

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791938

研究課題名(和文) コリン作動性抗炎症経路を介した致死的热中症の新たな治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of a novel strategy for heatstroke via the cholinergic anti-inflammatory pathway

研究代表者

山川 一馬 (YAMAKAWA, Kazuma)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50597507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、熱中症病態におけるコリン作動性抗炎症経路の関与を明らかにし、電気的迷走神経刺激による同経路の賦活化療法が新規治療法として有効か否かを解明することである。ラット熱中症モデルにおいて、迷走神経刺激を行うことで熱刺激後の死亡率は有意に改善し、炎症性メディエーターの上昇は抑制された。免疫組織学的解析では、迷走神経刺激は肺・脾臓における炎症細胞浸潤を抑制し、熱刺激により低下したアセチルコリン受容体の発現を改善させることが明らかとなった。本研究結果より、電気的迷走神経刺激療法は、熱中症病態におけるコリン作動性抗炎症経路の破綻状態を改善することで新規治療法になりえることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to gain insights into novel therapeutic approaches for the treatment of heatstroke. We evaluated whether electrical vagus nerve stimulation (VNS) via the cholinergic anti-inflammatory pathway attenuates severe heatstroke, which induces a systemic inflammatory response. Seven-day mortality improved significantly in the VNS-treated group versus control group. Electrical VNS significantly suppressed induction of pro-inflammatory cytokines. Immunohistochemical analysis revealed that at VNS treatment attenuated infiltration of inflammatory cells in lung and spleen. Interestingly, most cells with increased CD11b positivity in response to heat stress did not express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in the spleen. These data indicate that electrical VNS modulated cholinergic anti-inflammatory pathway abnormalities induced by heat stress, and this protective effect was associated with improved mortality.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：コリン作動性抗炎症経路 迷走神経刺激 熱中症 全身性炎症反応症候群

1. 研究開始当初の背景

昨今の地球温暖化による気温上昇、東日本大震災・福島原発事故に伴う電力使用制限のなどの影響で、本邦における重症熱中症の発症人数および死亡者数は急増している。人口動態統計(厚生労働省統計情報部)によると、平成22年の熱中症による死亡者数は、熱中症統計開始以降最大の1,718例と報告されている。最重症型の熱中症では、高体温、昏睡、ショックからDIC、多臓器不全に進行して死亡するケースが多い。しかしながら、熱中症の治療は積極的クーリングによる体温管理、輸液療法による循環維持、DICに対する支持療法など対症療法の域を出ず、積極的なアプローチ法は皆無である。したがって、熱中症にともなう一連の組織障害を早期から効果的に制御して多臓器障害の進行を防ぐ新規治療法の開発が急務と考えられる。

近年、過剰侵襲に応じて神経系が過剰免疫反応・過剰炎症反応を抑制する働きが注目されている。迷走神経を遠心路とする脳幹刺激は、脾神経を通じ脾マクロファージの $\alpha 7$ アセチルコリン受容体を刺激する。その結果、脾臓で産生されるTNF- α 放出を抑制する。このメカニズムはコリン作動性抗炎症経路と称され、LPS投与敗血症モデルではその作用が著しく低下していることが報告されている(Nature 2003, 421: 384-388)。即ち、コリン作動性神経系は炎症起因为質の動態を制御し(「神経→炎症」の制御)、一方、高サイトカイン血症による過剰炎症は神経系の電気活動性を低下させる(「炎症→神経」の制御)。つまり、炎症反応とコリン作動性神経機能異常は相互に関連し、全身炎症の場において悪循環を形成していると考えられる。

致死的热中症は高率に意識障害を合併し、中枢神経系異常が主たる病態の一つである。そのメカニズムは、脳虚血と脳浮腫(細胞障害、血液脳関門の透過性亢進と循環障害)によると考えられている。我々は、致死的热中症において中枢性にコリン作動性抗炎症経路が破綻し、全身性炎症反応、臓器障害が進行するのではないかと着想するに至った。本研究は、熱中症の特徴的な病態に着目し、コリン作動性抗炎症経路を電気的迷走神経刺激により賦活化することによって予後の改善を図ろうとするものである。

2. 研究の目的

本研究では、致死的热中症に対する新たな多臓器障害戦略として、これまで検討されてこなかったコリン作動性抗炎症経路の賦活化療法の有効性を評価した。コリン作動性抗炎症経路を賦活化する方法としては、電気的迷走神経刺激により行った。研究期間内に明らかにすべきことを以下の3点に絞り研究を実施した。

(1) 致死的热中症モデルにおける重要臓器障害を形態学的に評価するとともに、熱中症において全身性炎症反応を誘導する因子群の解析を、免疫組織化学的手法を用いて行う。これらの解析により、熱中症においてコリン作動性抗炎症経路が破綻していることを病態生理学的に明らかにする。

(2) 致死的热中症モデル作成後に電気的迷走神経刺激あるいはSham手術を行う二群に無作為割り付けし、7日間死亡率を比較検討する。そのことにより、障害を受けたコリン作動性抗炎症経路を賦活化することによって、致死的热中症の生命予後が改善されるか否かを明らかにする。

(3) 致死的热中症モデルにおいて電気的迷走神経刺激が死亡率を改善するメカニズムを解明する。このため、前述の(1)(2)で得られた結果を踏まえ、迷走神経刺激療法の効果発現における作用点に関して、各重要臓器の形態学的評価、血清学的評価を両群(電気刺激群、Sham手術群)で比較し、解析する。

3. 研究の方法

(1) ラット熱中症モデル作成プロトコール

本研究で用いる実験動物は、全て10-12週齢ラットを用いる。全身麻酔下に、小動物用体温保持装置(Bio Research Center社製、BWT-100A)を用いて急速加温する。熱中症設定温度を 41.5 ± 0.2 とし、設定温度に達した時点から30分間維持する。生食10mlを皮下注射し、モデル作成は終了である。この致死的热中症モデルにおける7日間死亡率は、約70%である。

(2) 電気的迷走神経刺激プロトコール

本研究で用いるコリン作動性抗炎症経路を賦活化する方法は、電気的頸部迷走神経刺激によって行う。熱中症モデル作成直前に、5mmの皮膚切開を置き左頸部迷走神経を露出、自作電極を固定する。電気刺激は、熱中症ストレス終了直後から20分間持続的に行う。電気刺激にはパルス発生装置(AMP社製、MASTER-8)を用い、設定は10V、2mS、5Hzとする。

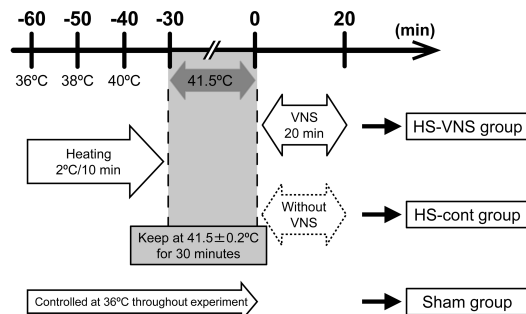


図1. 本実験のプロトコール概略

(3) 電氣的迷走神経刺激の死亡率改善効果の評価

非熱中症群、熱刺激後の電氣的迷走神経刺激群およびSham手術群の計3群に無作為割り付けする。熱中症モデル作成直後に電氣的迷走神経刺激を行い、その後7日間の生存確認を行うことで、致死性熱中症に対する電氣的迷走神経刺激の死亡率改善効果の評価を行う。

(4) 熱中症に伴う重要臓器障害の形態学的評価

本研究で対象とする治療介入法であるコリン作動性抗炎症経路は、脾臓マクロファージが主体となる経路であることが報告されている。また、熱中症を含む全身性炎症反応症候群において肺は早期より高度な障害を受け、侵襲時の生体応答における重要臓器である。そのため、本研究では脾臓および肺を評価対象臓器とし、熱刺激に対する生体反応の違いを形態学的に評価した。

熱刺激後6時間時点でラットを犠死させ、還流固定の後に脾臓・肺を摘出する。ホルマリン固定の後に各臓器の凍結切片を作成する。免疫組織学的検索により、各臓器の炎症細胞浸潤(抗CD11b抗体[M1/70; BD Pharmingen社製])により炎症所見の程度を捉えると共に、血管内皮障害を抗ラット内皮細胞抗体(RECA-1 ab9774; Abcam社製)を用いて解析する。さらに、コリン作動性抗炎症経路における主要な作用点である $\alpha 7$ アセチルコリン受容体について、抗 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体抗体(H302; Santa Cruz Biotechnology社製)を用いてその発現の変化を評価する。

(5) 熱中症に伴う全身性炎症反応の血清学的評価

熱刺激後1時間・3時間・6時間の時点で、犠死させた上でそれぞれ独立した実験動物から採血検体を採取する。全身炎症および血管内皮障害の評価を目的として血清中のケミカルメディエーター(TNF- α 、IL-6、トロンボモジュリン、E-セレクトイン)をELISA法で測定する。

(6) 電氣的迷走神経刺激の抗炎症効果・臓器障害改善効果の評価

前述の(4)および(5)で示した評価項目について、無作為に割り付けした非熱中症群、電氣的迷走神経刺激群およびSham手術群の三群間で比較検討を行う。そのことで電氣的迷走神経刺激による治療効果を、病理組織診断による各臓器障害、血管内皮障害の程度、ケミカルメディエーターの変動が改善するか否かの観点から評価する。

また、 $\alpha 7$ アセチルコリン受容体を発現した炎症担当細胞の評価を行うことで、熱中症モデルにおけるコリン作動性抗炎症経路の破綻のメカニズムを解析する。

4. 研究成果

(1) 電氣的迷走神経刺激の死亡率改善効果

非熱中症群、熱刺激後の電氣的迷走神経刺激群およびSham手術群の計3群の生存解析を行った。非熱中症群は全例生存した。熱中症導入後7日間の生存率は、迷走神経刺激群ではSham手術群と比較して有意に改善した(26% vs. 61%)。このことは、熱中症病態においてコリン作動性抗炎症経路が破綻し、電氣的迷走神経刺激によって賦活化されたことで生存率が改善した可能性が考えられる。

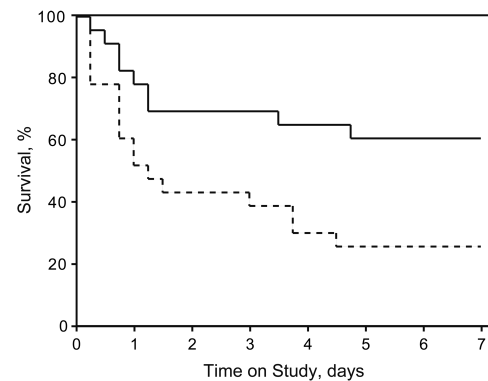


図2. 熱中症後7日間の Kaplan-Meier 生存曲線
実線: 迷走神経刺激群、破線: Sham手術群

(2) 電氣的迷走神経刺激の全身性炎症反応抑制効果

熱中症病態において誘導される全身炎症が電氣的迷走神経刺激によって制御されているかを血清学的に解析した。熱中症により血清 TNF- α は熱刺激導入後3時間後に有意に上昇したが、電氣的迷走神経刺激をすることでその上昇が抑制された。同様の抗炎症効果は、IL-6値においても認められ、血管内皮障害の指標であるE-セレクトイン・可溶性トロンボモジュリン値も電氣的迷走神経刺激によって有意に低下することが確認できた。

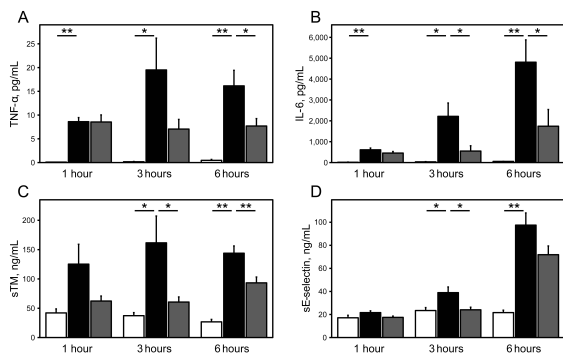


図3. 各種血清メディエーターの推移

A: TNF- α 、B: IL-6、C: トロンボモジュリン、D: E-セレクトイン

白棒: 非熱中症群、黒棒: Sham手術群、灰棒: 迷走神経刺激群

(3) 炎症細胞浸潤の組織学的評価

熱中症病態においてコリン作動性抗炎症経路が破綻する機序を検討するため、熱中症刺激後6時間の脾臓での炎症細胞の動態を

比較検討した。熱中症後の炎症細胞の動態を CD11b 陽性細胞で評価し、さらに同細胞上の $\alpha 7$ アセチルコリン受容体の発現の変化を検討した。その結果、熱中症刺激によって脾臓での CD11b 陽性炎症細胞は増加するが、それらの細胞の大部分が $\alpha 7$ アセチルコリン受容体を発現していないことが明らかとなった。このことは、熱中症病態においてコリン作動性抗炎症経路が十分に機能していない可能性を示唆する。

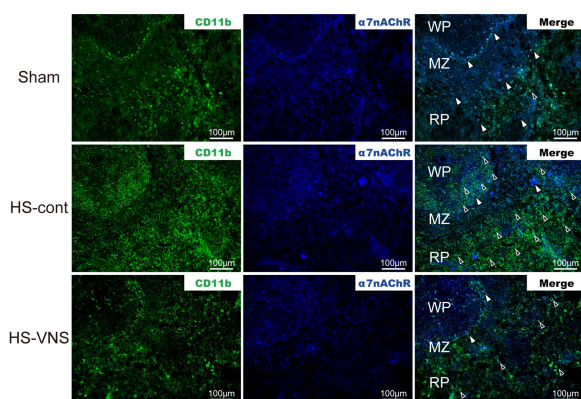


図4 .脾臓における CD11b 陽性細胞の変化と $\alpha 7$ アセチルコリン受容体の発現頻度

WP, White Pulp; MZ, Marginal Zone; RP, Red Pulp
白矢印は $\alpha 7$ アセチルコリン受容体を発現した CD11b 陽性細胞、白抜き矢印は $\alpha 7$ アセチルコリン受容体を発現していない CD11b 陽性細胞を示す。

以上の解析結果から、熱刺激により誘導されるコリン作動性抗炎症経路の破綻が、全身性炎症反応を伴う熱中症病態の重症化過程に影響を与える可能性が明らかとなった。電氣的迷走神経刺激によるコリン作動性抗炎症経路の賦活化療は、熱中症の新規治療になる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Yamakawa K, Matsumoto N, Imamura Y, et al. Electrical Vagus Nerve Stimulation Attenuates Systemic Inflammation and Improves Survival in a Rat Heatstroke Model. PLoS ONE (査読有) 8(2): e56728, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0056728

山川一馬、松本直也、小倉裕司 【神経内分泌反応と炎症・凝固反応】迷走神経刺激と熱中症 Thrombosis Medicine (査読なし) 4(1);34-40, 2014.

[学会発表](計2件)

Yamakawa K, et al. CHOLINERGIC ANTI-INFLAMMATORY PATHWAY IN HEAT STRESS The 35th Annual

Conference on Shock 2012年06月09日~2012年06月13日 米国マイアミ

山川一馬ら コリン作動性抗炎症経路に着目した熱中症の病態解明と新規治療戦略の開発 第19回外科侵襲とサイトカイン研究会 2012年12月8日 神戸

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山川 一馬 (YAMAKAWA, Kazuma)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 50597057

(2) 研究協力者

小倉 裕司 (OGURA, Hiroshi)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 70301265

松本 直也 (MATSUMOTO, Naoya)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50359808

今村 行雄 (IMAMURA, Yukio)
京都大学・医学系研究科・研究員
研究者番号: 90447954

中川 淳一郎 (NAKAGAWA, Junichiro)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 60597508