

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592321

研究課題名(和文) 視床下部ミクログリアに焦点をあてた熱射病の病態生理解明と治療法の開発

研究課題名(英文) The role of microglia on the inflammatory response of the brain in experimental heat stroke

研究代表者

川崎 知佳 (KAWASAKI, Chika)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：60258621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、熱射病時の中枢神経系でのミクログリアの関与を検討し、その制御法を開発することである。マウス熱射病モデルを用いて、熱曝露による中枢神経のミクログリア活性化、炎症メディエーター発現の解析を行った。炎症メディエーターの脳内濃度は熱曝露により上昇した。microglia inhibitorであるminocyclineでマウスを処置すると、脳内炎症メディエーター濃度の上昇は抑制された。microgliaの活性化と炎症メディエーター濃度上昇の関連が示唆された。Minocyclineはmicroglia活性による炎症反応を抑制することで、熱射病の治療に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the role of microglia on the inflammatory response of the brain in experimental heat stroke. After heat stress, the plasma and brain inflammatory mediators (TNF-alpha, IL-6, and HMGB1) levels were determined using ELISA. In control group(CG), plasma and brain TNF-alpha and IL-6 increased significantly at 2 hr after heat stress. Plasma and brain HMGB1 levels also increased in CG at 2 hr after heat stress. In minocycline treatment group(TG), these inflammatory responses were suppressed compared to CG. Minocycline treatment decreased brain inflammatory responses, but plasma inflammatory mediators levels were not altered. This study demonstrated that minocycline suppressed brain inflammatory mediators concentrations after heat stress. Minocycline may be a beneficial treatment for heat stroke patients for down-regulating microglial cell-mediated inflammatory responses.

研究分野：麻酔科学

キーワード：熱射病 中枢神経系 ミクログリア 炎症反応

## 1. 研究開始当初の背景

熱射病は高温への暴露や高温下での運動により発症する。暑熱環境下労働者が熱射病患者の多くを占めるが、スポーツ選手、小児、高齢者にも発症する。近年、地球温暖化や都市化によるヒートアイランド現象により、熱射病の危険性が増加している。熱射病は異常高体温と多臓器不全を併発し致死率が高い。しかし、この病態の機序は未だに解明されていない。従って、早急に熱射病の病態メカニズムを明らかにし、治療及び予防戦略を開発する必要がある。

熱射病発生には、多臓器不全と中枢神経異常の二つの原因が考えられる。われわれはマウス熱射病モデルを確立し、暑熱環境が臓器障害を起こす機序の解明に取り組み、炎症メディエーターである High mobility group box-1(HMGB1)を介し肝障害が発生することを明らかにした(Shock 33: supplement 1 63-4, 2010)。さらにリコンビナントトロンボモジュリンにより、HMGB1発現が抑制され肝障害発生が抑えられることを明らかにした(Shock 35: supplement 1 42-3, 2011)。熱射病による臓器不全発生の機序として炎症性メディエーター(HMGB1,炎症性サイトカイン)を介した機序が明らかにされたが、中枢神経障害関与については不明のままである。われわれの今までの研究から、熱暴露による死亡率は暴露時間が一定の時間を超えると急激に上昇することが明らかになっており、この死亡率の上昇は臓器障害だけでは説明できず、中枢神経系の障害が関与している可能性が示唆される。マウスモデルにおいても臨床で見られるような異常高体温の持続が認められ、体温調節の破綻が考えられる。

本研究は、中枢神経系、特に体温調節中枢

であり体浸透圧調節に重要な vasopressin を産生する細胞が集まっている視床下部に焦点を当て、免疫細胞である microglia 活性の面から熱射病発生機序への関与を検討する。

## 2. 研究の目的

近年、異常高温環境が人体に影響を及ぼすことが社会問題になっている。熱射病は現在でも非常に高い死亡率を示しているが、病態生理はいまだ不明な点が多い。本研究の目的は、**(1)異常高体温時に発生する中枢神経系の障害を評価する。(2)中枢神経系の障害における炎症活性の関与を確認する。(3)炎症活性制御による熱射病の治療戦略を開発する。**以上について検討し、熱射病発生における中枢神経障害(視床下部ミクログリア活性化)の関与について解明し、それを制御する戦略を開発、熱射病の発生、死亡率の低下を図ることである。

## 3. 研究の方法

熱射病モデル作成; C3H/HeN または C3H/HeJ mice (male, 8-10 weeks old、weighing 20-25g)を使用する。マウスを人工気象室で暑熱環境下(38℃、湿度 50%、水分制限なし)、熱曝露を2~4時間行う。熱曝露後は室温環境(25℃)に戻す。臓器採取;熱曝露後、イソフルラン麻酔下に血液、臓器採取(脳:視床下部)を行う。血液はEDTA添加シリンジに心臓穿刺で採取後、遠心を行い血清分離し測定まで-80℃で保存する。

**研究1: 熱曝露により発生する中枢神経(視床下部)障害の評価** 中枢神経障害を評価するため、脳虚血・低酸素マーカーである glutamate, lactate-to-pyruvate ratio, nitrite,

dihydroxybenzoic acid の視床下部内濃度を測定する。また神経障害マーカーである glycerol 濃度を測定する。さらにホルマリン固定した脳標本において、神経障害の程度を Pulsinelli らの方法(Ann Neurol 11: 491-8, 1982)を用いてスコアリングする。

**研究2：熱曝露による中枢神経（視床下部）のミクログリア活性化、炎症メディエーターと vasopressin 発現の解析** 中枢神経内での microglia 活性化を調べるため、ホルマリン固定した脳標本で microglia マーカーである CD11b, F4/80 抗体を用いて免疫染色を行い、熱曝露後の microglia の局在変化、発現変化を確認する。また、炎症メディエーターである HMGB1, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha の中枢神経内濃度を ELISA で測定する。さらに vasopressin 濃度変化検討も行う。次に microglia inhibitor である minocycline、resveratol でマウスを処置（腹腔内投与）した場合の炎症メディエーター濃度の変化を評価し、microglia の活性化と炎症メディエーター濃度上昇の関連を確認する。

**研究3：中枢神経障害とミクログリア活性化、炎症メディエーター、vasopressin 発現との関連解析** ミクログリア活性化、炎症メディエーター、vasopressin 濃度と中枢神経障害の程度を比較検討し、ミクログリア活性化、炎症メディエーター、vasopressin が中枢神経障害に参与していることを確認する。

**研究4：中枢神経でのミクログリア活性化、炎症メディエーターと vasopressin 発現制御による熱射病治療戦略開発** トロンボモジュリン、17beta-estradiol などの女性ホルモン、また microglia inhibitor である minocycline、resveratol が中枢神経障害のみならずマウス熱射病による臓器障害に与える効果を検討す

る。

#### 4. 研究成果

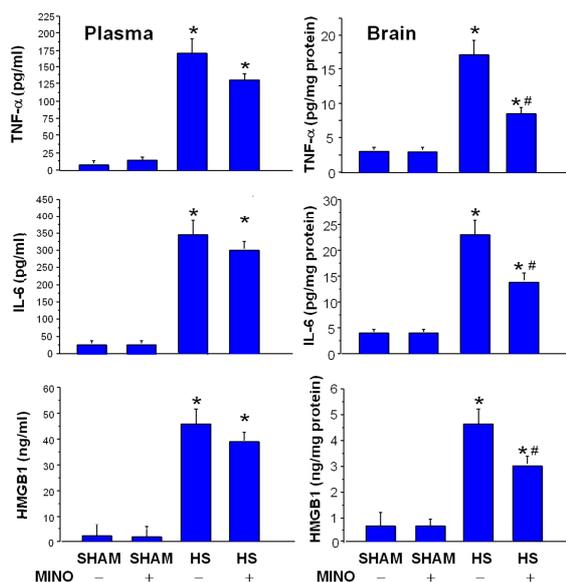
##### 研究1：熱曝露により発生する中枢神経（視床下部）障害の評価

脳虚血・低酸素マーカーである glutamate の視床下部内濃度、神経障害マーカーである glycerol 濃度は熱曝露により上昇した。

##### 研究2：熱曝露による中枢神経（視床下部）のミクログリア活性化、炎症メディエーター発現の解析

炎症メディエーターである HMGB1, IL-1beta, IL-6, TNF-alpha の脳内濃度は熱曝露により上昇した。microglia inhibitor である minocycline、resveratol でマウスを処置（腹腔内投与）すると、炎症メディエーター濃度の上昇は抑制された(図)。microglia の活性化と炎症メディエーター濃度上昇の関連が示唆された。

Effects of minocycline (MINO) on plasma and brain inflammatory mediators levels after heat stroke



4 hours after heat stroke, samples were obtained and frozen at -70°C until used. The plasma and brain levels of inflammatory mediators were measured by ELISA. \*p<0.05 vs SHAM, MINO(-). #p<0.05 vs HS, MINO(-).

##### 研究3：中枢神経障害とミクログリア活性化、炎症メディエーター発現との関連解析

ミクログリア活性化、炎症メディエーターが中枢神経障害に関与していることを現在検討中である。

**研究4：中枢神経でのミクログリア活性化、炎症メディエーターと vasopressin 発現制御による熱射病治療戦略開発**

microglia inhibitor である minocycline が中枢神経障害のみならずマウス熱射病による臓器障害に与える効果を現在検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Kawasaki T., Kawasaki C., Sata T, Kabayashi M., Suzuki F.:

Depressed production of beta-defensins from mouse splenic dendritic cells following thermal injury and its influence on susceptibility to infection.

J Anesth. 29(1):78-86, 2015 doi: 10.1007/s00540-014-1882-y (査読有)

Ueki M, Kawasaki T., Habe K., Hamada K., Kawasaki C., Sata T.

The Effects of Dexmedetomidine on Inflammatory Mediators after Cardiopulmonary Bypass Anaesthesia. 69(7):693-700, 2014 doi: 10.1111/anae.12636 (査読有)

Kawasaki T., Okamoto K, Kawasaki C., Sata T.

Thrombomodulin improves the liver injury, coagulopathy, and mortality in an experimental heatstroke model in mice

Anesth Analg 118(5):956-63, 2014 doi:

10.1213/ANE.000000000000170(査読有)

Kawasaki T., Sata T.

Trauma-Hemorrhage and Dendritic Cell Functions: A critical review of splenic dendritic cell dysfunction following trauma-hemorrhage and therapeutic approach.

OA Anaesthetics (London) Sep 01;1(2):15, 2013 (査読有)

Kawasaki T., Kawasaki C., Ueki M., Hamada K., Habe K., Sata T.

Dexmedetomidine Suppresses Proinflammatory Mediators Production in Human Whole Blood *In Vitro*

J Trauma Acute Care Surg. 74(5):1370-5, 2013 doi: 10.1097/TA.0b013e31828db978 (査読有)

Kawasaki T., Chaudry IH.

The Effects of Estrogen on Various Organs: Therapeutic Approach for Sepsis, Trauma, and Reperfusion Injury Part 1: Central Nervous System, Lung, and Heart (Review)

J Anesth 26(6):883-891, 2012 doi: 10.1007/s00540-012-1425-3 (査読有)

Kawasaki T., Chaudry IH.

The Effects of Estrogen on Various Organs: Therapeutic Approach for Sepsis, Trauma, and Reperfusion Injury Part 2: Liver, Intestine, Spleen, and Kidney (Review)

J Anesth 26(6):892-899, 2012 doi: 10.1007/s00540-012-1426-2 (査読有)

Kawasaki T., Nakamura K., Jeschke M.G.,  
Kogiso M., Kabayashi M., Herndon D.N., Suzuki  
F.:

Impaired ability of burn patient neutrophils  
to stimulate  $\beta$ -defensin production by  
keratinocytes  
Immunol Cell Biol 90(8): 796-801, 2012  
doi: 10.1038/icb.2012.3 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

T Kawasaki, C Kawasaki, K Okamoto, T  
Sata.  
Effects of thrombomodulin treatment in  
experimental heat stroke.

Shock Society 36th Annual Conference on Shock,  
June 1-4 (6/3 発表), 2013, San Diego, USA

C Kawasaki, T Kawasaki, K Okamoto, T  
Sata.  
The Anti-inflammatory Effect of  
Thrombomodulin on Brain in Experimental Heat  
Stroke.

7<sup>th</sup> International Shock Congress, Shock Society  
35th Annual Conference on Shock, June  
9-13(6/10 発表), 2012, Miami Beach, FL

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

川崎 知佳 (KAWASAKI, Chika)  
産業医科大学・医学部・非常勤医師  
研究者番号：60258621

### (2)研究分担者

川崎 貴士 (KAWASAKI, Takashi)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60299633