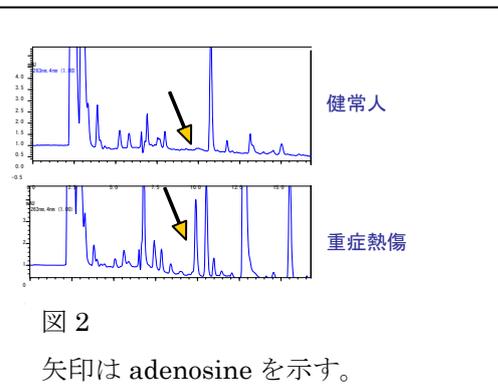


図 2 矢印は adenosine を示す。

(3) 熱傷患者をはじめとした重症敗血症患者における血中アデノシン濃度を図 3 に示す。

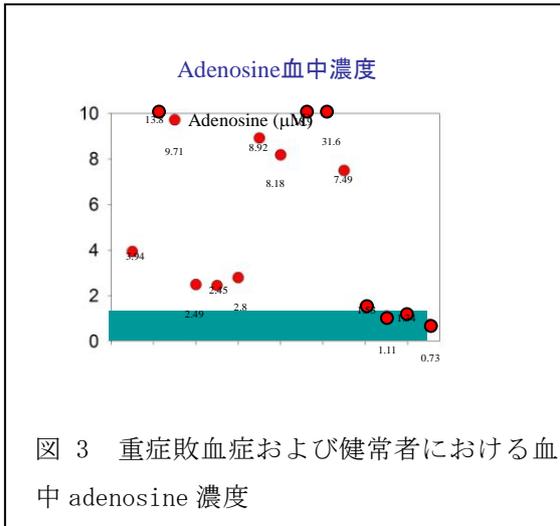


図 3 重症敗血症および健康者における血中 adenosine 濃度

健康者における adenosine 濃度は $0.89 \pm 0.16 \mu\text{M}$ であるのに対し重症熱傷患者では $7.65 \pm 2.19 \mu\text{M}$ と有意な高値を認めた。

(4) 数 μM の低濃度から adenosine は強い炎症性サイトカイン産生抑制能を有する。さらに組織損傷の強い熱傷では血中 adenosine 濃度が有意に上昇していることより、遊離された adenosine は局所における過剰な炎症を抑制する働きを果たしている可能性が示唆された。

(5) 国内外におけるインパクト alarmin に関する検討は国内では殆ど行われておらず、海外においてもまだ少ないのが現状である。今回の研究成果は今後のこの分野の発展に寄与すると考えられる。

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 1 件)

①熊谷常康, 武山直志, 三木靖雄, 高木省治, 青

木瑠里 他 4 名, PMX-DHP と leukocytapheresis-炎症担当細胞の選択的吸着に関する基礎的検討-, エンドトキシン血症救命治療研究会誌、査読有、2008; 12: 44-6

[学会発表] (計 2 件)

①武山直志, 原田 誠, 岩倉賢也, 熊谷常康, 青木瑠里 他 5 名、急性血液浄化における血小板-白血球複合体形成と白血球機能、第 37 回日本集中治療医学会総会、2010、3、広島

②武山直志, 熊谷常康, 岩倉賢也, 青木瑠里 他 6 名 PMX-DHP による活性化好中球の選択的吸着…培養ヒト気管支上皮細胞を用いた細胞障害性に関する基礎的検討…、第 13 回エンドトキシン血症救命治療研究会、2009. 2、東京

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森實瑠里 (MORIZANE RURI)
愛知医科大学・医学部・助教
研究者番号：30465520

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし