

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659796

研究課題名(和文)熱中症に対する新たな臓器障害戦略：遊離核酸標的治療の有効性

研究課題名(英文)A novel strategy for heat stroke: targeted therapy for free nucleotides

研究代表者

小倉 裕司(Ogura, Hiroshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70301265

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)：熱中症に伴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、新たな治療法の開発が求められる。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、遊離核酸標的治療の有効性を評価することである。遊離核酸標的治療としては、熱中症作成直後にDNase、RNase投与を経静脈的に行った。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。DNase、RNase投与は明らかな熱中後の生存率の改善をもたらさなかった。また、DNase、RNase投与による炎症性サイトカイン産生、血管内皮透過性亢進の抑制効果も十分に証明することができなかった。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with heat stroke is globally increasing, and novel therapeutic interventions to prevent the progress of organ damages are urgently required. The objectives of this study were to evaluate the pathophysiology after heat stroke and to examine the effects of DNase and RNase as anti-DAMPs (damage associated molecular patterns) therapies in a rat model. As results, there was no significant difference in mortality between DNase or RNase group and the control group. The serum concentrations of cytokines significantly increased following heat stroke, and there was no significant difference in these variables between DNase or RNase group and the control group. The enhanced vascular permeability in guts, brain or lung, evaluated by Evans blue technique was not attenuated by the administration of DNase or RNase following heat stroke. These results indicate that DNase and RNase as anti-DAMPs therapies did not exert beneficial effects in our heat stroke model.

研究分野：救急医学

キーワード：熱中症 核酸 遊離 血管内皮 臓器障害 DNase RNase

## 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。2010年における全国の熱中症による救急搬送患者は5万人を超え、死亡者は1648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対症療法に止まり、重症例に対する積極的なアプローチは皆無に等しい。したがって、熱中症に伴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、新たな治療法の開発が求められている。

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。

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の効果を検討してきた。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、熱中症に対する骨髄間質細胞移植の効果を評価したが、移植に伴う有意な生存率の改善はみられなかった。

一方、さきに確立した熱中症モデルでは、各種血中マーカーの推移、各臓器障害の程度などを評価して熱中症の病態を解析した。その結果、tumor necrosis factor alpha や interleukin-6 などの炎症性サイトカインや soluble thrombomodulin などの血管内皮障害マーカーが、熱中症作成後3時間、6時間の時点で著明に上昇すること、また病理検査では、例えば肺において6時間後に間質浮腫、肺泡構造の破壊、肺内出血が顕著に認められること、を明らかにした。以上のことより、骨髄間質細胞移植の有効性は証明できなかったが、熱中症において血管内皮障害を中心と

した多臓器障害のコントロールを進めることが熱中症の効果的な制御のために重要と考えられた。

一方、敗血症など重症病態における主要な抗炎症メカニズムとしてコリン作動性抗炎症経路が注目されており、迷走神経刺激などを介した炎症制御効果の評価が行われてつつある。我々は、熱中症モデルにおいて熱中症作成直後に約20分間の迷走神経電気刺激を行うことで生存率が有意に改善することを見出した。その際、迷走神経刺激群ではコントロール群に比べ、各種炎症性サイトカインの産生抑制とともに血管内皮障害の著しい改善が認められた。また、肺病理組織でも炎症細胞の集積が迷走神経刺激で抑制され、臓器障害の軽減もみられた (Plos One 8; e56728, 2013)。以上の結果は、内皮障害の軽減が臓器障害、生存率の改善に繋がることを示唆する。

近年、全身性炎症反応進行のトリガーとして細胞死に伴う DAMPs (ダメージ関連分子パターン) の役割が注目され、遊離した核酸 (DNA, RNA) は組織傷害性を発揮する代表的な DAMPs とされている。実際に細胞死により、ミトコンドリア由来の DAMPs (formyl peptides, DNA) が血中に放出され、好中球・マクロファージ・樹状細胞などを活性化し、“内なる敵”として臓器障害を引き起こす可能性や、核内DNAと複合体を形成するヒストンが血中に遊離すると、DICや臓器障害を引き起こす生体傷害物質となることなどが特に注目されている。

我々は、重症熱中症では異常高体温により血管内皮など全身性の細胞ダメージが顕著に見られることに注目し、熱中症に対する新たな多臓器障害戦略として遊離核酸 (DAMPs) 標的治療に思い至った。特に、熱中症急性期にトリガーである遊離核酸を分解し、その後の過剰炎症の連鎖を断ち切ることで、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、本研究を計画して準備を進めた。今日まで熱中症に対する遊離核酸標的治療の効果を評価した報告は皆無であり、本研究によって治療の有効性が明らかとなれば、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と考え、本研究を計画した。

当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義は以下の通りである。熱中症に対する新たな多臓器障害戦略として、遊離核酸標的治療の有効性を評価した国内外の報告はなく、DAMPs をターゲットとしたアプローチも本研究が初めてである。遊離核酸標的治療は、熱中症に伴う血管内皮障害、細胞死を軽減し、多臓器障害の進行を抑え、予後を有意に改善する可能性を有する。熱中症に対する有効な遊離核酸標的治療が開発、確立できれば、将来的には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ことが

できる。

## 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、遊離核酸標的治療の有効性を評価することである。熱中症に対する遊離核酸標的治療の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点に絞り実施する。

(1) 致死熱中症モデルにおいて、発症急性期に遊離核酸標的治療(核酸分解酵素 DNase、RNaseの血管内投与)を行い、各投与群において有意な生存率の改善が得られるか評価する。

(2) DNase、RNase投与、非投与群において血中サイトカイン、血管内皮障害マーカーなどの変化を定量評価し、同時に各臓器障害を群間で比較し、治療効果のメカニズムを明らかにする。その際、Evans Blueを使用した血管透過性亢進を評価し、DNase、RNase投与の血管内皮障害への直接的な効果を定量的に評価する。

## 3. 研究の方法

熱中症に対する新たな多臓器障害戦略として、遊離核酸標的治療の有効性を明らかにするため、以下の順序で研究を計画し実施した。

(1) 熱中症モデルにおける遊離核酸標的治療の生存率改善効果に関する研究

既に確立した熱中症モデルにおいて、発症急性期に遊離核酸標的治療(核酸分解酵素 DNase、RNase 投与)を行い、生存率の改善が得られるか、評価した。

熱中症モデルの作成プロトコールは、以下のとおりである。24 週齢 C57BL6/J マウス (BW 25-30g) を用い、小動物用恒温槽装置 (気温 40.1、湿度 50% に調整: BIOTRON NKsystem 日本医科器械製作所、LPH-240N-OKSP) に 60 分間、麻酔下で静置して熱中症を作成した。熱中症直後に生食 1ml を皮下注してケージに戻し、飲食自由、覚醒下で 7 日間観察した。本熱中症モデルにおける 7 日間死亡率は、約 40 ~ 60% であり、遊離核酸標的治療群と比較した。

熱中症に対する遊離核酸標的治療として、1) DNase100 µg 血中投与、2) RNase1000 µg 血中投与の 2 つの方法を用いた。DNase、RNase は、いずれも熱中症作成直後に尾静脈より静注投与した。

(2) 熱中症モデルにおける遊離核酸標的治療の血中マーカー、臓器障害におよぼす効果の研究

DNase、RNase 投与、非投与群において血中サイトカイン、血管内皮障害マーカーなどの変化を定量評価した。

血管内皮障害マーカーの検討項目として、Evans Blue (Sigma Aldrich cat. No. E2129) 投与実験を行った。熱中症作成 6 時間後、

Evans Blue 4% 溶液を 3 種混合麻酔 (メドミジン+ミダゾラム+ブトルファノール) 下のマウスの尾静脈よりインスリンシリンジで静脈内投与した。

Evans Blue 投与 30 分後、マウスの左心室から PBS を注入し、体内の血液を排泄後、腸管および肺を摘出した。腸管は十二指腸、回腸末端、上行結腸に分けて採取し、肺、脳とともに 60 の乾燥機で 48 時間以上静置、乾燥させ、ホルムアミド (和光純薬工業(株)、CAS.NO 75-12-7) 16ml/g × 乾燥臓器(g) を加え、臓器に残留している Evans Blue をホルムアミドに漏出させた。この Evans Blue の漏出したホルムアミドの分光光度を測定し、定量することで血管透過性の亢進状態を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 熱中症モデルにおける遊離核酸標的治療の生存率改善効果に関する研究

熱中症モデルにおける遊離核酸標的治療の効果を検討した。その結果、RNase投与群の24時間生存率は5/7 (71.4%) であり、コントロール群の3/5 (60.0%) に比べ有意な改善がみられなかった。24時間以降の死亡は両群ともにみられなかった。また、DNase投与に関しても投与量を調整して生存率を確認したが、コントロール群に比べて有意な改善はみられなかった。今後、投与のタイミングなどに関して検討が必要と考えられた。

(2) 熱中症モデルにおける遊離核酸標的治療の血中マーカー、臓器障害におよぼす効果の研究

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- $\alpha$ )、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、コントロール群において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、肺胞内出血が熱中症後 6 時間で顕著に認められた。

一方、DNase、RNase 投与群において、コントロール群に比べ、有意な血中炎症性サイトカインの低下や肺組織傷害の改善は認められなかった。

Evans Blue の組織漏出は、腸管(十二指腸、回腸末端、上行結腸)、肺、脳組織ともに熱中症後顕著に見られたが、各臓器組織の Evans Blue 吸光度は、DNase、RNase 投与群とコントロール群の間で有意な差を認めなかった。熱中症後の血管透過性亢進に対する DNase、RNase 投与効果に関しては今後投与量などを変えて評価する余地がある。

(1) (2) の結果から、熱中症に対する遊

離核酸標的治療として、DNase、RNase 投与は明らかな生存率の改善をもたらさなかった。また、DNase、RNase 投与による血中炎症性サイトカイン産生の抑制、血管内皮透過性亢進の抑制効果も十分に証明することができなかった。

## 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)

中川淳一郎、松本直也、小倉裕司ら、外傷による全身炎症反応とその制御、第42回日本救急医学会、2014年10月29日、福岡

松本寿健、松本直也、小倉裕司、嶋津岳士、Survival improvement by anti-RAGE antibody administration in a rat model of crush injury、第44回SCCM congress、2015年1月20日、Phoenix, USA

松本寿健、松本直也、小倉裕司、嶋津岳士、重症敗血症病態における新規免疫応答因子の評価、第42回日本救急医学会、2014年10月28日、福岡

## 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・講師  
研究者番号：70311265

### (2)研究分担者

嶋津 岳士 (SHIMAZU TAKESHI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50196474  
鎌方 安行 (KUWAGATA YASUYUKI)  
大阪大学・医学系研究科・招聘教授  
研究者番号：50273678  
松本 直也 (MATSUMOTO NAOYA)  
大阪大学・医学部附属病院・招聘教員  
研究者番号：50359808