

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253096

研究課題名(和文) 侵襲時再生治療に関する研究：細胞移植法の確立と免疫応答制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regenerative therapy following severe insults: Establishment of cell transplantation and elucidation of immunologic response

研究代表者

小倉 裕司(Ogura, Hiroshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70301265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲時再生応答・免疫応答の両面からみた新たな治療戦略として、血管内皮および腸管上皮の再生応答と幹細胞移植法に関する研究を進めた。(研究1)パターン認識受容体の1つであるRAGEに注目し、敗血症患者における血中可溶性RAGEを測定し、病勢と密接な関連を示すことを明らかにした。(研究2)腹膜炎モデルにおいて、腸管上皮幹細胞マーカーのLgr5が低下しており、腸管上皮幹細胞障害が起きる可能性を示した。(研究3)クラッシュ症候群モデルにおいて、骨髄由来単核球細胞移植は抗炎症作用を発揮して全身性炎症反応を制御し、生存率を改善することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study were to evaluate the regenerative/ immunological response after severe insults and to examine the effects of intravascular transplantation of stem cells. (Study 1) We examined soluble RAGE in patients with sepsis and found its association with endothelial injury and organ damage. (Study 2) In a mouse model of peritonitis, the expression of Lgr5, a marker of intestinal epithelial stem cell, was suppressed, showing the stem cell dysfunction in the gut. (Study 3) We clarified that transplantation of bone marrow derived mononuclear cells exerted anti-inflammatory effects and improved the survival in a rat model of crush injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：侵襲 再生 血管内皮 細胞移植 腸管上皮幹細胞 免疫反応 骨髄単核球細胞 RAGE

## 1. 研究開始当初の背景

重症外傷、敗血症、ショックなどの重度侵襲に伴い、全身性炎症反応が引き起こされ、重症例では多臓器障害に進行する。多臓器障害に陥ると治療に難渋するだけでなく救命が困難となり、また集中治療に莫大な治療費を要する。全身性炎症反応の主要な標的として血管内皮と腸管上皮が注目されており、多臓器障害では血管内皮傷害、腸管上皮傷害の進行が顕著となることから、我々は、血管内皮および腸管上皮の再生応答を効果的に制御する必要があると考えている。近年、全身性炎症反応の治癒機転には多くの修復・再生過程が関与することが明らかとなり、侵襲にともなう再生応答を効果的に制御して多臓器障害の進行を防ぐことが急務と考えられる。

我々は、重度侵襲にともなう全身性炎症反応、多臓器障害の進行をいかに制御すべきかをテーマとして、再生応答、再生治療に注目した研究を進めてきた。その結果、(1)血管内皮の再生応答は、臓器障害の進行過程および修復過程で重要な役割を演じていること(Shock誌2007)、(2)多臓器障害モデルにおいて、骨髄間葉系幹細胞の血管内細胞移植が著明な抗炎症作用、血管内皮保護作用を発揮し、臓器障害および生存率を有意に改善すること、を明らかにした。しかしながら、侵襲時再生応答と免疫応答の関連は十分に解明されておらず、幹細胞移植が侵襲時免疫応答を制御するメカニズムも不明である。幹細胞移植の有効性を確立するためには、侵襲反応を主に制御する免疫応答に及ぼす効果を明らかにする必要がある。

本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、侵襲時再生応答、免疫応答の両面からみた新たな治療戦略として、血管内皮及び腸管上皮の修復・再生効果をもつ幹細胞移植法を確立することを目指し、骨髄間葉系幹細胞、骨髄由来単核球細胞、腸管上皮幹細胞の各細胞移植法の有効性と免疫応答制御メカニズムを検討する。その際、(1)侵襲の種類により、また移植細胞の種類、投与時期により、細胞移植の効果にどのような差が見られるか、(2)各細胞移植法が、再生応答、免疫応答を制御するメカニズムは何か、に関して検討する。本研究から、侵襲時再生応答、免疫応答の両面からみた適切な細胞移植法が提案できれば、免疫反応を制御する血管内皮、腸管上皮の再生療法として新たな臨床応用への道が開ける。

## 2. 研究の目的

侵襲時再生応答・免疫応答の両面からみた新たな治療戦略として、血管内皮および腸管上皮の修復・再生効果をもつ幹細胞移植法を確立するために、以下の2点に目標を絞り、本研究を実施した。侵襲時における再生応答と免疫応答の関連を経時的に評価する。特に、重症敗血症患者における血管内皮 DAMPs レセプターの推移と臓器障害・予後との関連

を明らかにする。侵襲モデルにおいて幹細胞移植を行い、有効性およびそのメカニズムを評価する。また、侵襲時の腸管上皮幹細胞の動向とそのメカニズムを明らかにする。

本稿では、主要な研究成果として次の3つの研究を示す。(研究1)生体内のパターン認識受容体の1つである RAGE に注目し、敗血症患者における血中可溶性 RAGE を測定し、重症敗血症の病態との関連を評価した。(研究2)腹膜炎モデルにおいて、腸管上皮幹細胞マーカーの Lgr5 を用いて腸管上皮幹細胞障害の有無を評価した。(研究3)クラッシュ症候群モデルにおいて、骨髄由来単核球細胞移植の有効性を評価した。

## 3. 研究の方法

### (研究1)

【対象】研究デザインは、前向きコホート研究であった。大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターにおいて診療を行った、18歳以上で重症敗血症の診断基準を満たした成人患者を対象とし、採血検査を施行した。比較対照として12名の健常者からも同様の採血検査を施行した。本研究は大阪大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得て実施した。

【方法】採血および研究エントリーのタイミングは、敗血症診断後24時間以内に限定した。以下に挙げる項目を、ELISA法にて評価し、敗血症患者における可溶性 RAGE の臨床的意義を明らかにした。

- 1) 可用性 RAGE
- 2) 損傷関連分子パターン(DAMPs) HMGB1
- 3) 炎症系マーカー TNF、IL6
- 4) 凝固線溶系マーカー FDP、フィブリノゲン、PT時間
- 5) 血管内皮障害マーカー PAI1、sVCAM-1

【重症度/DICの診断】採血時点での重症度/DICスコアも同様に集積した。

1) 重症度評価：採血時点の患者の重症度に関して、APACHE II スコア、SOFA スコアによって評価した。

2) DIC 評価：採血時点の凝固線溶異常を、ISTH-DIC スコア〔9、10〕を算出することで評価した。

### 【統計解析】

連続変数は中央値(四方位範囲)で表記した。二群間の比較は Mann-Whitney U 検定を用いた。二値の相関の検定には、Spearman 順位相関係数を算出した。P 値 0.05 以下を有意とした。

### (研究2)

【BrdUを用いた侵襲時の腸管上皮の turnover についての実験】

腸管上皮の turnover が敗血症による重度侵襲時にどうなっているかを把握するために、C57BL/6J マウスを用い、盲腸結紮穿孔(cecal ligation puncture: CLP)による敗血症モデルと Sham operation 群に対し、BrdU を投与し、その変化を見た。

介入(CLP または sham)と同時に並びに介

入 21 時間後に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 100mg/kg を腹腔内投与し、BrdU 投与 3 時間後にパラホルムアルデヒドで還流固定し、凍結切片をクリオスタットにて作成した。抗 BrdU 抗体を用いて、敗血症により腸管上皮における細胞の分裂、増加がどのような影響を受けるかを免疫蛍光染色により定量化し評価した。

#### 【侵襲時の腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子に関する実験】

C57BL6J mouse (male, 10~12W) を用い、CLP モデル並びに Sham Operation 群に関して、腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子として Wnt3、Wnt3a、R-spondin1、EGF (Epidermal growth factor)、BMP4 (bone morphogenetic protein 4)、BMP2、Noggin、Notch1、Dl1 (delta-like1)、Dl4 (delta-like4) ならびに各腸管上皮構成細胞のマーカーとして、Lgr5 (腸管上皮幹細胞)、Alpi (enterocyte)、lysozyme (パネート細胞)、Muc2 (杯細胞)、chromograninA (腸管内分泌細胞)、さらには炎症のマーカーである IL-6 を Real-time PCR による核酸発現の解析をすることで、全身侵襲に対する腸管上皮幹細胞を含む腸管上皮細胞の応答性を明らかにすることを試みた。

#### 【Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 マウスを用いた腸管上皮幹細胞機能の評価】

腸管上皮幹細胞に特異的に EGFP が発現する Lgr5-EGFP-IRES-creERT2 マウスを用いて、上記敗血症モデルを作成し、Sham Operation 群と共に介入 3 時間後、24 時間後に還流固定し、十二指腸、回腸、大腸の切片を作成した。1 週間生存率約 30% モデル (18G 針) ならびに 70% モデル (23G 針) の二種類を作成する。これらを蛍光顕微鏡で観察・比較することで、侵襲下における腸管上皮幹細胞の増殖・分化・細胞死を形態学的に評価する。視認できる陰窩数に対する、Lgr5 陽性細胞が残っている陰窩数の比を検討した。

#### 【統計学的解析】

数値データは  $\pm$ SD で記載。全ての統計学的解析は Windows 版 SPSS version 23.0 を用い、 $p < 0.05$  を統計学的有意とした。細胞数の検討には一元配置分散分析、post hoc test で Tukey の HSD 検定を用い、RT-PCR の結果については Sham 群と CLP 群で得られた値を t 検定で比較検討した。

### 【研究 3】

#### 【実験動物モデル】

実験には specific pathogen-free Wistar ラットの雄 8 週齢 (190g-225g) を用いた。これらのラットは自由に食餌、飲水ができるように管理した。本動物実験は大阪大学動物実験規定に基づき、倫理委員会からの承認を受けた。

ラットに対してはペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与し、全身麻酔を行った。全身麻酔の維持にはペントバルビタール (10mg/kg) を 1 時間ごとに腹腔内投与し行っ

た。実験中は動物体温測定用サーミスタセンサと保温パッド (BIO-MEDICA, Osaka, Japan) を用いて、直腸温を 37 にコントロールした。

ラットに対して全身麻酔を行った後に、左外頸静脈を外科的に露出し、0.3mm ポリエチレン製チューブを挿入し、輸液及び薬剤投与ルートとした。

実験動物モデルは我々がすでに確立したラットクラッシュ症候群モデルを応用し用いた。全身麻酔下のラットを仰臥位とし、両下肢の圧挫には専用器具 (Asai Works Co, Osaka, Japan; Konan Medical Laboratory Co, Kobe, Japan) を用いた。両下肢にはそれぞれ 2.5kg の重りと専用器具の板の計 3.0kg で圧迫した。

両下肢とも圧迫時間は 6 時間行った。圧迫開始時から左外頸静脈ルートより生理食塩水 (1ml/kg/h) を持続投与した。圧迫解除 1 時間前 (圧迫開始から 5 時間後) からは大量輸液 (生理食塩水 10ml/kg/h) を持続投与した。圧迫解除後も 3 時間大量輸液を継続した。圧迫解除 3 時間後 (大量輸液開始 4 時間後) に左外頸静脈ルートを抜去し、ラットをケージに戻した。ケージに戻した後は食餌・飲水は自由にできるようにした。

#### 【骨髓由来単核球細胞の採取】

specific pathogen-free Wistar ラットの雄 8 週齢に対して、ペントバルビタールを腹腔内投与し全身麻酔を行った。全身麻酔を行った後に、頸動脈を切開し瀉血を行った。アルコール噴霧を行い、全身清拭を行った後に、両下肢から大腿骨及び脛骨を摘出した。大腿骨及び脛骨の骨髓を 18G 針でトンネリングした後に 10ml シリンジを用いて PBS で wash out し、複数回吸引・排出を繰り返し細胞を分離し、骨髓液を作成した。

50ml コニカルチューブに Ficoll-Paque™ 液を入れ、骨髓溶液を Cell straubler 100um 用でろ過し、ゆっくり加えた。その後、遠心分離機を用いて 400g、30 分、20 で遠心し、上清を除去した後に白濁した中間層 (骨髓由来単核球細胞層) を抽出した。続いて、抽出した中間層を新たな 50ml コニカルチューブに加え、適量の PBS を添加し、複数回洗浄した。Cell counter (Invitrogen, USA) を用いて溶液内の単核球細胞数を測定し、 $1 \times 10^7$  個/ml となるように PBS で調整した。採取した骨髓由来単核球細胞の viability は 90% を越えており、手技の安定性は確認された。

#### 【実験プロトコール】

##### (1) 生存率の検定

ラットを sham 群、control 群、骨髓由来単核球細胞移植 (BMMNCs) 群の 3 群に分けて検討した。sham 群は両下肢の圧迫を行わず、輸液及び大量輸液のみを行った ( $n=6$ )。control 群は両下肢圧迫を行い、圧迫解除直後に PBS 1ml を PBS を左外頸静脈ルートから単回投与した ( $n=21$ )。BMMNCs 群は両下肢圧迫を行い、圧迫解除直後に骨髓由来単核球細胞を  $1 \times 10^7$  個を左外

頸静脈ルートから単回投与した(n=20)。生存率の確認は圧迫解除後7日間行った。

#### (2) 血清学的検討

それぞれ独立した個体から血清検体を採取した。採取方法はラットに対して全身麻酔を行い、外科的に腹部大動脈からポリプロピレンチューブを用いて採取した。血液は一晚4℃に保存したのち、遠心分離(3000g, 15分, 4℃)し、上清を測定まで-20℃で保存した。血清は圧迫解除後3時間、6時間、24時間に採取し測定した。それぞれ個体数は圧迫解除3時間後はsham群(n=3)、control群(n=8)、BMMNCs群(n=8)、圧迫解除6時間後はsham群(n=3)、control群(n=8)、BMMNCs群(n=9)、圧迫解除24時間後はsham群(n=3)、control群(n=9)、BMMNCs群(n=10)とした。

#### 血清炎症性サイトカインの測定

血清炎症性サイトカインはIL-6、TNF- $\alpha$ を測定した。ELISAキットはIL-6 (R&D Systems, Minneapolis, Minn) TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, Minn)をそれぞれ用いた。血清抗炎症性サイトカインはIL-10、TGF- $\beta$ を測定した。ELISAキットはIL-10 (R&D Systems, Minneapolis, Minn) TGF- $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, Minn)をそれぞれ用いた。

#### 【組織学的検討】

組織学的検討は圧迫解除後3時間の個体を用いて行った。ペントバルビタールを用いて全身麻酔を行った後に、心臓を穿刺しPBSを用いて全身還流した。その後4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。採取した臓器は約20時間4%パラホルムアルデヒドで固定し、15%、20%、25%ショ糖液を用いて脱水した後に、OCT compoundを用いて凍結ブロックを作成した。組織切片の作成にはクリオスタット (CM3050S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いた。スライス厚は7 $\mu$ mとした。作成したスライドはヘマトキシリン-エオジン染色を行い、光学顕微鏡 (BX-51; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

#### 【統計学的検定】

統計解析にはJMP version 11.2 software (SAS Institute, Cary, NS)を用いた。生存曲線はKaplan-Meier methodを用い、検定にはlog-rank testを用いた。それぞれの血清データはmean  $\pm$  standard error of the mean (SEM)で表記し、統計学的解析には分散分析 (ANOVA)を用い、post-hoc testにはTukey法を用いた。P<0.05を有意差とした。

## 4. 研究成果

### (研究1)

#### 【対象患者】

本研究の対象は重症敗血症患者24名で、男性15名、女性9名、年齢中央値は69.5歳であった。患者群の重症度評価としては、APACHE II、SOFAスコアの中央値が、それぞれ20と6.5であった。感染部位は、胸部11

名、腹部3名、軟部組織1名、泌尿器6名、その他1名であった。併存疾患は、糖尿病6名、高血圧3名、脳血管疾患2名、心不全2名、肝疾患6名、呼吸器疾患1名、腫瘍疾患1名であった。

#### 【重症敗血症における可溶性RAGE値】

重症敗血症患者(中央値626 ng/mL)では健常対照者(中央値454 ng/mL)と比較して、可溶性RAGE値は有意な増加を認めた。

#### 【可溶性RAGE値と重症度との関連】

可溶性RAGE値はAPACHE IIスコア( $p=0.018$ ,  $\rho=0.479$ )、SOFAスコア( $p=0.046$ ,  $\rho=0.411$ )と有意な相関を認めた。

#### 【可溶性RAGE値とDICスコア、血小板、FDP、フィブリノゲン値、PT時間との関連】

可溶性RAGE値はISTH-ICスコア( $p=0.034$ ,  $\rho=0.435$ )と有意な相関を認めた。可溶性RAGE値は血小板値とは有意な相関を認めなかった( $p=0.046$ ,  $\rho=0.411$ )。FDP値、フィブリノゲン値、PT時間とは有意な相関を認めなかった。

#### 【可溶性RAGE値と各種炎症性マーカーとの関連】

可溶性RAGEと炎症との関連を評価する目的で、IL6、TNFを測定した。可溶性RAGE値はIL6値( $p=0.003$ ,  $\rho=0.578$ )と有意な相関を認めしたが、TNF値とは有意な相関を認めなかった。

可溶性RAGEと血管内皮障害との関連を評価する目的で、PAI1、sVCAM-1を測定した。可溶性RAGE値はPAI1値( $p=0.024$ ,  $\rho=0.458$ )、sVCAM-1値( $p=0.041$ ,  $\rho=0.419$ )と有意な相関を認めた。

RAGEと、そのリガンドとの関連を調べる目的で、DAMPsのHMGB-1を測定した。可溶性RAGE値はHMGB-1値( $p=0.112$ ,  $\rho=0.333$ )と有意な相関を認めなかった。

以上の結果より、重症敗血症の病勢(炎症、血管内皮細胞障害、凝固、重症度)と可溶性RAGEは密接に関連しており、可溶性RAGE/RAGEシグナル系は重症敗血症において、重大な役割を担う可能性が示唆された。

### (研究2)

#### 【BrdUを用いた侵襲時の腸管上皮のturn over についての実験】

犠死の3H前にBrdU100mg/kgを腹腔内投与し、Sham手術後3時間、24時間で犠死せしめたマウス(Sham3H、Sham24H)と、23G針でCLPを作り3時間後、24時間後に犠死せしめたマウス(23CLP3H、23CLP24H)、同様に18G針でCLPを作ったマウス(18CLP3H、18CLP24H)のそれぞれを4匹ずつ用いた。

BrdU陽性細胞数の結果では、回腸におけるSham24Hと23CLP24Hの間にBrdU陽性細胞数の有意差が認められ、侵襲を加えると陰窩中のBrdU陽性細胞数、ひいては細胞分裂している細胞が減少している傾向が見られた。

#### 【侵襲時の腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子に関する実験】

CLP群およびSham Operation群における、

腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子、各腸管上皮構成細胞のマーカー、IL-6をReal-time PCRで測定した。CLP群は5匹、Sham群は3匹を用い、手術から10時間後に腸管を回収し測定した。

炎症の指標であるIL-6はCLP群で有意に高く、高度侵襲は明らかであった。腸管上皮幹細胞の増殖・分化の制御に関わる機能分子では、陰窩底部における未分化細胞の増殖のシグナルであるWnt3、Wnt3aはCLP群で有意に低下しており、Wnt活性化に働くR-spondin1、EGFは有意差ないものの、CLP群で低下傾向であった(R-spondin1  $p=0.053$ 、EGF  $p=0.132$ )。対してWntに抑制的に働くBMP4、BMP2には差を認めず、BMPの阻害タンパクであるNogginはCLP群で有意に低下していた。Stem cellの未分化性の維持に関与するNotch1や、Notchシグナルの活性化に関与するDll1、Dll4は差を認めなかった。これらの結果から腸管上皮細胞の増殖・分化を亢進する方向に働くシグナルはCLP侵襲下で低下し、対して腸管上皮細胞の増殖・分化を抑制する方向に働くシグナルは変化しないことが分かった。

各腸管上皮構成細胞のマーカーとしては、腸管上皮幹細胞マーカーのLgr5、パネート細胞のLysozymeがCLP群で有意に低下していた。Alpi(刷子縁)、Muc2(杯細胞)、chromograninA(腸管内分泌細胞)はCLP群で低めであったものの有意差は認めなかった。

【Lgr5-EGFP-IRES-creERT2マウスを用いた腸管上皮幹細胞機能の評価】

Lgr5-EGFP-IRES-creERT2マウスを用いて、実験と同様にSham3H(N=2)、Sham24H(N=1)、23CLP3H(N=4)、23CLP24H(N=4)、18CLP3H(N=3)、18CLP24H(N=4)を作製した。切片中の陰窩のLgr5陽性細胞保有率を評価すると、十二指腸でSham3H-18CLP3H、Sham24H-23CLP24H、Sham24H-18CLP24H間に、回腸でSham24H-23CLP24H、Sham24H-18CLP24H間に、結腸でSham3H-18CLP3H間に有意差を認め、侵襲が加わると明らかにLgr5細胞数が減少していた。

以上の結果は、侵襲に伴い腸管上皮幹細胞障害が起こり、絨毛萎縮や腸管蠕動不全が生じ、栄養障害や腸管免疫能の低下などにつながる可能性を示す。

### 【研究3】

#### 【7日間生存率】

両下肢圧迫解除後7日間の生存率はsham群100%(6/6)、control群47.6%(10/21)、BMMNCs群80.0%(16/20)であった。BMMNCs群ではcontrol群に比べて有意に生存率改善効果が認められた( $p<0.05$ )。

#### 【血清炎症性サイトカインレベル】

血清IL-6値は、両下肢圧迫解除3時間後では、sham群が $95.0 \pm 4.46$  pg/mlであったのに対して、control群では $527.8 \pm 66.67$  pg/mlと有意に血清IL-6値は上昇した

( $p<0.05$ )。これに対してBMMNCs群では $304.9 \pm 21.44$  pg/mlと有意に血清IL-6の上昇が抑制された( $p<0.01$ )。両下肢圧迫解除6時間後では、sham群が $109.3 \pm 13.37$  pg/mlであったのに対して、control群では $912.7 \pm 146.99$  pg/mlと有意に血清IL-6値は上昇した( $p<0.05$ )。これに対してBMMNCs群では $476.1 \pm 77.54$  pg/mlと有意に血清IL-6の上昇が抑制された( $p<0.01$ )。同様に両下肢圧迫解除24時間後では、sham群が $87.9 \pm 3.37$  pg/mlであったのに対して、control群では $196.7 \pm 30.36$  pg/mlと有意に血清IL-6値は上昇した( $p<0.05$ )。これに対してBMMNCs群では $116.1 \pm 3.29$  pg/mlと有意に血清IL-6の上昇が抑制された( $p<0.05$ )。血清TNF値は両下肢圧迫解除3、6時間後ではsham群・control群・ETS-GS群間に有意差を認めなかった。圧迫解除24時間後ではcontrol群が $3.14 \pm 0.84$  pg/mlであったのに対してBMMNCs投与群では $1.07 \pm 0.16$  pg/mlと有意に上昇を抑制した( $p<0.05$ )。

#### 【血清抗炎症性サイトカインレベル】

血清IL-10値は、両下肢圧迫解除3時間後では、control群は $41.7 \pm 4.03$  pg/mlであったのに対して、BMMNCs群では $27.5 \pm 2.58$  pg/mlと有意に血清IL-10の上昇が抑制された( $p<0.05$ )。両下肢圧迫解除24時間後では、sham群が $40.5 \pm 3.28$  pg/mlであったのに対して、control群は $14.7 \pm 1.84$  pg/ml、BMMNCs群では $19.5 \pm 1.39$  pg/ml有意に低下を認めた( $p<0.01$ )。

血清TGF値は両下肢圧迫解除3時間後では、control群は $35663.4 \pm 9913.12$  ng/mlであったのに対して、BMMNCs群では $157036.2 \pm 13867.02$  ng/mlと有意に血清TGFが上昇した( $p<0.01$ )。一方、両下肢圧迫解除6時間後では、BMMNCs群は $51703.8 \pm 5989.55$  ng/mlであったのに対してcontrol群は $132646.9 \pm 8946.50$  ng/mlと有意に血清TGFが高値を示した( $p<0.01$ )。同様に、両下肢圧迫解除24時間後もBMMNCs群は $45686.9 \pm 3664.21$  ng/mlであったのに対してcontrol群は $76861.2 \pm 9912.03$  ng/mlと有意に血清TGFが高値を示した( $p<0.05$ )。

#### 【組織学的評価】

圧迫解除3時間後の肺組織は、control群ではsham群に比べて間質の浮腫や炎症細胞の浸潤が増強されていた。これに対してBMMNCs群ではこれらの所見が著明に抑制されていた。

以上の結果より、クラッシュ症候群に対する骨髄由来単核球細胞移植は、抗炎症作用を発揮して全身性炎症反応を抑制し、生存率を改善することが明らかとなった。骨髄由来単核球細胞移植はクラッシュ症候群に対する新たな治療法となりうる。

### 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3件)

Matsumoto H, Matsumoto N, Ogura H, Shimazaki J, Yamakawa K, Yamamoto K, Shimazu T. The clinical significance of circulating soluble RAGE in patients with severe sepsis. J Trauma Acute Care Surg, Vol78, 1086-94, 2015、査読有

〔学会発表〕(計12件)

Matsumoto H, Matsumoto N, Ogura H, et al. The clinical significance of circulating soluble RAGE in patients with severe sepsis. 73rs Annual Meeting of American Association for the Surgery of Trauma and Clinical Congress of Acute Care Surgery. 2014; September 10-13. Philadelphia.

中川淳一郎、松本直也、小倉裕司ら、外傷における全身炎症とその制御：クラッシュ症候群モデルにおける検討、第42回日本救急医学会、2014年10月29日、福岡

松本寿健、松本直也、小倉裕司ら、重症敗血症病態における新規免疫応答因子の評価、第42回日本救急医学会、2014年10月28日、福岡

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小倉 裕司 (OGURA HIROSHI)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：70311265

### (2)研究分担者

吉矢 和久 (YOSHIYA KAZUHISA)  
大阪大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：40379201

嶋津 岳士 (SHIMAZU TAKESHI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50196474

松本 直也 (MATSUMOTO NAOYA)  
大阪大学・医学系研究科・招へい教員  
研究者番号：50359808

入澤 太郎 (IRISAWA TARO)  
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)  
研究者番号：50379202