

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17324

研究課題名（和文）頭部外傷に続発する多臓器障害への好中球細胞外トラップの関与の解明

研究課題名（英文）Neutrophil extracellular traps contribute multiple organ failure after traumatic brain injury

研究代表者

川合 千裕（Kawai, Chihiro）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40894754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：頭部外傷から末梢の多臓器障害が波及するメカニズムは未だ詳細は明らかでない。本研究では、モデルマウスを用いて、まず重症の外傷性脳損傷後に諸臓器に生じる変化を解析し、次にNETsやHMGB1などのDAMPsに着目してこれらの役割を調査した。その結果、脳損傷後の急性期には末梢臓器にも一過性に炎症が波及するが、亜急性期には神経調節機構の破綻が臓器障害に寄与した。また、脳損傷部ではNETsの形成が伺われたが、全身への影響は見出せなかった。一方で、HMGB1は中枢と末梢で相反する機能を有し、脳損傷部で炎症を増悪させるが、末梢にも波及し、諸臓器ではこの急性期炎症に対して抑制性に働いていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、HMGB1は頭部外傷に対する新たな治療標的として着目されている。しかしながら、本研究により外傷性脳損傷において、HMGB1は相反する機能を有していることが示唆された。新たな治療法の確立には、損傷局所に留まらず、全身の詳細な評価が必要であることを再認識させる。また、HMGB1は未だ機序が不明確な脳損傷誘導性末梢免疫抑制機構に寄与している可能性があり、今後はマクロファージを起点とした外傷時の末梢免疫制御機構を解明し、末梢臓器への影響から見た新たな予防・治療法の確立に貢献したい。

研究成果の概要（英文）：The mechanism through which traumatic brain injury (TBI) results in multiple organ injuries remains unclear. In this study, we used mouse models to investigate the pathological changes that occur in various organs following life-threatening TBI, with a focus on the role of damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as neutrophil extracellular traps (NETs) and high-mobility group box 1 (HMGB1) in peripheral organs. Our findings suggest that during the acute phase following TBI, inflammation spreads to peripheral organs, while the disruption of neuromodulatory mechanisms contributes to organ damage in the subacute phase. Although NETs were observed in the brain-injured area, no systemic effects were detected. Conversely, HMGB1 displayed opposing functions in the central and peripheral regions, exacerbating inflammation in the brain-injured area while acting as an inflammation suppressor in other organs during the acute phase.

研究分野：法医病理学

キーワード：法医病理学 頭部外傷

1. 研究開始当初の背景

重症外傷は損傷部位そのものが予後を規定するだけではなく、局所の外傷であっても出血、炎症などを介して遠隔の他臓器にも多様な障害を誘引し人を死に至らしめる。そのため重症外傷を診断、治療、あるいは死に至る過程を解明するためには傷害局所に留まらず、全身の観察と多臓器にわたる病態を明らかにする必要がある。中でも頭部外傷は重症外傷患者の3分の1を占め、年齢にかかわらず発生しうる主要な死因の一つである。死亡者の4人に1人は受傷後8日以上 の病脳期間があり、その間に肺障害などが進展し死に至る。したがって、頭部外傷に続発する多臓器障害の病態解明は、死因究明につながるだけではなく、臨床での患者の予後改善に結び付くため研究意義がある。しかしながら、これまでの頭部外傷モデル動物を用いた研究で全身の各臓器に起こる変化を比較検討し、複雑な病態関連を追求した報告は殆どない。

近年、疾病や外傷を増悪させる炎症性メディエーターとして、ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) が注目されている。DAMPs はヒストン、DNA、high-mobility group box 1 (HMGB1) など通常核内または細胞質内に存在する分子構造 (微粒子) であるが、損傷組織や壊死に向かっている細胞から漏出、あるいは能動的に放出され、周囲の炎症反応の誘導に関与する。また、DAMPs は傷害局所に留まらず、時に血中に過剰に放出されることで全身の炎症を惹起し、多臓器障害の原因になる。Neutrophil extracellular traps (NETs) は、好中球による生体防御機構の一つであり、細胞外 DNA やヒストンなどの DAMPs の主要な供給源である。頭部外傷においては、その重症度と血中の NETs の量との相関が示唆されており、動物実験では脳の損傷部やその周囲に NETs が形成され、脳浮腫の増悪など神経予後に関与していることが報告されている。しかしながら、これまでに頭部外傷による NETs の形成が遠隔の他臓器へ与える影響については分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は頭部外傷時の頭部局所的な NETs の形成と合併症としての多臓器障害との関係を明らかにすることである。そして、この目的の達成が頭部外傷後の死に至る病態の解明や、さらに頭部外傷患者の救命につながる治療法開発の端緒の1つになることを目指す。

3. 研究の方法

頭部外傷モデルを用いて、致死的な外傷性脳損傷 (Traumatic brain injury; TBI) 時の諸臓器における変化を経時的に解析した後、治療対象となる分子を抽出し、その治療時の影響を解析した。研究方法は以下の3つの段階で行った。

Step 1. 頭部外傷後の全身諸臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓) の病理学的変化の解析

C57BL/6 マウス (8 - 10 週齢) に対して右頭頂部に局所 (直径 2 mm) に 100 g の重量物を重力落下式に衝突させ、TBI モデルを作製した。受傷より 6 時間後、1 日後、3 日後に採血および脳、心臓、肺、肝臓、腎臓を摘出し、血中のサイトカイン、組織障害マーカーの量を定量した。各臓器サンプルから組織標本を作製し、肺障害スコアなどを参考に臓器障害を病理学的に定量化した。また炎症関連遺伝子やタンパク質の発現変化を免疫染色、ELISA、RT-PCR で解析した。さらに事前に静脈投与したエバンスブルーの各臓器への沈着を定量比較し、臓器変化の経時的変化を解析した。

Step 2. 頭部外傷後の末梢臓器における DAMPs の役割解析

採取した血清中のヌクレオソーム、HMGB1 を定量した。また、各臓器における DAMPs 関連遺伝子発現量の変化を RT-PCR で解析し比較した。

Step 3. 頭部外傷時の末梢臓器における HMGB1 の役割解析

頭部外傷モデルマウスに対して、外傷の 30 分前および 1 時間後に抗 HMGB1 抗体を静脈投与 (2 mg/kg) し、投与の有無による臓器障害の変化を解析した。また、組織マクロファージの表現型変化をおよび骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の浸潤を比較した。

4. 研究成果

研究期間中には以下のことが明らかになった

(1) Weight-drop モデルによる再現性のある致死性的 TBI モデルを作製した

Weight-drop 方式による TBI は最も現実に起こりうる頭部外傷を再現したモデルである一方で、マウスの頭部に対して巨大な重量物を繰り返し衝突させるため、モデル作製ごとに打撃部位や衝突角度などの変化が大きくなる欠点がある。我々は 100g の分銅をマウス頭部に打撃する際に、予めマウス頭部に密着させた直径 2 mm のテフロン製チップを介して衝撃を与えることで、再現性のある頭部外傷モデルを作製した。重量物落下高度 (Falling height) を変動させ、救命可能性のある (5 日間生存率 50%、最終生存率 25%) 致死性的 TBI モデルとして 7.5 cm からの打撃を採用した。

(2) 致死性的 TBI 後の諸臓器の経時的变化：急性期の炎症と亜急性期の臓器浮腫

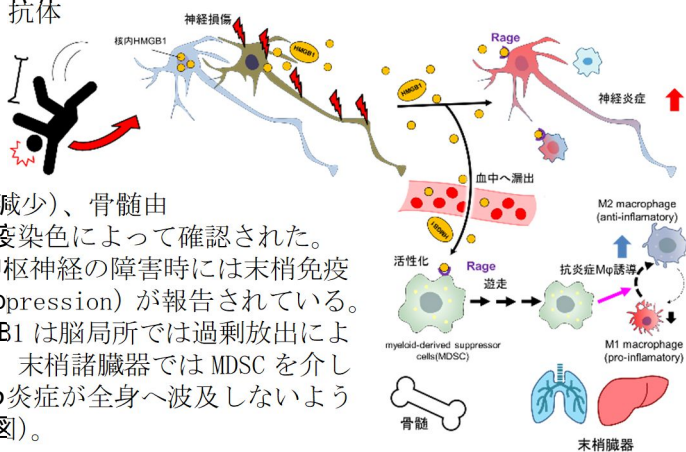
TBI 6 時間後の肺、肝では好中球浸潤し、炎症性サイトカイン、ケモカインの遺伝子発現量が増加した。一方で、致死的な TBI にも関わらず、急性期のびまん性肺胞損傷や肝細胞壊死、尿細管障害は見られなかった。また、24 時間後にはこれらの炎症反応は緩解し、脳損傷の重症度に比して諸臓器の炎症は軽度かつ短期間であった。一方で 72 時間後には肺、肝、腎、脾、心など諸臓器に浮腫が生じ、肝では一部の炎症性サイトカインの遺伝子発現量も再び上昇した。同時期においては血中のサイトカイン値の上昇はなく、脳でも炎症増悪もない。一方で、マウスでは同時期に脳全般でグリオーシスが進行しており、当初障害が軽度であった脳視床下部にも波及していた。また、自律神経系の変化（血中カテコラミンの低下）がみられた。TBI 後の他臓器への影響は炎症と神経調節機構の変化が要因と考えられているが、致死的な TBI においても炎症は急性期に留まり、亜急性期には神経調節機構の影響が大きいことが示唆された。

(3) TBI 後の DAMPs 関連分子の経時的变化：HMGB1 に対する反応

TBI 6 時間後の脳組織には高度な好中球浸潤があり、損傷周囲の組織での PAD4 の遺伝子発現量も増加していたことから NETs 形成は示唆された。一方で、血中への NETs 漏出を示唆するヌクレオソーム、ヒストンの増加は確認できず、肝、腎、肺においても、これらに対する TLR2、4、9 の遺伝子発現量に変化はなかった。このことから、既報の通り TBI 後の脳局所での NETs 形成は示唆されたものの、当初の仮説とは異なり、脳での NETs 形成が血液循環を通して末梢臓器に与える影響は軽微と判断される。一方で、他の代表的な DAMPs に注目すると、HMGB1 は傷害された脳組織から血中へ漏出していることが、免疫組織学的、血性学的確認され、HMGB1 のレセプターの一つである RAGE の遺伝子発現量は全臓器的に増加していた。

(4) HMGB1 は中枢と末梢で相反する機能を有した

TBI 後 6 時間で HMGB1 に対する反応が全臓器的にみられたことから、HMGB1 が TBI 後の急性期炎症のメディエーターとして機能していると仮説を立てた。HMGB1 に対する抗 HMGB1 抗体療法はこれまでに TBI 後の神経炎症の抑制、神経機能の回復に寄与し、TBI の新たな治療標的として期待されている。そこで、抗 HMGB1 抗体を TBI マウスに投与したところ、神経炎症は抑制される一方で、肝や肺では炎症が増悪した。これらの臓器では、マクロファージ表現型の変化が見られ（炎症性マクロファージ増加、抗炎症性マクロファージ減少）、骨髄由来抑制細胞（MDSC）の減少が蛍光免疫染色によって確認された。HMGB1 は MDSC の動員に寄与する。中枢神経の障害時には末梢免疫の抑制現象（CNS-induced immune suppression）が報告されている。少なくとも致死性的 TBI において、HMGB1 は脳局所では過剰放出による神経炎症の増悪に寄与する一方で、末梢諸臓器では MDSC を介した免疫抑制に寄与し、神経障害に伴う炎症が全身へ波及しないよう機能している可能性が示唆された（図）。



図：提唱される TBI 時の HMGB1 の役割

CNS-induced immune suppression のメカニズムの解明およびそれを促進することで重症頭部外傷後の多臓器障害を予防に繋がる可能性がある。今後は TBI 後の中枢と末梢のマクロファージの変化に焦点を当て研究を継続する予定である。

<参考文献>

- 1) Kumar, V. et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. *Sci Adv.* 6, eaax8847 (2020).
- 2) Kawai, C. et al. Circulating Extracellular Histones Are Clinically Relevant Mediators of Multiple Organ Injury. *Am. J. Pathol.* 186, 829-843 (2016).
- 3) Okuma, Y. et al. Anti-High Mobility Group Box 1 Antibody Therapy May Prevent Cognitive Dysfunction After Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg.* 122, e864-e871 (2019).
- 4) Liesz, A. et al. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *J. Neurosci.* 35, 583-598 (2015).
- 5) Sribnick, E. A., Popovich, P. G. & Hall, M. W. Central nervous system injury-induced immune suppression. *Neurosurg. Focus.* 52, E10 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawai Chihiro, Kondo Hidehito, Miyao Masashi, Sunada Mariko, Ozawa Seiichiro, Kotani Hirokazu, Minami Hirozo, Nagai Hideki, Abiru Hitoshi, Yamamoto Akira, Tamaki Keiji, Nishitani Yoko	4. 巻 67
2. 論文標題 Fatal cardiac dysfunction in a child with Williams syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 102387 ~ 102387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2023.102387	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 -

1. 著者名 Kawai C, Miyao M, Kotani H, Minami H, Abiru H, Hamayasu H, Yamamoto A, Tamaki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Systemic amyloidosis with amyloid goiter: an autopsy report.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2022.102167.	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 -

1. 著者名 Miyao M, Kawai C, Kotani H, Minami H, Abiru H, Hamayasu H, Yamamoto A, Tamaki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Fatal Dieulafoy lesion with IgG4-related disease: an autopsy case report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.legalmed.2022.102059.	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 -

1. 著者名 Miyao M, Kawai C, Kotani H, Minami H, Abiru H, Hamayasu H, Eguchi S, Tamaki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Mitochondrial fission in hepatocytes as a potential therapeutic target for nonalcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13832.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川合千裕, 宮尾 昌, 南 博蔵, 長井 秀樹, 阿比留仁, 玉木敬二, 西谷陽子.
2. 発表標題 外傷性脳損傷に対する抗HMGB1抗体療法が末梢諸臓器へもたらす影響評価
3. 学会等名 第108次日本法医学会学術全国集会.
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川合千裕, 宮尾 昌, 南 博蔵, 阿比留仁, 玉木敬二.
2. 発表標題 受傷時期が推定できた亜急性性頭部外傷例.
3. 学会等名 第44回日本法医学会学術中部地方集会・第69回日本法医学会学術近畿地方集会合同集会.
4. 発表年 2022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
---------	---------