

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591886

研究課題名(和文) 外科侵襲後の免疫不全の病態解明と腫瘍免疫に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Surgical stress induces immunosuppression and this condition contributes to tumor growth

研究代表者

小野 聡 (Ono, Satoshi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・防衛医学研究センター・准教授)

研究者番号：30531355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：消化器系悪性腫瘍において、術後感染性合併症を起こすと短期予後のみならず長期予後を増悪させるという報告が近年蓄積されてきた。しかし、この機序についての詳細な研究報告はほとんど皆無に等しい。そこでその機序を明らかにするために、マウスを用いて大腸癌株による肝転移モデルと腹膜炎の感染モデルを作成した。その結果、感染マウスでは肝転移巣が非感染マウスに比べ著明に増加していることが明らかになった。そこで肝臓の免疫機能を感染マウスと非感染マウスで比較したところ、感染マウスでは腫瘍免疫に重要なインターロイキン12やNK1細胞のIFN- γ 産生能、抗腫瘍活性が有意に低下していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Recently, there has been increasing evidence that postoperative infectious complications after digestive surgery were significantly associated with negative long-term outcome. However, the precise mechanism remains unclear. We studied to determine whether the infection induces enhanced cancer metastases and to investigate the role of natural killer (NK) cells. Mice were treated with colon cancer cells, which have high potential liver metastases. Thereafter, cecal ligation and puncture (CLP) or sham treatment (sham) were done. As a result, the volume of liver metastases and serum cytokine levels were significantly higher in CLP mice than in sham mice. In contrast, hepatic IL-12 levels were significantly decreased in CLP mice. Furthermore, a total number of the liver MNCs and the percentage of NK cells in the liver MNCs were significantly decreased in CLP mice. In conclusion, infectious conditions induced the suppression of cellular immunity, and promoted cancer metastases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科侵襲 感染 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

食道癌や肝胆道系癌手術など侵襲の大きな手術では、術直後に著明な炎症反応が惹起されると共に、その後には免疫機能低下状態に陥るため、高度手術侵襲後には術後感染症や臓器機能障害を合併症することが多い。このような環境では、局所の持続的な炎症反応が腫瘍細胞を刺激し転移能を獲得する現象として“*Inflammatory Oncotaxis*”と言われている。その後 1990 年以降、様々な消化器癌(特に食道癌、大腸癌)根治手術症例を対象に、術後合併症を併発した症例では進行癌症例において再発までの期間が短く、予後不良であることが指摘されている。しかしいずれの報告においてもその機序に関する検討は行われておらず、手術侵襲や術後合併症によって引きこされている炎症や感染が癌の転移や増殖に関与しているであろうと推論されているに過ぎない。

2. 研究の目的

そこで外科的侵襲後の炎症反応や感染が周術期免疫機能や腫瘍免疫に及ぼす影響について明らかにしその対策を講じることは、癌手術の予後を改善する上で極めて有用な研究である。本研究では外科侵襲時の免疫機能低下を natural killer 細胞や制御性 T 細胞(Treg)に注目した解析と免疫担当細胞の制御あるいは賦活化による癌手術予後改善を目指した周術期管理対策の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、高度手術侵襲症例を対象に末梢血中単核球でのサイトカイン産生能、IL-18R 発現やリンパ球、CD4+T 細胞、Treg 細胞について手術侵襲の程度や術後感染性合併症の有無で比較した。さらにマウス癌転移モデルに及ぼす

感染の影響を検討するため、主要臓器単核球でのサイトカイン産生能、CD4+T 細胞や Treg 細胞について検討した。具体的には、外科的侵襲時の IFN- γ 産生不全の解明とその対策、外科的侵襲時の Treg 細胞の役割とその対策、癌転移モデルにおける免疫担当細胞の関与とその対策、の研究課題を行った。

外科的侵襲時の IFN- γ 産生不全の病態解明とその対策

高度侵襲外科手術患者や外科的感染症患者を対象に、末梢血中の各種免疫担当細胞の割合や機能について手術侵襲の程度や術後感染性合併症の有無で比較検討した。具体的には、末梢血の白血球分画(好中球、リンパ球、CD56⁺ cells, CD57⁺ cells)、末梢血単核球でのサイトカイン産生能(TNF- α 、IFN- γ など)、血中 IFN- γ 、TGF- β 、IL-10 濃度や NK 細胞での IL-18R 発現を解析した。

外科的侵襲時の Treg 細胞の役割とその対策

高度侵襲外科手術患者や外科的感染症患者を対象に、末梢血中の各種免疫担当細胞の割合や機能について手術侵襲の程度や術後感染性合併症の有無で比較検討した。具体的には、末梢血の白血球分画(好中球、リンパ球、CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T cells)、末梢血単核球でのサイトカイン産生能(TNF- α 、IFN- γ など)、血中 IFN- γ 、TGF- β 、IL-10 濃度を解析した。

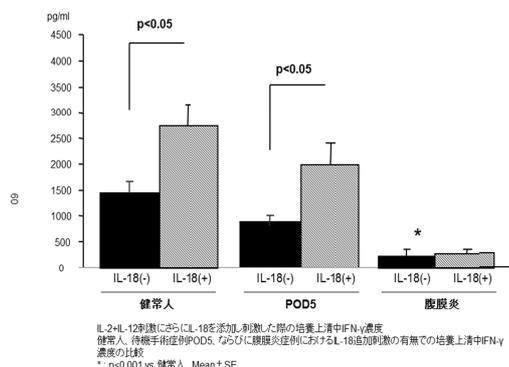
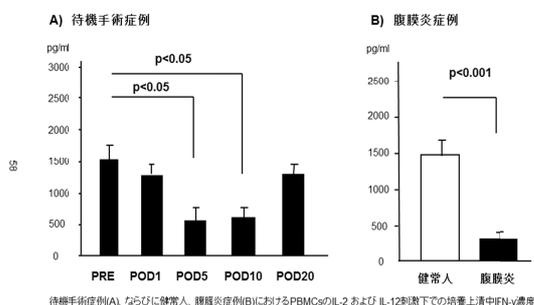
癌転移モデルにおける免疫担当細胞の関与とその対策

マウスを用いて大腸癌高転移株を脾臓に注入し大腸癌肝転移モデルを作製した。そこに外科的侵襲の違いによる肝臓での免疫担当細胞の機能解析と転移個数や予後との関連について検討すると共にその対策について検討した。具体的には、敗血症マウス(腹膜炎マウス)が肝免疫

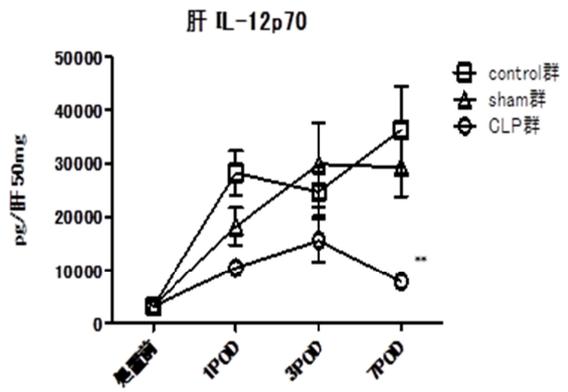
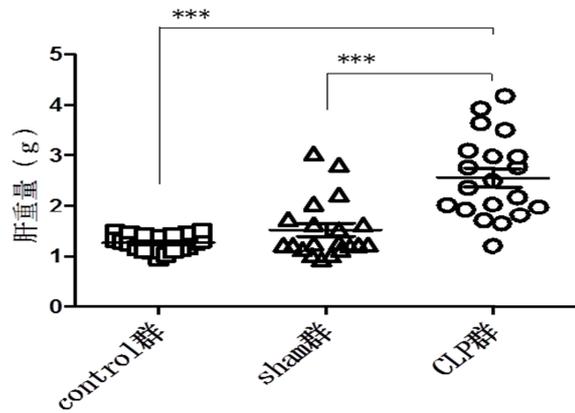
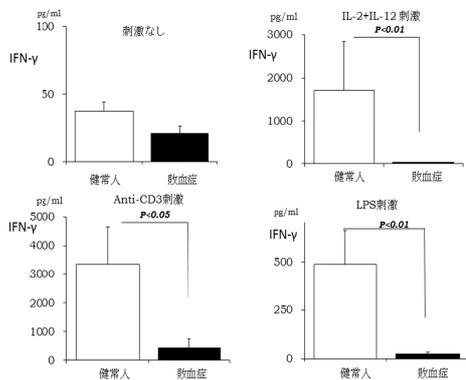
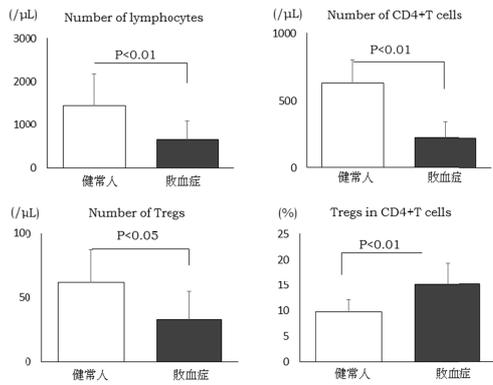
や肝転移に及ぼす影響について検討するため、肝単核球での IFN- γ 産生能や NK 細胞、Treg 細胞の割合、さらにはマクロファージでの TLR4 発現やケモカイン産生について比較した。さらに外科的感染の侵襲が肝転移巣に及ぼす影響について明らかにするため、癌巣周囲の免疫担当細胞の分析を行い、転移数や予後との関連について検討した。

4. 研究成果

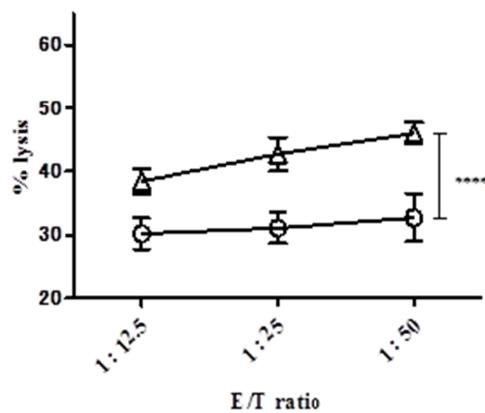
PBMCs での IFN- γ 産生能は、待機手術という非感染性侵襲および腹膜炎などの腹部外科感染症という感染性侵襲の両方で健常人に比し有意に低下していた(下図)。しかし、末梢血 NK 細胞における IL-18R の発現については、健常人に比し、待機手術後では有意差を認めなかったのに対し、腹膜炎症例では有意に低下していた。IFN- γ を誘導するために IL-18 添加刺激を行ったところ、待機手術症例では PBMCs の IFN- γ 産生能の改善効果が認められたが、腹膜炎症例では認められなかった(右上図)。したがって、感染と非感染では IL-18R 発現の差異が関与していると考えられた。これらの結果から、非感染性の外科的侵襲にともなう免疫能低下に対しては、IL-18 の投与が有効である可能性が示唆された。



敗血症症例では、白血球数・好中球数は健常人より有意に多かったが、逆に、リンパ球数は健常人より有意に少なかった。CD4+T 細胞数および Treg 数は敗血症症例では有意に少なかったが、CD4+T 細胞における Treg の割合は、有意に高値であった(次項左上図)。また血中 IL-10、IL-6、TGF- β 濃度は敗血症では健常人より有意に高値であった。敗血症症例の中で shock の有無で比較をすると、年齢や性別に差はないものの、shock 症例では、血中 IL-10、IL-6 は非 shock 症例に比べ有意に高値であった。TGF- β には差を認めなかった。また、白血球数や Treg 数には差を認めなかったが、敗血症性 shock 症例では、CD4+T 細胞数は有意に減少した。さらに、CD4+T 細胞における Treg の割合は有意に高かった。CD8+T 細胞には、有意な変化を認めなかった。さらに健常人と敗血症性ショック症例の末梢血単核球の IFN- γ 産生能は、IL-2 + IL-12、Anti-CD3、あるいは LPS で刺激をすると、健常人に対し、敗血症性ショック症例で有意に IFN- γ 産生能は低下していた(次項左下図)。



抗腫瘍活性 1日目



高肝転移大腸癌細胞株をマウスの脾臓に接種し、腹腔内感染を惹起させて肝転移が促進されるモデルを確立した。このモデルでは、腫瘍接種の7日後という早期より肝転移が認められ、14日目には更に転移巣が拡大した(右上図)。また、その生命予後も sham 群に比して不良であった。また敗血症モデルマウスは、モデル作成早期に全身性の高サイトカイン血症(IL-6, IL-10, IL-12)を示した。一方、肝組織では、催炎症性サイトカイン(IL-12p70)の低下に加え(右中図)、肝単核球の抗腫瘍活性が有意に低下していた(右下図)。なかでも、NK 細胞の量的・質的低下が顕著でありこれが腫瘍肝転移促進の大きな要因となっているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 29 件)

Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Kinoshita M, Hase K. Preoperative toll-like receptor expression in monocytes is associated with host immunological responses following gastrointestinal surgery. *World J Surg.* 35: 365-371, 2011. 査読有。

Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, et al. Enhancement of neutrophil function by interleukin-18 therapy protects burn-injured mice from methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Infection and Immunity* 79(7), 2670-2680, 2011. 査読有。

Takahata R, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Hase K. Postoperative serum concentrations of high mobility group box chromosomal protein-1 correlates to the duration of SIRS and pulmonary dysfunction following gastrointestinal surgery. *J Surg Res* 170: e135-140, 2011. 査読有。

Hiraki S, Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Hase K. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- decreases the percentages of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. *Surgery* 151: 313-322, 2012.

Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, Tsujimoto H, Miyazaki H, Saitoh D, Hase K. Neutralization of IL-10 restores the down-regulation of IL-18 receptor on NK cells and IFN- production in septic mice, thus leading to an improved survival. *Shock* 37: 177-182, 2012. 査読有

Tsujimoto H, Ono S, Hase K, et al. Systemic

inflammatory response syndrome as a predictor of anastomotic leakage after esophagectomy. *Surgery Today* 42: 141-146, 2012. 査読有

Kimura A, Ono S, Tsujimoto H, Miyazaki H, Kinoshita M, Saitoh D, Hase K. et al. The postoperative serum interleukin-15 concentration correlates with organ dysfunction and the prognosis of septic patients following emergency gastrointestinal surgery. *J Surg Res* 175, e83-88, 2012. 査読有。

Tsujimoto H, Ono S, Hase K, et al. Video-assisted thoracoscopic surgery for esophageal cancer attenuates postoperative systemic responses and pulmonary complications. *Surgery* 151: 667-73, 2012. 査読有。

Ono S, Tsujimoto H, Kinoshita M, Miyazaki H, Hase K, Saitoh D, et al. Removal of increased circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers. *Surgery* 153: 262-271, 2013. 査読有

Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Seki S. Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J Leukoc Biol* 93: 689-698, 2013. 査読有

[学会発表](計 5 件)

小野 聡, 辻本広紀, 宮崎裕美, 木下 学, 長谷和生, 齋藤大蔵, 他。(パネルディスカッション)外科侵襲後の生体反応における免疫不全の病態解析とその対策に関する検討。第 112 回日本外科学会定期学術集会(千葉)、2012 年 4 月。

小野 聡。(シンポジウム)外科系学会における侵襲学研究の位置づけと今後の展望。第 27 回日本 Shock 学会(東京)、2012 年 5 月。

小野 聡、辻本広紀、長谷和生、他。消化器外科周術期の病態形成における制御性 T 細胞の役割とその対策に関する検討。第 67 回日本消化器外科学会総会(富山)、2012 年 7 月。

小野 聡、辻本広紀、木下 学、長谷和生、齋藤大蔵、他。(シンポジウム)外科侵襲後の免疫応答の病態解析とその対策に関する研究。第 113 回日本外科学会定期学術集会(福岡)、2013 年 4 月。

Ono S, Miyazaki H, Tsujimoto H, Kinoshita M, Hase K, Saitoh D, et al. The Predictive Value of Endotoxin Activity Assay for The Incidence of Postoperative Infectious Complications Following Elective Gastrointestinal Surgery. Thirty-sixth Annual Conference on Shock, San Diego, California, USA. 2013 年 6 月。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 聡 (ONO, Satoshi)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・准教授 研究者番号:30531355

(2) 研究分担者

辻本広紀 (TSUJIMOTO Hironori)
防衛医科大学校・病院 講師
研究者番号:80554998

木下 学 (KINOSHITA Manabu)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課

程・准教授

研究者番号:70531391

宮崎裕美 (MIYAZAKI Hiromi)

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・助教

研究者番号:30531636

長谷和生 (HASE Kazuo)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号:50511268

齋藤大蔵 (SAITOH Daizoh)

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授

研究者番号:90531632