

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18337

研究課題名（和文）外傷性出血性ショックに起因した多臓器不全におけるHMGB1の作用解明と治療展望

研究課題名（英文）Elucidation of activity of HMGB1 and therapeutic prospects in multiple organ failure caused by traumatic hemorrhagic shock

研究代表者

吉野 由希子（Yoshino, Yukiko）

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：80813097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、外傷と出血のtwo-hitにより生じた各種炎症性サイトカインが、その濃度依存性に臓器障害を誘導しうることを時系列で証明したものである。マウスの骨軟部組織をミンチしたもの（以下TBX）を同種マウスに移植する骨軟部組織損傷モデルに出血性ショックを加え、作成24時間後のマウスの血漿中の炎症性メディエータを測定した。データ分析により、TBX背部皮下移植が全身性炎症を惹起させることが分かり、さらに関連分子（HMGB1）値と外傷性出血性ショックの重症度との相関性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、外傷により生じた炎症性サイトカインが、濃度依存性に各臓器障害を誘導することを時系列で証明し、炎症性サイトカインをターゲットとした新規治療およびその治療開始時期を提案することを目的とした。重症外傷後に発生する臓器障害の機序解明に新たな展開をもたらす可能性があり、多臓器不全の治療戦略構築に大きく貢献する可能性がある。外傷は、医学の進歩や時代の流れに左右されることなく一定数生じ、今後も患者数の減らない疾患であるため、治療への社会的ニーズが衰えない領域であり、研究価値のある学問である。

研究成果の概要（英文）：This study shows a relationship between the two-hit model of trauma and hemorrhagic shock and inflammatory cytokines. Inflammatory mediators were measured in plasma of mice within 24 hours. We showed a correlation between the level of injuries and the level of trauma related elements (HMGB1) which is a trigger of systemic inflammation.

研究分野：救急医学

キーワード：HMGB1 骨軟部組織損傷 外傷 ショック 外傷後臓器傷害

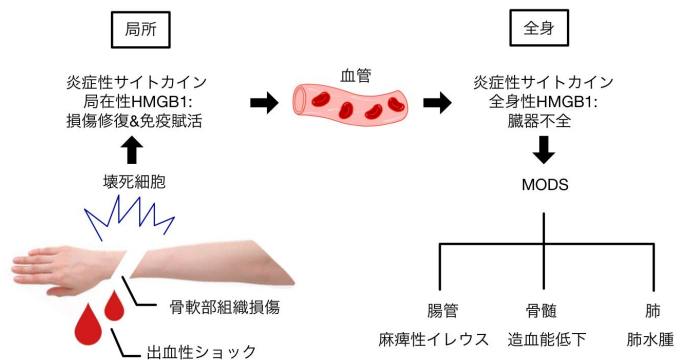
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本医科大学高度救急救命センターは、年間約 2000 症例の 3 次救急疾患を受け入れている。そのうち約 20%にあたる約 400 症例は、骨折や軟部組織損傷を含む重症外傷である。局所の骨軟部組織損傷において、我々が最も難渋する治療のひとつに、出血性ショックと多臓器不全 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)を合併した症例がある。原因として、外傷による侵襲が炎症性サイトカインを活性化し、全身性に制御不能なまでの炎症が惹起され、MODSを引き起こすと推察されるが、その詳細な発生機序は未だ明らかとなっておらず、その死亡率は、集中治療の進歩した現在においても依然高いままである。

これまでは主に、出血性ショックそのものが各臓器に与える虚血・再灌流傷害および外傷後の多臓器不全に関して、様々な研究が行われてきた。しかし、重症外傷患者では多くの場合、出血性ショックを生じる原因が、著しい骨軟部組織損傷に起因するため、出血性ショックだけでなく骨軟部組織損傷も、多臓器障害の発生に重要な役割を果たしていると考え、骨軟部組織損傷の程度、出血性ショックの程度、血中炎症性サイトカイン濃度、各臓器障害の程度には、相関性があるのではないかとこの着想に至った。

我々は過去に、軟部組織損傷を伴う外傷を想定したマウスモデルにおいて、血中炎症性サイトカインの濃度依存性に、MODS の症状のひとつである消化管麻痺性イレウスが生じることを報告した [1]。本研究では、この成果を発展させ、腸管機能だけでなく骨髄や肺を対象とすることで、重症外傷が主要臓器に与える影響を網羅的に明らかにすることができると思う(右図)。



本研究は、外傷により生じた炎症

性サイトカインが、濃度依存性に各臓器障害を誘導することを時系列で証明し、炎症性サイトカインをターゲットとした新規治療およびその治療開始時期を提案することを目的とする。重症外傷後に発生する臓器障害の機序解明に新たな展開をもたらす可能性があり、多臓器不全の治療戦略構築に大きく貢献することとなるであろう。外傷は、医学の進歩や時代の流れに左右されることなく一定数生じ、今後も患者数の減らない疾患であるため、治療への社会的ニーズが衰えない領域であり、研究価値の高い学問分野である。

### 2. 研究の目的

重度外傷後に、致死的な多臓器不全が発生することは経験的によく知られているが、現在のところ、それらに有効な治療法は定まっていない。外傷により骨軟部組織に挫滅が生じ、損傷創部から大量の出血を伴うと、全身性の炎症反応がどのようなパターンで惹起され、それが各臓器(骨髄、肺、腸管)にどの程度の傷害をもたらすのか、ラットを用いて、多臓器不全発生までのプロセスを、後述の3つのパラメーターを駆使して、明らかにする事を目的とする。臨床に準じた新たな外傷性モデルを適応し、多臓器不全の病態および発症機序の一端を解明し、治療応用につなげることが学術的「問い」である。

現在までに、出血性ショックや骨軟部組織損傷が、各臓器や全身に及ぼす影響を観察する動物実験モデルはいくつか報告されている。しかし、これらの実験モデルで使用された骨軟部組織損傷は開腹、骨折、筋挫滅などそれぞれ単独の影響をみたものであり、それらは必ずしも臨床的な外傷を反映しておらず、外傷に伴う疼痛や、鎮痛目的で投与される消炎鎮痛薬が外傷後

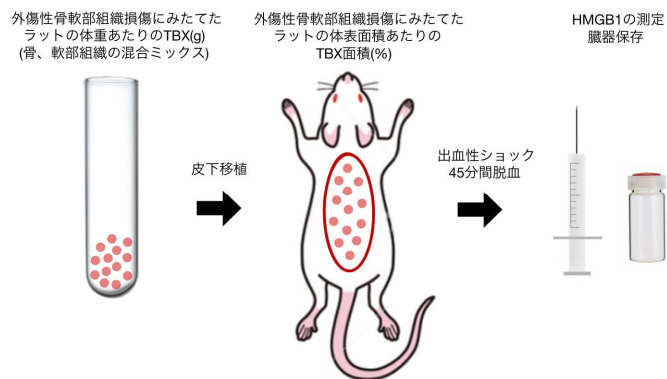
に起こる炎症反応を修飾してしまうなどの欠点が見られた。さらに、これらのモデルでは骨軟部組織損傷の程度を定量的にコントロールすることができず、骨軟部組織損傷そのものが外傷後の炎症、臓器障害に与える影響を検討する有用なモデルが存在しなかった。

我々が考案した新しい出血性骨軟部組織損傷モデルは、これまでの欠点を改善し、ラットの四肢をミンチ状にした組織 (tissue bone matrix, TBX) を作成し、任意量の TBX を同種ラットの背部皮下に移植し、同時に出血性ショックを加える。これにより、出血性骨軟部組織損傷の程度そのものが、外傷後の炎症や各臓器に与える影響を、定量的に評価することを可能にする。またこのモデルは、移植後に鎮痛薬を使用する必要が無く、外傷後の炎症や免疫反応をマスクする要因が排除されているため、骨軟部組織損傷そのものの影響を検討する上でも有益なモデルであると考えられ、より臨床的な外傷に準じたモデルであるといえる。

### 3. 研究の方法

局所の出血性骨軟部組織損傷が、炎症性メディエータ産生に関わる High-mobility group box 1 (HMGB1) や炎症性サイトカインを介して、全身の各臓器に及ぼす影響を、マウスを用いて明らかにした。

ラットの骨および周囲の軟部組織を採取し、ミンチ状にした。同種ラットに、腹腔内麻酔を行った後、背



部皮下に任意量の TBX を移植し、骨軟部組織損傷モデルを作成した。予め、大腿動静脈にカテーテルを挿入し、大腿動脈は研究前後の動脈血液ガス分析採血用および実験中の平均血圧測定用、大腿静脈は脱血用および蘇生輸液用として用いた。まず、出血性ショックを想定した脱血を行い、平均動脈血圧 40mmHg 以下のショック状態を 45 分間維持した。その後、蘇生時の輸液および輸血を想定し、脱血した血液とその 2 倍量の生理食塩水の混合液を、120 分間かけて、体内に戻し蘇生した。研究前後の動脈血液ガス分析の結果を比較し、実験中にラットがショック状態に至っていたことを、血中ラクテートや血中ベースエクセスなどを指標に確認を行った。蘇生後、観察期間に応じて各臓器を液体窒素処理後、冷凍保存した(上図)。

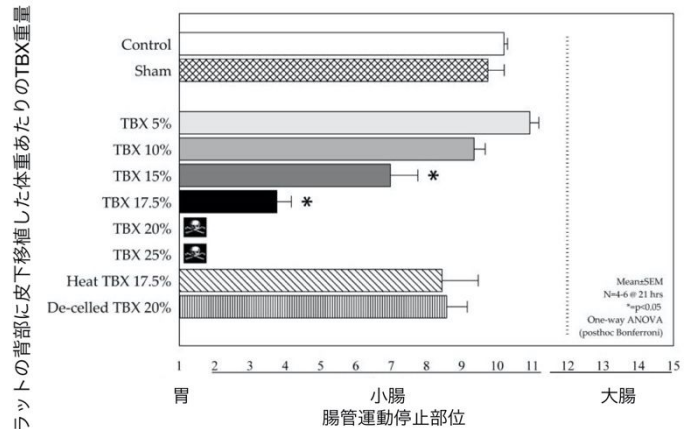
パラメーターは、A)ラットの背部に皮下移植する体重あたりの TBX 重量(体重の 0%, 10%, 15%, 20%)(g), B)出血性ショックを想定した平均血圧(ショックなし, 40mmHg), C)観察期間 (TBX 皮下移植後 3, 6, 12 時間)とした。パラメーターの変動にともない、以下について検討した。なお、TBX 移植操作に伴う細菌感染症による死亡の寄与を否定する目的で、移植された TBX が無菌状態であったことを、細菌培養検査を通じて証明した。

#### (1) 血中 HMGB1 濃度の測定および HMGB1 発現パターンの分析

パラメーターに応じて血液検体を採取し、各種サイトカイン(interleukin 6, interleukin 10, keratinocyte cytokine, monocyte chemotactic protein 1), HMGB1, ALT 濃度を、ELISA(enzyme-linked immuno sorbent assay)法にて測定した。局所から全身に送り届けられた各濃度をコントロール群と比較し、統計学的データ分析を行った。

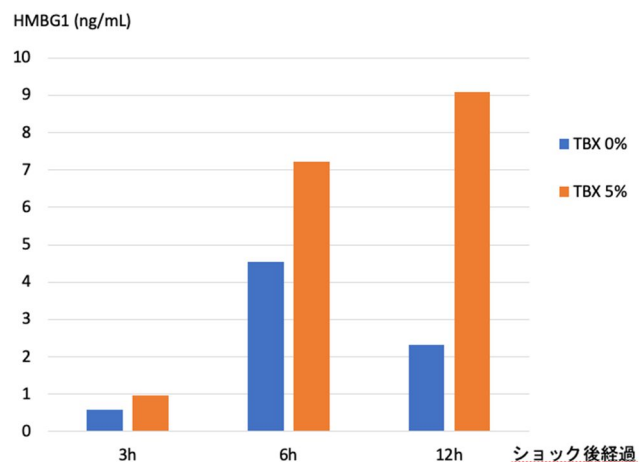
### 4. 研究成果

我々の先行研究において、TBX 背部皮下移植が、全身性炎症を惹起させることが分かっている[1]。なお、体重あたりの TBX 重量 20%以上の TBX を皮下に移植したラットは、死亡に至ることがわかった。重量 20%以上では HMGB1 が過剰に産生されてしまい、致死的变化をもたらしたと考えられた。それ以下の重量%においては、皮下移植容量依存性に腸管の蠕動運動量の低下をきたすことが明らかとなった。よって、本研究における体重あたりの TBX 重量は、0%、10%、15%、20%でモデルを作成した(上図)。



3,6,12,24時間モデルのうち、出血性ショック単独モデルでは、HMGB1濃度はTBX皮下移植6時間後にピークを示し、その後なだらかに減少した。骨軟部組織障害に出血性ショックを合併したモデルでは、TBX皮下移植より3時間後から24時間後にかけて、HMGB1濃度は時間と相関してなだらかに上昇し続けることがわかった(下図)。

また、体重あたりの TBX 容量が多いほど、容量依存性に HMGB1 濃度の上昇が見られた。体重あたりの TBX 容量 15%モデルでは、容量 10%モデルの、約 2.5 倍の HMGB1 濃度上昇を示した。これらは、出血性ショックおよび TBX の、単独あるいは合併刺激による血中 HMGB1 濃度への影響を評価するうえで、有用であると考えられた。



TBX 皮下移植が血中サイトカイン濃度に与える影響について、本研究で得られたデータとこれまで得られたデータ(腸管運動および腸管平滑筋の毛細血管の透過性に与える影響をまとめたデータ)を総合的に比較・分析することで、多臓器不全に至るまでの病態解明を進める足がかりとした。

今後、生体が侵襲との闘いのなかで獲得してきたダイナミックなシステムの詳細が解明され、それらに着目した新たな生体応答制御法が開発されることが強く期待される。HMGB1 が局所から末梢へ到達する際の血中濃度パターンと、各臓器における臓器障害への作用パターンを知ることが、血中 HMGB1 濃度の増減が MODF 発症の新たな鍵であることが再認識されることにつながり、これら治療戦略の適切な介入時期を吟味することにつながると考える。

#### <引用文献>

Tsukamoto T et al. Neurogastroenterol Motil. (2011): Novel model of peripheral tissue trauma-induced inflammation and gastrointestinal dysmotility.

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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考    |
|-------|--|--|-------|
| 研究協力者 | 塚本 剛志<br><br>(Tsukamoto Takeshi)<br><br>(20626270) | 日本医科大学・大学院医学研究科・研究生<br><br><br>(32666) | 研究分担者 |
| 研究協力者 | 増野 智彦<br><br>(Masuno Tomohiko)<br><br>(00318528)   | 日本医科大学・医学部・講師<br><br><br>(32666)       | 研究分担者 |

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 |
|---------|---------|
|         |         |