

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09424

研究課題名(和文)遊離ヘムをターゲットとする横紋筋融解症における急性腎障害の病態解明と治療の立案

研究課題名(英文) Assessment and treatment of acute renal failure targeting free-heme in rhabdomyolysis

研究代表者

射場 敏明 (Iba, Toshiaki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40193635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：熱中症の増加に伴い横紋筋融解のリスクが高まりつつある。今回横紋筋融解における臓器障害のメカニズムをミオグロビン(Mgb)やヘムとの関連から検討した。ヘモグロビン(Hgb)/Mgbによる腎系球体血管内皮細胞の直接障害に関しては、Hgb 4,000 µg/mLあるいはMgb 2,000 µg/mLで顕著な細胞死の誘導が確認された。上記変化は用量依存性であり、よってHgb/Mgbには直接的な腎系球体血管内皮細胞障害作用がみられるものの、熱中症による横紋筋融解でみられる血中Mgb濃度は20 µg/mL程度であることから、臨床的にはMgbが直接系球体障害をきたしているとは考えにくいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球温暖化に伴う熱中症の増加は喫緊の課題となっている。熱中症における急性腎障害の成因には横紋筋融解に伴うミオグロビンの逸脱による腎系球体への直接障害と脱水や凝固異常による二次的障害が考えられている。今回の検討により、ミオグロビンやヘモグロビンなどのヘム関連蛋白には内皮細胞に対する直接的な障害作用がみられることが確認された。しかし実際に熱中症症例でみられる程度の血中濃度では腎系球体血管内皮細胞に対する障害作用は軽度であり、熱中症においては、それ以外の要因との複合作用により急性腎障害が発症していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：The risk of tissue damage due to rhabdomyolysis is increasing with the rise in heatstroke cases. In this study, we attempted to elucidate the relationship between myoglobin (Mgb), heme, and the severity of heatstroke. We investigated the direct damaging effects of hemoglobin (Hgb)/Mgb on renal glomerular endothelial cells. As a result, induction of cell death was observed at Hgb concentrations of 4,000 µg/mL and Mgb concentrations of 2,000 µg/mL. These effects were dose-dependent, and at concentrations below these levels, the damage was mild. Although Hgb/Mgb showed a direct damaging effect on renal glomerular endothelial cells, the blood concentration of Mgb observed in rhabdomyolysis is approximately 20 µg/mL. Therefore, it is unlikely that Mgb is causing glomerular damage in a clinical setting.

研究分野：救急災害医学

キーワード：熱中症 横紋筋融解 急性腎障害 ミオグロビン 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化現象に伴い、熱中症頻度が増加しつつある。熱中症においては横紋筋融解によって急性腎障害が頻発することが知られているが、その病態生理や詳細な発生メカニズムは明らかにされていない。急性腎障害は例え軽微であっても反復することによって慢性腎不全に移行し、結果として維持透析が必要となることも多いため、本人の負担や社会の負担が大きい。そのため慢性腎不全の導入を予防するような対策が極めて重要である。現在、赤道周辺の熱帯地域では農園労働者、建設業従事者を中心に慢性腎不全の増加が報告されており、深刻な社会問題となっている¹⁾。昨今の平均気温の上昇に鑑みると、上記の状況は近い将来に我が国においても無視できない問題となることが予想される。したがって熱中症における腎障害をはじめとする重症化の病態生理を解明することは喫緊の課題である。

2. 研究の目的

横紋筋融解に伴う腎障害の発生機序としてはミオグロビン(Mgb)による直接的な尿細管障害や糸球体障害、あるいは熱障害によって誘導される炎症刺激や血栓形成による thromboinflammation の関与などが考えられている。我々もこれまでの研究により、白血球や血小板、血管内皮細胞の暑熱による活性化、あるいは細胞障害が微小血栓形成に関与することを報告してきたが、直接的な熱障害とともに、暑熱によって誘導される炎症反応、細胞死、エネルギー失調、凝固異常なども複雑に関与していることが想定される。一方、診断に関しては、熱中症に固有のバイオマーカーは存在せず、正確な診断は困難な状態である。また治療に関しても、冷却や補水などの対症療法とともに不全臓器に対する対処が個別に行われるのみである。急性腎障害の治療としても、脱水やナトリウムの補正、Mgb のウォッシュアウトを目的とする大量輸液治療が実施されるものの、効果的な原因治療は行われていないのが実情である。今回の研究では急性腎障害の発生には Mgb/ヘモグロビン(Hgb)など、ヘム関連蛋白による糸球体血管内皮障害や白血球の活性化、細胞死を推定し、病態成立機序の解明とともに治療薬剤として生理的ヘム関連蛋白のスカベンジャーであるヘモペキシンの効果を確認することも目的とした。

3. 研究の方法

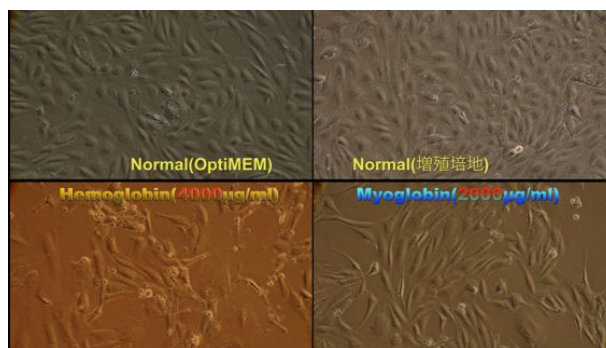
(1) Mgb/Hgb による腎障害には尿細管障害とともに糸球体障害、特に糸球体内皮細胞障害が考えられている²⁾。その際、熱中症では横紋筋誘拐により血中 Mgb 濃度は 20 $\mu\text{g/mL}$ 程度、尿中 Mgb 濃度が 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 程度にまで上昇することが報告されている。よって今回の研究では、まず培養腎糸球体血管内皮細胞を用いて Mgb/Hgb の直接的障害効果を確認することを目的とした。

(2) 次にこれまでの研究により、Mgb/Hgb による糸球体障害には、白血球の neutrophil extracellular traps (NETs) 放出を介して生じる可能性が示唆されているため、併せて予備実験として *in vivo* の実験系において生体顕微鏡下に、ラットの腹腔内より採取した好中球の Mgb/Hgb による障害への関与についても検討を行った。一方、実験結果として予想したような障害がみられない場合は、ヒト培養尿細管細胞と白血球の共培養実験を実施し、白血球の NETs 放出を介した Mgb/Hgb の障害効果を確認する予定とした。

(3) さらに労作性熱中症における腎障害の発症メカニズムとして、Mgb/Hgb による血管内皮細胞障害、あるいは白血球の障害が確認された場合は、ヘム関連蛋白の生理的スカベンジャーであるヘモペキシンの障害緩和効果も併せて検討することとした³⁾。

4. 研究成果

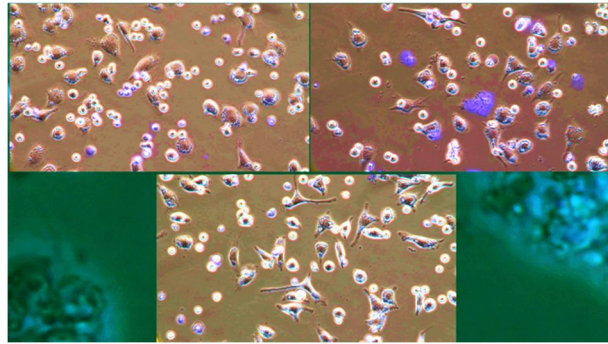
(1) Hgb/Mgb による腎糸球体血管内皮細胞の直接障害に関しては、Hgb 4,000 $\mu\text{g/mL}$ あるいは Mgb 2,000 $\mu\text{g/mL}$ で 6~8 時間後に顕著な細胞死の誘導が確認された(右図)。一方、これより低濃度(Hgb 2,000 $\mu\text{g/mL}$, Mgb 1,000 $\mu\text{g/mL}$)の場合には 8 時間経過後も障害効果は軽微であり、他方、より高濃度(Hgb 10,000 $\mu\text{g/mL}$, Mgb 5,000 $\mu\text{g/mL}$)の場合には、6 時間後に細胞の縮小とともに細胞間隙の拡大、さらに細胞数が減少して内皮細胞死をきたすことが確認された。



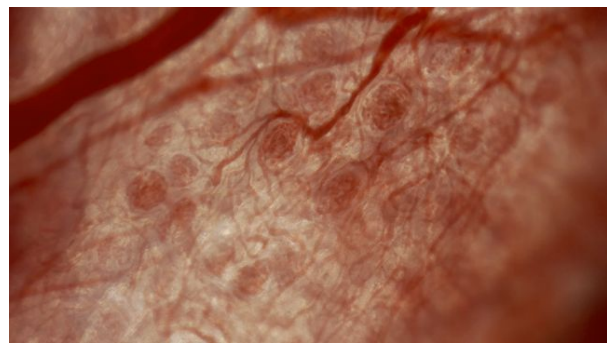
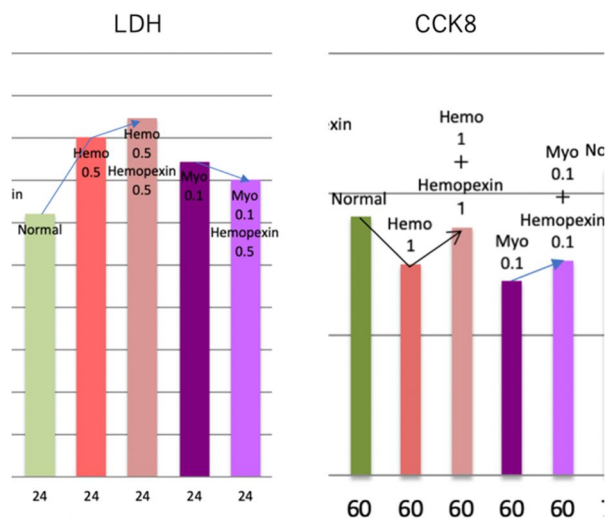
以上の結果から、Hgb/Mgb には直接的な腎糸球体血管内皮細胞障害作用がみられることが確認された。しかし熱中症による横紋筋融解でみられる血中 myoglobin 濃度は 20 $\mu\text{g/mL}$ 程度であることから、臨床的には myoglobin が直接糸球体障害をきたしている可能性は低いのではないかと考えられた。また上記変化は用量依存性であることから、Hgb/Mgb には直接的な腎糸球体血管内皮細胞障害作用がみられるものの、熱中症による横紋筋融解でみられる血中 Mgb 濃度は 20

μg/mL 程度であることからすれば、臨床的には Mgb が直接糸球体障害をきたしているとは考えにくいと考えられた。ただし、今回は内皮細胞障害に焦点を絞った検討であり、尿管障害の検討は行われていない。尿中の Mgb 濃度は 1,000 μg/mL 程度にまで上昇する可能性があることを考えれば、今後検討すべき課題であろう。

(2) 採取した白血球に対し培養液中に Hgb 100 μg/mL, あるいは Mgb 100 μg/mL を加えて継続的に観察したところ、添加 22 時間後には有意な NETs 放出の増加が確認された(右図)。また Hgb/Mgb 非添加の場合と比較して細胞の変形や細胞死の増加が観察された。Hgb/Mgb による細胞死の増加が血管内皮細胞障害にどのように関わっているかについては、今回は明らかにできなかったが、白血球の障害は比較的低濃度の刺激によっても観察されたため、NETs, や damage-associated molecular pattern(DAMPs)の関与は臨床的には意義がある可能性が考えられた。



(3)以上実験により、高濃度 Hgb/Mgb による腎糸球体血管内皮細胞障害、比較的低濃度 Hgb/Mgb による白血球の障害が確認されたことから、ヘモペキシンによる細胞障害緩和効果についても引き続き検討を行った。培養内皮細胞に対し、培養液中に Hgb/Mgb を添加し、細胞障害の指標として LDH、生細胞数の指標である CCK8 の測定を実施した。その結果、ヘモペキシンの投与により、Mgb による LDH の低下、Hgb, Mgb による CCK8 の増加が観察されたことから、ヘム関連蛋白による内皮細胞障害はヘモペキシン投与により、改善できる可能性が示唆された(右図)。さらにその効果は培養細胞の形態観察によっても確認された。以上の結果から、ヘム関連蛋白は熱中症における腎障害の発生メカニズムに関与しており、その障害はヘモペキシンによって緩和できる可能性が示唆された。今回の検討結果をもとに、現在 *in vivo* の Hgb/Mgb による糸球体障害モデルを作成して、血流障害や好中球の NETs 放出効果を確認する実験を準備しており(右図)、今後は熱中症の *in vivo* モデルを用いて生体顕微鏡下における微小循環観察を行うことにより、Mgb/Hgb による糸球体障害とともに、ヘモペキシンによるヘム関連蛋白による障害緩和効果を検討する予定である。



引用文献

1. Garcia-Trabanino R, Jarquín E, Wesseling C, et al. Heat stress, dehydration, and kidney function in sugarcane cutters in El Salvador--A cross-shift study of workers at risk of Mesoamerican nephropathy. *Environ Res*. 2015 Oct;142:746-55.
2. Vercellotti GM, Balla G, Balla J, et al. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1994;22(2):207-13.
3. Adornato BT, Kagen LJ, Garver FA, et al. Depletion of serum hemopexin in fulminant rhabdomyolysis. Evidence for an interaction of hemopexin with myoglobin-derived heme. *Arch Neurol*. 1978 Aug;35(8):547-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iba T, Connors JM, Levi M, Levy JH.	4. 巻 44
2. 論文標題 Heatstroke-induced coagulopathy: Biomarkers, mechanistic insights, and patient management.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EClinicalMedicine.	6. 最初と最後の頁 101276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.eclinm.2022.101276.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iba T, Levy JH, Raj A, Warkentin TE.	4. 巻 8
2. 論文標題 Advance in the Management of Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8050728.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Iba T
2. 発表標題 DIC and Vascular Endothelium.
3. 学会等名 The XXVII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------