

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791941

研究課題名(和文)クラッシュ症候群における炎症惹起と臓器障害進行のメカニズム解明

研究課題名(英文)Mechanism and control of inflammation and organ failure in crush syndrome.

研究代表者

島崎 淳也 (SHIMAZAKI, JUNYA)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40528767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：クラッシュ症候群が全身性炎症反応症候群(SIRS)から臓器不全に至るメカニズムは不明である。我々はRAGEに注目した。

クラッシュ症候群ラットモデルにおいて、抗RAGE抗体を投与することにより、炎症性サイトカインの低下がみられ生存率の向上がみられた。実際のSIRS患者において、可溶性RAGEは正常よりも上昇しており、血清HMGB1や急性期DICスコアとの相関関係がみられた。可溶性RAGEは細胞におけるRAGEの発現を反映するといわれ、SIRS患者においてRAGEの発現上昇が示唆された。

以上から、クラッシュ症候群やSIRS病態において、RAGEを制御することが病態改善につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Patients with crush injury often present systemic inflammatory response syndrome and fall into multiple organ failure, but the mechanism is still unclear. We focused on RAGE.

(1)In Rat model of crush injury, administration of anti-RAGE antibody reduced inflammatory reaction and improved survival. (2)Patient with SIRS, serum soluble RAGE increased significantly than normal. Soluble RAGE was related to serum HMGB1 or acute DIC score. Expression of RAGE reflect to serum soluble RAGE. In patients with SIRS, RAGE expression may be increased.

These results indicate blocking of RAGE such as anti-RAGE antibody may become a promising novel therapy against crush syndrome or SIRS.

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：クラッシュ症候群 全身性炎症反応症候群 RAGE HMGB1

## 1. 研究開始当初の背景

クラッシュ症候群では、地震などの大災害時に、四肢の長時間の圧迫が解除されることで、骨格筋の挫滅部からミオグロビンやカリウムなどの物質が血液中に漏出し、致死的不整脈や体液欠乏性ショック、急性腎不全を呈する。輸液や透析で急性期を乗り切った後も多臓器不全(MOF)を併発する死亡率の高い疾患であることには変わりはなく、その病態の解明は未だ進んでいない。その原因として、我々は今までに血管内皮細胞障害を起因とする全身性炎症反応症候群(SIRS)が関与していることを明らかにしてきた。さらにその誘導因子として、代表的な Damage Associated Molecular Pattern Molecules(DAMPs)である High Mobility Group Box 1(HMGB1)を同定した。HMGB1は核構成蛋白であるが、一度細胞外へ遊離するとパターン認識受容体(PRR)を介して過剰な生体反応を引き起こす。クラッシュ症候群では、急激な局所損傷組織からHMGB1が湧出すると考えられるが、興味深いことにクラッシュ損傷に反応して、HMGB1を認識するPRRの一つであるreceptor for advanced glycation end products(RAGE)の発現が遠隔臓器で増強することを同時に明らかにした。即ちクラッシュ症候群において挫滅組織よりHMGB1などの物質が血中に放出され、これらのDAMPsがRAGEシグナル系を介して全身炎症を増強させながら、加速度的にMOFを誘導しているのではないかと仮説を立て、本研究を計画した。

本研究により、クラッシュ損傷に反応して誘導されるSIRS、MOF発症のメカニズムにおいて、RAGEを焦点とした新たな経路が明確となることを期待している。外傷における生体反応の制御の側面から、RAGE機能を論じることの重要性が増すであろう。外傷においてRAGEを標的とした新規治療戦略が構築され、外傷患者のQOLの改善、医療費の削減という社会的、医療経済的な効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

現在、SIRS病態を反映する敗血症のマウスモデルなどに対し、抗RAGE抗体を投与することで、臓器障害の軽減や生存率の改善が得られることが確認されている。クラッシュ症候群においても、RAGEを標的としてDAMPs-RAGEシグナル系を抑制することは、理にかなった新たな治療法と考えられる。また、RAGEは細胞膜に発現するのみならず、一部は可溶性RAGE(soluble RAGE:sRAGE)として血中に放出されることが分かっている。sRAGEはRAGEの発現量を反映するものとして注目されている。本研究の焦点を以下の2点に絞り実施した。(1)ラットクラッシュ症候群モデルに対する抗RAGE抗体の治療効果  
確立したラットクラッシュ症候群モデルで、

抗RAGE抗体を投与し、DAMPs-RAGEシグナル系を制御することによりラットモデルの生存率向上が得られるか評価する。また同時に、各種ケミカルメディエーターなども評価する。

(2)患者におけるsRAGEの臨床的意義  
実際のクラッシュ症候群患者(もしくは、SIRS患者)においてsRAGEを測定し、重症度や各種ケミカルメディエーターとの相関を評価しsRAGEの臨床的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)ラットクラッシュ症候群モデルに対する抗RAGE抗体の治療効果

### 【ラットクラッシュ症候群モデル】

オスのWistarラット(250~300g)をペントバルビタール50mg/kg/body腹腔内注射(ip)により全身麻酔をかける。実験中、ペントバルビタールを10mg/kgずつ追加し、麻酔を維持する。外科的に外頸静脈にポリエチレンチューブを挿入し、輸液ルートとする。仰臥位で固定した後、両後脚を専用器具を用いてそれぞれ3.0kgの重りで圧迫する。6時間の圧迫の後に重りを除去し、3時間の再灌流を観察する。輸液は生理食塩水をルートから持続注入する。圧迫開始から5時間目までは1mL/kg/hの速度で輸液し、つづいて10mL/kg/hの速度で4時間輸液を行う。実験終了後は、ルートを抜去し、ラットをケージに戻す。

ラットは、sham群(SH群)、クラッシュ群(CR群)および抗RAGE抗体投与群(RAGE群)の3群にランダムに分類した。SH群は、上記手技のうち下肢圧迫を行わなかった。RAGE群は、重りの圧迫解除直後に、抗RAGE抗体(Santa Cruz, CA, USA)100 $\mu$ +リン酸バッファー(PBS)合計1mLを経静脈的に単回投与した。CR群はコントロール抗体+PBSの合計1mL投与を行った。

ケージに戻したラットは7日目まで生存を確認した(SH群n=6、CR群n=20、抗RAGE群n=20)。生存確認とは別個体を用いて採血を行った(CR群・SH群ともに3時間目n=8、6時間目n=7・24時間目n=4)。

### 【採血検査】

採血は圧迫解除後3・6・24時間後に行い、血清を冷凍保存した。採血項目はIL-6を測定し、ELISA法で測定した。

(2)患者におけるsRAGEの臨床的意義

### 【対象】

2012年11月から2013年9月までの期間に大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターにおいて診療を行った18歳以上のSIRS診断基準を満たした成人患者。原因疾患は、敗血症、重症外傷、蘇生後脳症などのSIRSを呈する疾患を対象とした。で行った。SIRS患者に対する比較対照として12名の健常者からも同様の採血検査をおこなった。

## 【方法】

採血および研究エントリーのタイミングは、SIRS 診断後 24 時間以内に限定した。採血時点での重症度スコアも同様に集積した。以下に挙げる項目を評価し SIRS 患者における sRAGE の臨床的意義を明らかにした。

・ sRAGE

・ 炎症系マーカー (TNF、IL6) 凝固線溶系マーカー、(PAI1、FDP、Dダイマー等) 血管内皮障害マーカー (PAI1、sVCAM1) DAMPs (HMGB1)

・ 血中乳酸値評価

・ 重症度スコア評価: 採血時点の SIRS 患者の重症度に関して、APACHE II スコア、SOFA スコア、ISS スコアによって評価した。

・ 凝固線溶系評価: 採血時点の凝固線溶異常を、急性期 DIC スコアを算出することで評価した。

## 4. 研究成果

(1) ラットクラッシュ症候群モデルに対する抗 RAGE 抗体の治療効果

### 【生存率】

SH 群は全個体が生存した。RAGE 群の 24 時間目の生存率は 80%(16/20)に対し CR 群は 35%(7/20)であった。7 日生存率は、RAGE 群で 50%(10/20)に対し CR 群では 10%(2/20)であった。7 日生存率は抗 RAGE 群で CR 群と比較して有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

### 【採血検査】

RAGE 群では血清 IL-6 値は圧迫解除 3 時間でピークを迎え、その後漸減していった。RAGE 群は CR 群、SH 群と比較して 7 日間生存率は有意に改善していた。RAGE 群また CR 群、SH 群と比較して IL6 は有意に低下していた。

一般に、クラッシュ症候群では組織が損傷を受けると、挫滅部で HMGB1 などの DAMPs が細胞外へ逸脱する。RAGE は、HMGB1 などの DAMPs と結合することで、NF- $\kappa$ B 経路を介して IL-6 細胞などの炎症性メディエーターの産生を促進する。これらの炎症性メディエーターにより SIRS が惹起され、重篤化すると DIC/MOF から死に至る。この研究の結果から、抗 RAGE 抗体により炎症惹起が抑制され、その結果として死亡率を改善している可能性が示唆された。今後、抗 RAGE 抗体の実臨床における SIRS 患者における治療薬として期待される。

### (2) 患者における sRAGE の臨床的意義

本研究で対象とした患者 56 名であった。男性 37 名、女性 19 名で、年齢中央値は 62 歳であった。疾患は多発外傷 25 名、敗血症 24 名、その他 7 名であった。患者群の重症度評価としては、SIRS はスコア別に 2 点 23 人、3 点 18 人、4 点 15 人であった。APACHE II スコア中央値が 22 点、SOFA スコア中央値が 4 点、DIC スコア中央値が 3 であった。SIRS 患者 (中央値 620 ng/mL) では健常対照者 (中

央値 454 ng/mL) と比較して sRage 値は有意に増加していた。sRage 値は APACHE II スコア ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.401$ )、SOFA スコア ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.409$ )、ISS ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.409$ ) と有意な相関を認めた。sRage 値は急性期 DIC スコアと有意な相関を認めた ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.455$ )。sRage 値は乳酸値 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.382$ )、IL6 値 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.506$ )、HMGB1 値 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.331$ )、PAI1 値 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.305$ )、VCAM 値 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.269$ )、血小板値 ( $p < 0.05$ ,  $r = -0.302$ )、FDP 値 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.276$ ) であった。

本研究では SIRS 患者における血清 sRAGE 値は、健常人より有意に増加していた。血清 sRAGE 値は血清 HMGB1 値 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.331$ ) と相関関係がみられた。RAGE は血管内皮細胞やリンパ球、単球、マクロファージなど、広範囲に確認されている。RAGE は Toll 様受容体などと同様に PRRs の一員と考えられている。Rage のリガンドとしては、リポ多糖 (LPS) や DAMPs である HMGB1 など様々なものが報告されている。これらのリガンドとの結合により下流のシグナル系が活性化し炎症が惹起される。RAGE うち一部は、酵素により切り離され、sRage として血中に遊離する。sRAGE は RAGE の発現量を反映することから、炎症などのバイオマーカーと sRAGE が注目されている。これまで、sRAGE が膠原病、糖尿病などの慢性炎症病態で増加するが報告されてきた。近年、感染性 SIRS 病態である敗血症においても sRAGE が増加することがわかってきた。本研究結果から SIRS 病態において HMGB1 などの DAMPs-RAGE シグナル系が活性化し、炎症惹起に関連している可能性が示唆された。

本研究では HMGB1 以外にも、sRAGE 値は APACHE II スコア、SOFA スコア、急性期 DIC スコア、IL6 値、PAI1 値、VCAM 値と相関がみられた。RAGE はリガンドと結合後、MAP キナーゼや NF- $\kappa$ B などの下流シグナルが活性化し RAGE 発現細胞からの IL6 の産生増加や、血管内皮細胞から細胞接着分子の VCAM の発現などがみられる。白血球などの炎症細胞は、これらの血管内皮細胞上の VCAM と固着し、血管内皮が障害される。DIC の主たる病態は血管内皮障害である。本研究の結果は、SIRS 病態において RAGE シグナル系が血管内皮障害を惹起し、凝固障害を惹起している可能性がある。さらに、RAGE シグナル系による炎症反応、凝固障害の亢進が重症化の要因となっている可能性が示唆される。

また、本研究では sRAGE 値は ISS の上昇に伴い有意に増加していた。ISS は解剖学的な重症度スコアで、外傷の組織損傷程度を評価するものである。一般に、外傷により組織が損傷を受けると、HMGB1 などの細胞内成分が細胞外へ逸脱する。細胞外へ逸脱した成分 (DAMPs) は、組織損傷の程度に伴い、逸脱

する量は増加する。この DAMPs は免疫担当細胞上に存在する、TLR や RAGE などの PRRs によって認識される。本研究の結果は、外傷において、これらの経路で RAGE が活性を亢進している可能性を示唆するものである。

以上から sRAGE 値は SIRS 患者で健常人より優位に増加し、SIRS 患者の重症度・DIC スコアと有意な相関が見られることがわかった。RAGE の発現量を反映する sRAGE 値は SIRS 患者の重症度、凝固障害を反映している可能性があり、RAGE が臨床における SIRS 患者においても重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(1)(2)の研究から、臨床患者においても抗 RAGE 抗体などを用いて RAGE をブロックすることが治療方法として有用となる可能性が考えられた。

## 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)

[雑誌論文](計 2件)

Shimazaki J, Matsumoto N, Ogura H, Muroya T, Kuwagata Y, Nakagawa J, Yamakawa K, Hosotsubo H, Imamura Y, Shimazu T. Systemic involvement of high-mobility group box 1 protein and therapeutic effect of anti-high-mobility group box 1 protein antibody in a rat model of crush injury. Shock 2012; 37(6): 634-638.(査読あり)

Yamakawa K, Matsumoto N, Imamura Y, Muroya T, Yamada T, Nakagawa J, Shimazaki J, Ogura H, Kuwagata Y, Shimazu T. Electrical vagus nerve stimulation attenuates systemic inflammation and improves survival in a rat heatstroke model. PLoS One 2013; 8(2):e56728 (査読あり)

[学会発表](計 3件)

島崎淳也:クラッシュ症候群における臓器障害進行のメカニズム解明と制御. 第112回外科学会(東京)2012年4月13日.

小倉裕司:SIRS病態の解明とその制御:細胞機能、免疫機能からみたアプローチ.第41回集中治療学会(京都)2014年2月27日.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

島崎 淳也 (SHIMAZAKI JUNYA)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号:40528767