

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592315

研究課題名（和文） 高温環境下の血管内皮細胞における抗炎症効果—温度と生体防御反応

研究課題名（英文） Anti-inflammatory effect of hyperthermia on endothelial cells—temperature dependency and systemic response

研究代表者

木下浩作（KINOSHITA KOSAKU）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：90260968

研究成果の概要（和文）：

高温環境への暴露は、血管内皮細胞傷害と関係する重要な因子である。特に、熱中症患者に発症する全身性の血管内皮細胞傷害は炎症性微小循環障害を引き起こし、多臓器不全をきたすが、その危険因子は未だ明らかでない。今回の研究で、高温環境では、血管内皮細胞での IL-8 mRNA は早期から発現するが、IL-8 産生は逆に抑制されることを明にした。この高温によるサイトカイン抑制効果の機序は明かでは無いが、高温暴露時のサイトカインを介する生体反応は抗炎症性に作用している可能性が示唆される。また IL-8 mRNA の発現は、高温環境での培養で有意に増加することが明らかになり、高温暴露後の IL-8 の再上昇は、熱中症患者の重症化の一因になっている可能性がある。これら現象は、IL-6 も同様に観察された。このことから、重症熱中症患者では、血管内皮細胞からの IL-6, 8 産生などの炎症反応を増大させ、二次性組織傷害を悪化させ、多臓器不全進展の危険因子となり得ると考えられた。

研究成果の概要（英文）

Hyperthermia is considered an important condition that may contribute to multiple organ failure (MOF) associated with endothelial cell damage. We demonstrated that endothelial cells may exhibit a temperature-dependent mechanism of cytokine interleukin (IL) -8 releases and the suppression of cytokine protein production after transient hyperthermia stimuli even though an increased level of IL-8 mRNA was observed. As there is a long-term effect of IL-6 or 8 modulation after transient hyperthermia with increasing in mRNA expression after incubating endothelial cells under high-temperature stimuli, then the process might subsequently lead to neutrophil infiltration into the injured tissue, which in turn could worsen the outcome by enhancing secondary injury processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成23年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：

(1)高温, (2)サイトカイン, (3) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞, (4) interleukin (IL)-8, (5) IL-6, (6)炎症

1. 研究開始当初の背景

集中治療が必要な患者は、高血糖や人工呼吸器関連肺炎・誤嚥性肺炎 (Crit Care Med 2003; 31:2544-2551)などを合併することがあるが、体温上昇に高血糖や感染症が合併した際の全身に与える影響は明かではなかった。研究代表者らは低温 (Intensive Care Med. 34:109-15, 2008) や高温 (Crit Care Med suppl. 35:A52, 2008) 環境での糖や endotoxin による刺激は、血管内皮細胞からの interleukin (IL) 8 の産生が亢進することを明らかにし、血糖管理や感染制御の重要性を示した (平成 19-20 年度 科学研究費補助金 19592100 基盤研究 (C)「高温環境下での血管内皮細胞傷害伸展因子—高グルコース濃度の影響」研究代表者 木下浩作)。ところが、高温環境での生体反応を検索する中で、温度—サイトカイン産生 (temperature dependent cytokine production) の関係を検討してみると、むしろ 37 度に比べ高温になるに従いサイトカイン産生が抑制される (n=2) 予備実験結果 (高温環境; 38, 39, 40°C : での細胞の viability には変化が無いことは確認されている) が観察された。そこで研究者らは、発熱などによる高体温そのものは、生体防御反応として抗炎症性に働いている可能性についての作業仮説を立てた。

② 過大生体侵襲時には、血管内皮細胞傷害や虚血再灌流後の白血球の接着や組織浸潤が増加し組織傷害に関与し、血管内皮細胞での nitric oxide 合成低下や接着分子の発現、endothelin-1, IL-8 産生増加と血中 cytokine の増加などが報告されている。特に好中球の浸潤には、IL-8 が強く関与している。血管内皮細胞上での接着因子の発現は、in vitro において LPS などによって増強されるが、温度変化が血管内皮細胞に及ぼす影響についての検討はない。

2. 研究の目的

炎症時の生体反応で認められる体温上昇 (発熱) 反応そのものは、一方で抗炎症性反応として作用する可能性が示唆される。本作業仮説を立証することで、高体温患者の体温コントロールが (解熱) が血管内皮細胞に影響し、感染症合併時の血管内皮傷害を増強させる可能性がある。集中治療中の患者に認められる肺炎や敗血症などの感染性合併症による発熱の不用意な解熱治療により傷害組

織内の好中球集積を助長し、微小循環障害による多臓器不全進展の一因となっている可能性がある。本研究結果から、高温による生体防御機構を明らかにすると同時に、集中治療を必要とする患者での体温管理は、多臓器不全進展に係わる因子として重要であることを示す臨床的意義は大きいと考える。

本研究の目的は、高温 (38, 39, 40°C) 環境で血管内皮細胞を培養し、感染時に増加する LPS を作用し、短期間 (1, 3, 5 時間) の高温環境で培養された血管内皮細胞から産生される IL-8, IL-6, IL-10 および同 mRNA 発現を観察する。最終的には、高体温による血管内皮細胞損傷形態を検索し、高温による生体防御機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を高温環境で培養し、上清中のサイトカイン値 (IL-8, IL-6, IL-10) を測定する。また、同一環境下での血管内皮細胞の IL-8 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA の発現を観察する。Lipopolysaccharide での刺激による反応も同時に観察することで、臨床的に感染症—敗血症合併による高体温を再現する。

(1) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養および培養液の調製

① ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vascular endothelial cells, 以下 HUVECs; Lonza, Walkersville, MD, USA) を 2% ウシ胎児血清を含んだ EGM2 メディウム (Cambrex Bio Science) 中に二酸化炭素 5% を含む加湿環境下 37°C で継代培養 (温度: 37°C, CO₂ 濃度; 5%) する。

② HUVECs; 1x10⁵ cells/ml (第 2-5 継代細胞; 各 n=7) を環境温度 37, 38, 39, 40°C に調整し 1, 3, 5 時間 (CO₂ 濃度; 5%) 培養する。一方、短期間の高温刺激がその後のサイトカイン産生に与える影響を検討するために、環境温度 37, 38, 39, 40°C で 1 時間培養した後に、4 および 23 時間 37°C で培養 (それぞれ合計 5, 24 時間培養) する (この実験系では、臨床的に敗血症患者や熱中症による高体温を治療した後に急激に病態が悪化することがあり、この病態解明を目的としている。)

③ 培養液は Medium-199 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) を用いる。ついで HUVECs を lipopolysaccharide (LPS; 1μg/mL) で刺激し、上述と同様の温度・時間

条件で培養後、上清中の IL-8, IL-6, IL-10 を産生の変化を観察する。

(2) 上清 IL-8, IL-6, IL-10 値測定

培養の後、培養液の上清を採取し、氷点下 80°C で測定まで保存する。上清中の IL-8, IL-6, IL-10 濃度は Quantikine human cytokine immunoassay (R&D Systems, Minn., MN, USA) キットを用いて、enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)法により測定する。

(3) HUVECs の IL-8 mRNA, IL-6 mRNA, IL-10 mRNA 測定

HUVECs を 37, 38, 39, 40°C で 1, 3, 5 時間培養群と環境温度 37, 38, 39, 40°C で 1 時間培養した後に、4 および 23 時間 37°C で培養（それぞれ合計 5, 24 時間培養）する。同様に、LPS 刺激を加えた群でも同様の培養を行う（各 n=7）。培養の後、細胞から total RNA の抽出し Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて TaqMan® real-time RT-PCR を行う。キャリブレーターサンプルのターゲット遺伝子発現量を 1 とし、各検体の mRNA 発現を相対定量する。

3. 測定機器

ヒトサイトカイン ELISA システムは消耗品、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞培養には、クリーンベンチ（既存品）、培養器（既存品）を用いる。サイトカイン、接着分子測定用イムノリーダーおよび Real Time PCR system は既存の機器を使用する。

4. 研究成果

高温環境への暴露は、血管内皮細胞傷害と関係する重要な因子である。特に、熱中症患者に発症する全身性の血管内皮細胞傷害は炎症性微小循環障害を引き起こし、多臓器不全をきたすが、その危険因子は未だ明らかでない。血管内皮細胞は、各種のサイトカイン、接着因子、フリーラジカルおよび chemoattractant mediators など生体内で産生される液性因子を介する多臓器不全発症に関与していることが指摘されている。Interleukin (IL) -8 は血管内皮細胞からも産生され、急性炎症反応を mediate する key mediator として認識されており、炎症部位における好中球の遊走や活性化刺激に対し中心的な役割を担っている。昨年度まで高温環境では、血管内皮細胞での IL-8 mRNA は早期から発現するが、IL-8 産生は逆に抑制されることを明にしてきた。高温環境への暴露は、血管内皮細胞傷害と関係する重要な因子であると考えられる。特に熱中症では、血管内皮細胞傷害による多臓器不全の進展が転帰を左右する。今年度までの研究により高温環境（39, 40°C）では、①血管内皮細胞での interleukin (IL)-6, 8 mRNA は早期から有意

に発現 ($p < 0.01$) するが、逆に IL-6, 8 産生は温度依存性に抑制 ($p < 0.01$) される、②IL 産生能は高温環境で温度依存性に低下するが、一定の閾値を超えた高温刺激 (40°C) は mRNA の長期発現をもたらし、IL 抑制後の有意な IL 産生 (rebound effect) をきたすことを明らかにできた。また、これら IL-6, 8 の高温に対するサイトカインの反応性の再現性の確認もできた。

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 4 件）

1. 木下浩作, 櫻井 淳, 野田彰浩, 雅楽川 聡, 向山剛生, 古川力丸, 多田勝重, 千葉宣孝, 丹正勝久: 高温環境における血管内皮細胞サイトカイン産生の変化 第 37 回日本救急医学会総会 盛岡 2009. 10. 29-31

2. Kinoshita K, Sakurai A, Kogawa R, Kuwana T, Yamaguchi J, Furukawa M Sugita A, Mukoyama T, Utagawa A, Tanjoh K: Rebound effect of cytokine production after a transient hyperthermia stimuli. 39th Critical care congress Miami, Florida 2010.1.9-13

3. 木下浩作, 古川力丸, 野田彰浩, 山口順子, 杉田篤紀, 古川 誠, 雅楽川 聡, 守谷 俊, 櫻井 淳, 丹正勝久: 高温環境における血管内皮細胞サイトカイン産生能の低下とリバウンド効果 第 38 回日本集中治療医学会学術総会 横浜 2011.2.24-26

4. Kinoshita K, Kogawa R, Sakurai A, Yamaguchi J, Utagawa A, Kuwana T, Furukawa M, Moriya T, Sugita A, Tanjoh K: Post-inhibitory augmentation of cytokine production after a transient hyperthermia stimuli. The 4th International Hypothermia Symposium Tokyo, Japan 2011.9.15-17

〔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

木下 浩作 (KINOSHITA KOSAKU)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：90260968

(2) 研究分担者

櫻井 淳 (SAKURAI ATSUSHI)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：40339320

(3) 連携研究者

()

研究者番号：