

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09033

研究課題名（和文）重症熱中症の病態解明および血管内皮障害に対する新規治療法探索

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of severe heat stroke and exploration of novel therapeutic approaches for vascular endothelial dysfunction

研究代表者

平湯 恒久（Hirayu, Nobuhisa）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：00647745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：熱中症は近年増加傾向にあるが、臓器障害から死に至る重症例に関しては病態について不明な点が多く、冷却以外の治療法が確立されていない。本研究では、熱中症モデルマウスの作成、高温による直接作用、新規治療法の検討を行った。高温多湿環境を作成し、深部温度の上昇を伴う熱中症モデルマウスを作成し、培養細胞（HUVEC）を高温に曝露することで血管内皮障害が発生することを確認した。また、血液サンプルの加温により凝固障害を認めた。新規治療法として、Mito-EVsをNanosightおよびフローサイトメータで評価し、加温したEVsサンプルで平均蛍光強度の低下を観察し、ミトコンドリア機能不全が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、重症熱中症における臓器障害の病態解明と新規治療法の探索について行った。高温環境が凝固障害、血小板の活性化、血管内皮障害を引き起こすことが示唆された。現在の重症熱中症診療における治療の根幹は、素早く体温を下げることにあるがそれを裏付ける病態と考えられる。さらに、加温によるmitochondriaの機能不全を示唆する結果を得て、新規治療の可能性を探る基礎を築いた。これにより、冷却以外の新規治療法探索の一助となり、今後の熱中症治療の進展が期待され、社会的にも有益な成果といえる。

研究成果の概要（英文）：Heatstroke has been increasing in recent years, but there are still many unknown aspects about the pathophysiology of severe cases leading to organ failure and death. Currently, cooling is the only established treatment. This study involved creating a heatstroke mouse model, investigating the direct effects of high temperatures, and exploring potential new treatments. We created a high temperature and high humidity environment to induce heatstroke in mice, causing an increase in intraperitoneal temperature. In cultured HUVEC cells, increasing the incubator temperature resulted in vascular endothelial injury. Heating blood samples indicated coagulation disorders as suggested by blood viscoelasticity tests. For new treatments, we focused on mitochondria and evaluated Mito-EVs from plasma using Nanosight and flow cytometry. In heated EVs samples, the mean fluorescence intensity decreased, indicating mitochondrial dysfunction due to heating.

研究分野：熱中症、救急集中治療、血管内皮障害

キーワード：重症熱中症 血管内皮障害 細胞外小胞 ミトコンドリア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 地球温暖化と高齢化を背景に、近年、熱中症は増加傾向にあり社会的に注目されている。一般にその重症度は、めまいや筋痙攣を呈す軽症例(一度熱中症)から、意識障害や播種性血管内凝固症候群(DIC)を呈す重症例(二度熱中症)まで様々であるが、特に臓器障害から死に至る重症例に関しては、病態について不明な点が多く、冷却以外の治療法が確立されていないのが現状である。

(2) これまでの報告では、熱中症初期からの DAMPs (Damage associated molecular patterns) として HMGB1 や、NETs (Neutrophil extracellular traps) の構成成分である Histone の上昇などが報告され、HMGB1 や Histone の熱中症バイオマーカーとしての有用性が報告されているが、まだ報告数が少なく、治療には役立っていない。

(3) 熱中症急性期の血小板の著明な低下は、病態を反映する特徴的所見である。血小板の活性化に伴って放出される血小板由来蛋白や血小板由来細胞外小胞 (Platelet-derived Extracellular Vesicles : 以下 Plt - EVs) が病態の形成や修飾、あるいは修復に深くかわるのではないかと推測されるが、その詳細については全く不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、重症熱中症における臓器障害の要因である血管内皮細胞障害に対し、血小板からの抽出物が修復に寄与し、熱中症の新たな治療となりうるかを基礎的に検討することである。

### 3. 研究の方法

#### 熱中症マウスモデルの作成

C57BL/6 の腹腔内にボタン電池型データロガーであるサーモクロン G (株式会社 KN ラボラトリーズ) を全身麻酔下に埋め込み、2週間マウスに問題がないことを確認した上で実験を開始した。高温多湿環境はインキュベーター (アズワン) 内に角形トレーの中に水を張り、周囲に濡らしたキムタオルを置き、庫内温度を 40-41 に設定することで湿度 90%以上の高温多湿環境を作成した。

- 1) 41 の多湿環境下に 16 週齢のマウスを入れ、腹腔内温度変化を観察。
- 2) 40 の多湿環境下で 20,30 分飼育した直後に採血を行い VE-Cadherin (Abcam) を ELISA で測定。

#### 高温による変化

- 1) HUVEC (LONZA) を EGM<sup>TM</sup>-2 Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit<sup>TM</sup> で培養し、コンフルエントになった状態で EGM<sup>TM</sup>-2 Basal Medium に入れ替えリアルタイム細胞解析装置 (ECIS<sup>®</sup> Z-Theta) で resistance が安定したのを確認しインキュベーターの温度を 42 に上げその後の培養細胞の resistance を測定した。
- 2) 健常マウスを全身麻酔下に後大静脈より採血 (クエン酸 Na) を行い、通常採血と採血後に Mini Dry Bath (Hangzhou Yooning) を用いて 43 で 50min 温めた血液を PBS で

倍希釈し、TEG 6s( Haemonetics )のグローバルヘモスタシスカートリッジで測定した。

#### 熱中症モデルにおける新規治療に向けた検討

##### 1) 健常マウスにおける血漿中の Mito-EVs の検出

健常マウスを全身麻酔下に後大静脈より、抗凝固剤を ACD として全血を採血した。サンプルに PG-I<sub>2</sub> を加えながら、サンプルを低 G より段階的に遠心することで、血小板の活性化を回避しながら platelet poor plasma ( PPP ) を作成した。PPP 250  $\mu$ l から ExoQuick ULTRA EV Isolation Kit ( System Biosciences ) を用いて、細胞外小胞 ( Extracellular Vesicles : EVs ) を分離した。

2) 粒度分布計 Nanosight LM10 ( Malvern Panalytical ) を用いて、分離したサンプルの粒度分布とサンプル 1ml あたりの全 particle 数を算出。サンプル内の EVs particle 量が  $1 \times 10^{10}$  particles/ml になるよう f-PBS ( f-PBS : 1.0  $\mu$ m のフィルターで濾過したリン酸緩衝液 ) で調整した。

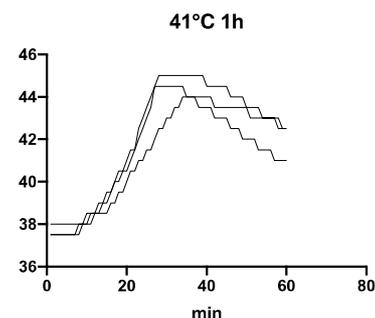
3) Mito-EVs を、ミトコンドリアマーカと細胞膜マーカが共に陽性のものと定義した。正常血漿 EVs 中の Mito-EVs の有無を Nanosight ( ブルーレーザー、488nm フィルター使用 ) における顕微鏡目視とフローサイトメータ ( CytoFLEX : Beckman Coulter ) による定量を試みた。前者は、調整したサンプルをミトコンドリアマーカであるラベリング色素 ( MitoBright LT Green : DOJINDO ) で 60 分間染色。染色後、EVs サンプル 10  $\mu$ l を f-PBS 990  $\mu$ l に浮かべ、Nanosight で 50  $\mu$ l/min の速度で流し、直視下に観察した。後者は、EVs サンプルをミトコンドリアのラベリング色素 ( MitoBright LT Deep Red : DOJINDO ) と細胞膜のラベリング色素 ( CellBright Steady 488 Membrane Staining Kit : Biotium ) を遮光下に順次ラベリングした後、フローサイトメータを用いて測定した。

4) EVs サンプル 250  $\mu$ l を、Mini Dry Bath で 43 50 分加温した後、各マーカでラベリングした後、フローサイトメータで評価した。

#### 4 . 研究成果

##### 熱中症マウスモデルの作成

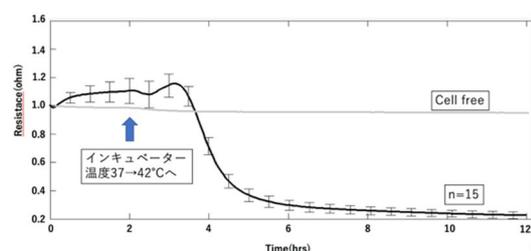
1) 41 の高温多湿環境下に 16 週齢マウスを置くと、約 30 分後に腹腔内温度は最高温度に達し、その後は低下していった。60 分後にマウスを確認すると全て死亡しており、最適温度は 30 分以内と判断した。



2) 40 の高温多湿環境下に 20 分もしくは 30 分マウスを置き、その後室温に戻した段階で採血をして VE-Cadherin を測定したところ、2054pg/ml vs 2866pg/ml と高温多湿環境下に長くいたマウスの方が高く、血管内皮障害を示唆しているものと考えられた。

##### 高温による変化

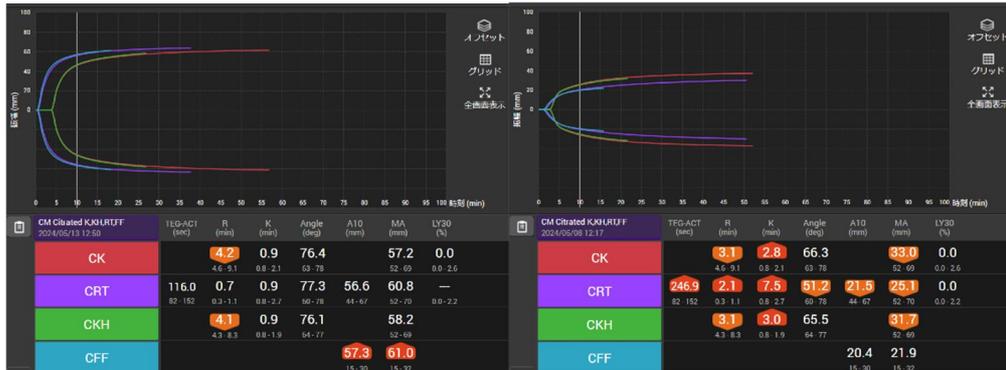
1) コンフルエントとなった HUVEC を用い、EGM™-2 Basal Medium に入れ替え、resistance が安定したのを確認しインキュベーターの温度を 37 から 42 に上げた



ところ、約 2 時間後より resistance が低下した。

直視下で観察すると細胞間隙が開いており一部の細胞は剥がれ落ちていた。高温で細胞を培養すると F-actin が増加することが報告されており<sup>1)</sup>、高温による血管内皮障害が起こったものと示唆された。

2) 通常採血と採血後に 43 50 分間加温した血液での TEG 6s の結果を以下に示す。



通常採血

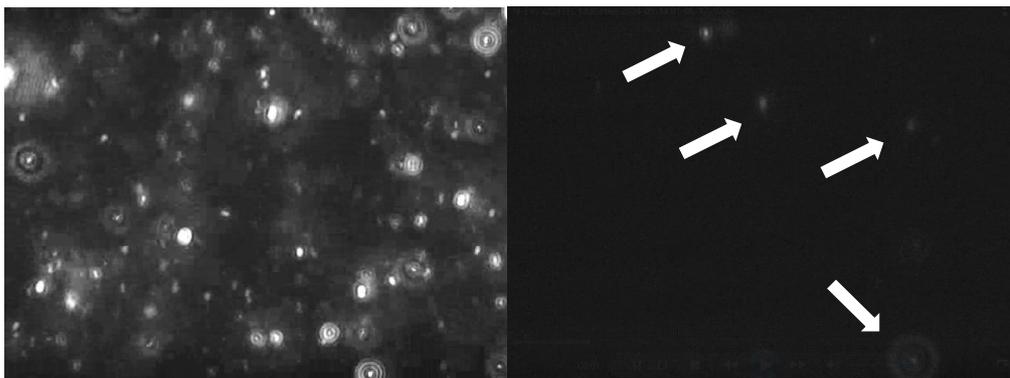
43 50 分間加温

加温することで TEG-ACT の延長、内因系・外因系ともに障害され、CRT・CFFからは血小板機能低下も示唆された。高温によって血小板が活性化した可能性が考えられる。

#### 熱中症モデルにおける新規治療に向けた検討

1) 健常マウスにおける血漿中の Mito-EVs の検出 Nanosight による評価

健常マウスより作成した血漿中の EVs サンプルにおいて、Mitochondria マーカー陽性の particles の存在が、Nanosight (488nm レーザー下) 上で確認された。その 1 例を示す。



< 左：蛍光フィルター無し、右：蛍光レーザー、488nm フィルター使用下 MitoBright LT Green 陽性像を矢印で示す >

2) 正常マウス血漿中の Mito-EVs の存在について フローサイトメータによる評価

ミトコンドリアマーカーおよび細胞膜ラベリング色素で染色したサンプルにおいて、両者が陽性の Mito-EVs と考えられる particles が検出された。フローサイトメータによる測定では、標識粒子を用いて 100nm 径～900nm 径の小粒子分画をゲーティング (EVs 分画と設定) し、さらに EVs 分画を large-particles 分画 (200nm～900nm) と

small-particles 分画 (100nm ~ 200nm) をそれぞれゲーティングし評価した。  
MitoGreen 陽性の particles の多くは large-particles 分画に存在した。

### 3) 加温サンプルにおける Mito-EVs の変化

調整したサンプルを 2 つに分け、一部は 43 50 分加温した後に、上記マーカーでの染色を行い、非加温サンプルとフローサイトメーターで Mito-EVs の陽性率などを比較した。加温サンプルにおいて、large-particles 分画の Mito-EVs 分画の割合は変わらなかったが、Mitochondria マーカー (Mito Deep Red) の平均蛍光強度は低下傾向を示した。

#### 【研究のまとめと今後の展望】

本研究において、熱中症モデルマウスの作成に成功し、高温環境下によって凝固障害・血小板の活性化、血管内皮障害が起こることが *in vitro* で示唆された。これは、現在の熱中症診療における素早く体温を下げる意義につながるものと考えられる。また、近年 mitochondria が各種病態との関連について検討が行われている。筋肉等から抽出分離した mitochondria そのものの移植が、ある種の病態や臓器不全に対して有効な治療となりうるとする報告もあり、熱中症と mitochondria の関係、新規治療として用いることができないか検討した。加温サンプルにおいて large-particles 分画の量的変化は見られなかったが、平均蛍光強度が低下したことから機能不全を起こしている可能性も考えられる。今後、平均蛍光強度の低下が本当に機能不全を示しているのかの検討を加え、健常な mitochondria の投与そのものが熱中症モデルマウスに対して新規治療となりうるか更なる検討が必要である。

#### 参考文献

- 1) Tulapurkar ME, Almutairy EA, Shah NG, He J ren, Puche AC, Shapiro P, et al. Febrile-Range Hyperthermia Modifies Endothelial and Neutrophilic Functions to Promote Extravasation. *Am J Resp Cell Mol.* 2012;46(6):807–14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高須 修  (Takasu Osamu)  (90236216)	久留米大学・医学部・教授    (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関