

平成 25 年 2 月 16 日現在

機関番号 : 14401

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2009 ~ 2011

課題番号 : 21659414

研究課題名 (和文) 熱中症に対する新たな臓器障害戦略 : 骨髄間質細胞移植の有効性

研究課題名 (英文) A novel strategy for heat stroke: Transplantation of mesenchymal stem cells

研究代表者

小倉 裕司 (OGURA HIROSHI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 70301265

研究成果の概要 (和文) : 本研究の目的は、熱中症時にみられる血管内皮傷害に対する再生応答を評価し、熱中症モデルにおいて血管内細胞移植 (骨髄間質細胞) の有効性を検討することである。熱中症にともない、肺を中心とする多臓器に血管内皮障害、臓器障害が認められた。骨髄間質細胞移植が抗炎症効果、血管内皮保護作用を発揮して生存率を有意に改善し、新たな治療戦略となりうるか検討を加えた。

研究成果の概要 (英文) : The objectives of this study were to evaluate the pathophysiology and regenerative response of endothelium after heat stroke and to examine the effects of mesenchymal stem cells in a rat model. The serum concentrations of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6, soluble thrombomodulin, and soluble endothelial selectin significantly increased at 3 and 6 hours after heat stroke. In the lung, interstitial edema, structural disruption of the alveolar lumen, and intra-alveolar hemorrhage were observed at 6 hours after heat stroke. Transplantation of mesenchymal stem cells was conducted to evaluate the effects to inhibit the production of inflammatory cytokines, protect against endothelial damage and improve survival in a rat model with heat stress.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	0	1,200,000
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

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 : 熱中症、再生、血管内皮、骨髄間質細胞、移植、治療、多臓器障害

1. 研究開始当初の背景

地球規模の温暖化に伴い、日本でも記録的猛暑が更新され、熱中症患者は年々増加の途

にある。2008 年における全国の熱中症による救急搬送患者は、7 月、8 月だけでも 2 万人を超え (2007 年に比べ 1750 人増加)、3

週間以上の長期入院を要した重症例は約 600 人、死亡者は 47 人に及んだ。予後不良例では、昏睡、ショック、高体温、代謝性アシドーシスから DIC、多臓器障害に急速に進行して死亡するケースが多い。しかしながら、現在熱中症に対する治療は、呼吸循環管理を中心とした対症療法にとどまり、重症例に対する積極的なアプローチ法は皆無に等しい。熱中症患者が一旦多臓器障害に陥ると、治療に難渋するだけでなく救命もしばしば困難となり、集中治療に莫大な治療費を要する。したがって、熱中症にともなう一連の組織障害を早期から効果的に制御して多臓器障害の進行を防ぐことが急務と考えられる。

我々は、多臓器障害に移行しやすい重度侵襲にともなう全身性炎症反応をいかに制御すべきかをテーマとして炎症反応、免疫応答に注目して臨床研究および動物実験を進めてきた (J Trauma 59:308-315,2005、JTrauma61:616-623,2006)。しかしながら、侵襲後にみられる多臓器障害の進行は、炎症反応、免疫応答の制御だけでは十分にコントロールできず、臓器障害の修復過程で重要な鍵を握る再生応答の解明と制御が不可欠と考えるに至った。近年の研究において、全身性炎症反応の主要な標的は血管内皮であり、多臓器障害では血管内皮傷害の進行が顕著となることから、我々は、血管内皮の再生を担う細胞の増殖、分化が、侵襲にともなう再生応答を主に制御すると考えている。1997年、成人末梢血中に内皮細胞に分化しうる血管内皮前駆細胞が存在することが報告され、その後の研究により血管内皮前駆細胞は炎症や創傷の治癒過程で中心的役割を果たしていることが明らかとなった。血管内皮前駆細胞の組織への取り込みは血管新生を起こすことから、血中の血管内皮前駆細胞をとらえることにより再生能を評価できる可能性が出現した。血管内皮前駆細胞を利用して血管のみならず臓器の再生能を制御できる可能性もある。実際、重症虚血部位への血管再生を期待して慢性血管病に対する血管内皮前駆細胞の臨床応用が現在進められており、下肢虚血や虚血性心疾患において効果が期待されている (N Eng J Med 353:999-1007, 2005)。

我々は、熱中症に伴う DIC、多臓器不全の進行においても、異常高体温で引き起こされる全身性の血管内皮障害や細胞死が関与することに注目し、熱中症に対する新たな多臓器障害戦略として骨髄間質細胞移植に思い至った。近年、豊富な成長因子の産生を可能とする骨髄間質細胞移植による組織の再生、修復作用が脊髄損傷モデルなどで確認されて

いる。我々は、特に血管内皮の修復、再生療法として、また細胞死の抑制により、骨髄間質細胞移植が熱中症後の多臓器障害を劇的に改善する可能性があると考え、本研究を計画した。今日まで熱中症に対する骨髄間質細胞移植の効果の評価した報告は皆無であり、骨髄間質細胞移植の有効性が本研究で明らかとなれば、熱中症に対する画期的なアプローチ法として、新たな臨床応用の道が開けるからである。

本研究では、安定した熱中症モデルを確立し、熱中症の病態を詳細に検討するとともに熱中症に対する新たな多臓器障害戦略として、骨髄間質細胞移植の有効性を評価することを目指した。

熱中症に対する新たな多臓器障害戦略として、骨髄間質細胞移植の有効性を評価した国内外の報告はなく、血管内皮の修復、再生を評価するアプローチも本研究が初めてである。骨髄間質細胞移植は、熱中症に伴う血管内皮障害を軽減し、多臓器障害の進行を抑え、予後を改善することが期待でき、熱中症に対する有効な細胞移植治療が開発、確立できれば、将来的に熱中症患者のみならず患者家族の病苦を劇的に軽減し、医療経済の面でも社会に大きく貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、熱中症に対する新たな多臓器障害戦略として、骨髄間質細胞移植の有効性を評価することである。熱中症に対する細胞移植による臓器障害抑制効果を明らかにするために、本研究の焦点を以下の2点に絞り実施した。

(1) 熱中症ラットモデルを作製し、各臓器障害の形態を明らかにし、各臓器における血管内皮細胞障害の程度や細胞死 (アポトーシス) を各種免疫染色で評価する。

(2) 熱中症モデルにおいて、発症急性期に骨髄間質細胞移植 (経血管内、経脳室内) を行い、生存率の改善が得られるか、各臓器障害の形態や各臓器における血管内皮細胞障害、細胞死が改善するか評価する。

3. 研究の方法

(1) 熱中症モデルにおける各臓器障害、中枢神経障害に関する研究

確立したラットの熱中症モデルにおいて、各臓器障害、中枢神経障害の形態変化を病理組織診断により経時的に評価した。病理組織診断では、各臓器内の白血球浸潤など炎症所見の程度を捉えると共に、各臓器における血

管内皮細胞の障害をvon Willebrand factor染色、VCAM-1染色などで定量評価した。また、各臓器における細胞死（アポトーシス）をTUNEL染色で定量評価した。血管内皮の再生因子として、アポトーシスを抑制するangiopoietin-1、survivinの発現、およびアポトーシス関連因子であるFas抗原の発現を同時に染色法で定量評価した。さらに骨髓機能として、血中に存在する造血系前駆細胞（CD34陽性）をフローサイトメトリー法で定量評価し、骨髓間質幹細胞の成長促進因子であるstromal-derived factor-1 (SDF-1)の血中濃度を測定した。また、骨髓においてSDF-1のレセプターであるCXCR4発現を染色法で定量評価した。各臓器において定量評価した血管内皮障害および細胞死、骨髓機能が熱中症後の多臓器障害の進行過程と相関するか否か経時的に評価した。多臓器障害の進行過程と生命予後との関連も評価し、死因を明らかにした。

(2) 上記熱中症モデルに対する骨髓間質細胞移植の有効性に関する研究

上記熱中症モデルにおいて、発症急性期に骨髓間質細胞移植を行い、生存率の改善が得られるか、各臓器障害の形態や各臓器における血管内皮細胞障害、細胞死が改善するか評価した。経血管内細胞移植には、健常ラットの脛骨、腓骨から採取する骨髓間質細胞を使用する。この際、骨髓間質細胞は、採取した骨髓細胞を特殊培地に接触させ、培養増殖させて回収した。骨髓間質細胞は 5×10^6 個を 1 単位とし、それぞれの細胞 1 単位を熱中症発症直後、1 時間後、3 時間後の計 3 つのタイミングで血管内移植するグループに分けて各群の経過を比較検討した。(1) で得られた結果をコントロールとし、骨髓間質細胞の血管内移植にともない各臓器における血管内皮障害、中枢神経障害と細胞死、炎症反応指標の変動、ケミカルメジャーの動き、病理組織診断による各臓器障害、および生存曲線が改善するか否か評価した。

また、同様にして回収した骨髓間質細胞 1 単位を熱中症発症直後、1 時間後、3 時間後の計 3 つのタイミングで脳室内移植するグループに分けて各群の経過を比較検討した。(1) で得られた結果をコントロールとし、骨髓間質細胞の脳室内移植にともない各臓器における血管内皮障害、中枢神経障害と細胞死、炎症反応指標の変動、ケミカルメジャーの動き、病理組織診断による各臓器障害、および生存曲線が改善するか否か評価した。

病理組織診断では、臓器障害の形態、白血球浸潤など炎症所見の程度を捉えると共に、

各臓器における血管内皮細胞を von Willebrand factor 染色、VCAM-1 染色などで定量評価した。また、各臓器における細胞死（アポトーシス）を TUNEL 染色で定量評価する。各臓器における血管内皮細胞量および細胞死量を各群で比較検討し、骨髓間質細胞の血管内移植や脳室内移植が血管内皮再生や組織の細胞死にどのような効果を発揮するか評価した。さらに、レトロウイルスもしくは PKH67 を使用して血管内および脳室内移植細胞をあらかじめ蛍光ラベリングすることにより、移植細胞がどの臓器、組織に集まり血管再生を促進するか、細胞死を抑制するか局在の評価を行った。さらに血管内皮のアポトーシスを抑制する angiopoietin-1 の発現と細胞保護作用をもつ survivin の発現を抗体染色で評価した。同時に、アポトーシス関連因子である Fas 抗原および Bcl-2 発現を評価する。骨髓間質細胞の移植に伴う血管内皮再生効果、臓器障害軽減効果、アポトーシス抑制効果および臓器局在に注目して詳細に検討した。以上の検討で多臓器障害の発生や中枢神経障害、生存率に影響を与える移植タイミング、移植経路を明らかとし、研究の焦点をしぼり、最適な細胞移植量や移植回数の解明につなげ、再生治療戦略の確立を目指した。

4. 研究成果

(1) 熱中症モデルにおける各臓器障害、中枢神経障害に関する研究

全身麻酔下で 30 分間体温を 41.5°C で維持し、安定した熱中症モデルを作成した。熱中症モデルにおける血中マーカーの推移、各臓器障害の程度を評価した結果、血中 tumor necrosis factor alpha (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性サイトカイン、血管内皮障害、活性化のマーカーである soluble thrombomodulin、soluble endothelial selectin (E-selectin) はいずれも熱中症作成後 3 時間、6 時間の時点で著しく上昇していた。病理検査では、肺において間質浮腫、肺胞構造の破壊、肺内出血が熱中症後 6 時間で顕著に認められた。

(2) 上記熱中症モデルに対する骨髓間質細胞移植の有効性に関する研究

熱中症モデルにおける再生治療に関する研究として、骨髓間質細胞移植の効果を検討した。上記熱中症モデルにおいて、骨髓間質細胞 5×10^6 個を熱中症発症直後に 1 分間かけて血管内移植した。なお、骨髓間質細胞は、健常ラットの脛骨、腓骨から採取した骨髓細胞を特殊培地に接触させ、培養増殖させて回収した。骨髓間質細胞移植群と非移植群（コント

ロール群)の生存率を観察、比較した。その結果、骨髄間質細胞移植群の24時間生存率は2/6(33.3%)であり、コントロール群の3/5(60.0%)に比べ改善がみられなかった。今後、移植細胞の種類や移植のタイミングに関して検討が必要と考えられた。

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)

[学会発表](計3件)

- ① 松本直也、小倉裕司ら、ラット敗血症モデルに対する経静脈的骨髄間質細胞移植とその血管内皮保護効果、第40回日本救急医学会、2012年11月15日、東京
- ② 島崎淳也、松本直也、小倉裕司ら、クラッシュ症候群ラットモデルに対する抗HMGB-1抗体治療の有効性、第39回日本救急医学会、2011年10月19日、東京
- ③ 松本直也、小倉裕司ら、重症敗血症に対する新たな抗炎症治療の開発(骨髄間質細胞移植、脳症へのIL-1ra治療)、第39回日本救急医学会、2011年10月18日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 裕司 (OGURA HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70311265

(2) 研究分担者

杉本 壽 (SUGIMOTO HISASHI)
大阪大学・名誉教授
研究者番号：90127241

鋤方 安行 (KUWAGATA YASUYUKI)
大阪大学・医学系研究科・招へい教授
研究者番号：50273678

松本 直也 (MATSUMOTO NAOYA)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50359808