

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462461

研究課題名(和文) 外科侵襲による抗菌ペプチド産生変化と白血球モジュレーションによる制御法の開発

研究課題名(英文) Surgical stress induced antimicrobial peptide and immune cells alterations and its modulation

研究代表者

川崎 貴士 (KAWASAKI, Takashi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：60299633

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)：本研究は、外科侵襲による免疫担当細胞プロファイル変化を評価し、表皮ケラチノサイトからの抗菌ペプチド産生に与える影響を解明することを目的とする。動物実験において、外科侵襲は好中球のプロファイル変化を誘導しCCL3、IL-12、CCL2、IL-10産生能は著明に変化した。また、熱傷マウス好中球と正常マウス表皮ケラチノサイトを共培養したとき、ケラチノサイトからのMBD産生は有意に低下した。臨床研究においては、外科侵襲下患者の好中球でCCL3、IL-12の産生が低下し、CCL2、IL-10が誘導されていることを見出した。また、外科侵襲下患者の好中球は、NHEKからのHBDS産生を有意に低下させた。

研究成果の概要(英文)：Immunosuppressive neutrophils (PMN-II) appeared in association with surgical injury play a role on the increased susceptibility of patient to various infections. In the present study, a role of PMN-II on the production of beta-defensins (BD), the important molecules on the host antimicrobial innate immunities, by human keratinocytes was studied. Normal human epidermal keratinocytes were transwell-cultured with neutrophils, isolated from surgical patients or normal volunteers. The production of BD by NHEK was suppressed by PMN from surgical patients. The culture fluids of NHEK cultured with surgical patient PMN showed decreased antimicrobial activities, as compared with controls. PMN isolated from peripheral blood of surgical patients were confirmed as PMN-II, because these cells produced CCL2, but not IL-12 and CCL3. These results indicate that PMN-II appeared in association with surgical injury contribute to the decreased production of BD in surgically injured patients.

研究分野：麻酔科学

キーワード：外科的侵襲 免疫 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

外科侵襲により患者の免疫能が低下し易感染状態になる。感染性合併症発症から臓器不全、死へと至る。手術部位感染症 (Surgical Site Infection: SSI) 発生は入院期間の延長、医療費の増大、患者の医療への満足度低下をまねき、医療の質の低下と経済的損失は患者のみならず病院にとっても問題となる。1999年に米国疾病予防局 (CDC) により SSI 予防ガイドラインが発表されて以来、SSI への関心は我が国においても高まってきている。しかし、現在においても SSI は手術患者の院内感染症頻度では最多である。

近年、手術・麻酔手技の向上、手術環境の改善、周術期管理の徹底などによる手術適応拡大に伴い高齢者をはじめ低栄養、貧血、脱水および免疫不全などの重篤な基礎疾患、合併症を有する患者の手術が増加している。また、化学・放射線療法などの抗癌治療後の手術も増え、このようなハイリスク、コンプロマイズドホストの症例に対しても侵襲の大きい手術が行われるようになり、術後感染の様相も複雑になってきている。SSI 対策として 2008 年にも SHEA/IDSA から予防戦略が発表されているが、感染を 100% 防ぐ方法はなく、SSI 発生の予防戦略をさらに開発する必要がある。

自然免疫は細菌感染に対する宿主防衛の初期段階で重要な役割を担っている。好中球と単球・マクロファージ、樹状細胞が自然免疫担当細胞である。抗菌ペプチドも広範な抗菌作用をもち自然免疫に関与している。Defensin と cathelicidin が皮膚組織に分布する二つの主要な抗菌ペプチドである。皮膚は感染に対して生理的なバリアとして働いているだけでなく、抗菌ペプチドを産生することで侵入してくる微生物を中和する。

Defensin は細菌、真菌、ウイルス侵入に対して antimicrobial activity を発揮する。ヒトにおいては 3 つの β -defensins (human β -defensins; HBDs) が知られている。

外科侵襲(手術、熱傷)により単球やリンパ球などの免疫細胞に変化が生じ、これが感染性合併症に対する抵抗性を減少させる一因となっていることが示唆されている。また、最近の研究で白血球と皮膚上皮細胞との間の interaction が免疫機能の調整、組織のホメオスターシス維持に重要であることが分かってきた (J Leukoc Biol 82: 1-15, 2007)。上皮細胞からの HBD2 産生に単球・マクロファージが必要である (J Immunol 170: 4226-36, 2003) との報告や、HBDs の産生を単球やリンパ球が増強することが報告されている (J Immunol 174: 4870-9, 2005)。さらに、好中球と上皮細胞に創傷治癒効果と抗菌作用において相乗効果があることが報告されている (J Immunol 171: 6690-6, 2003)。

このことから、外科的侵襲下において、免疫担当細胞のプロフィール変化がケラチノサイトからの BDs 産生低下の一因となっており、プロフィール変化を制御することで抗菌ペプチド産生も制御可能ではないか、と考えた。

2. 研究の目的

外科侵襲により患者の免疫能が低下し易感染状態になる。感染性合併症発症から臓器不全、死へと至る。手術部位感染症 (Surgical Site Infection: SSI) は手術患者の院内感染症頻度では最多である。SSI 発生は入院期間の延長、医療費の増大、患者の医療への満足度低下をまねく。近年、SSI への関心は高まってきている。本研究は、**1. 外科侵襲による免疫担当細胞 (単球・マクロファージ、好**

中球、リンパ球)のプロフィール変化を評価する。2. 外科侵襲による表皮ケラチノサイトからの抗菌ペプチドの産生変化を評価する。3. 免疫担当細胞と表皮ケラチノサイト間のインターアクションを検討する。4. 侵襲下の免疫担当細胞プロフィール変化を制御する戦略を開発する。5. 抗菌ペプチド産生制御による SSI 予防の戦略を開発する。

以上5項目について検討し、外科侵襲下の免疫能低下における白血球のプロフィール変化と表皮ケラチノサイト抗菌ペプチド産生能との間の相互作用の関与について解明し、それを制御する戦略を開発、周術期感染性合併症発生、死亡率の低下を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

・動物実験

熱傷モデル作成；マウスを pentobarbital (40mg/kg i. p.)で麻酔後、背部を除毛し、ガスバーナーで体表25% (4 × 5 cm)のⅢ度熱傷を負わせる。熱傷後、生理食塩水 3ml を腹腔内投与する。

研究1：外科侵襲(熱傷)による免疫担当細胞(単球・マクロファージ、好中球、リンパ球)のプロフィール変化を評価する。

熱傷後様々なタイムサイクルでイソフルラン麻酔下に血液採取を行う。採取時期は予備実験により蘇生2-4時間後、熱傷1-3日後を検討している。血液はEDTA添加シリンジに心臓穿刺で採取後、単球、好中球、リンパ球に分離し LPS または Staphylococcus aureus cell suspension (SAC)で刺激し CCL3、IL-12、CCL2、IL-10 産生能を ELISA で測定する。侵襲によるサイトカイン、ケモカイン産生プロフィールの変化を検討する。

研究2：外科侵襲による表皮ケラチノサイトからの抗菌ペプチドの産生変化を評価する。

蘇生2-4時間後、熱傷1-3日後、イソフルラン麻酔下にマウス表皮を採取しケラチノサイトを分離する。LPS または SAC で刺激しマウスβ-defensin (MBD)1-4 産生を ELISA で測定する。

研究3：免疫担当細胞と表皮ケラチノサイト間のインターアクションを検討する。

熱傷1-3日後に分離した単球、好中球、リンパ球と正常マウス表皮ケラチノサイトを dual-chamber transwell で培養する。免疫担当細胞を upper chamber に、ケラチノサイトを lower chamber に入れ、免疫担当細胞を LPS または SAC で刺激しケラチノサイトからの MBD1-4 産生を ELISA で測定する。また、免疫担当細胞のみ、ケラチノサイトのみを刺激し MBD1-4 産生を ELISA で測定する。これによりケラチノサイトから MBD 産生には免疫担当細胞との相互関係が必要であることを確認する。

研究4：侵襲下の免疫担当細胞プロフィール変化を制御する戦略を開発する。

動物実験では4種類の CCL2 inhibitor (GAH、17β-estradiol、N-terminal deletion mutant of CCL2、anti-mouse CCL2 neutralizing mAb)を投与することで侵襲下での免疫担当細胞のサイトカイン、ケモカイン産生プロフィール変化を制御可能か検討する。

研究5：抗菌ペプチド産生制御による SSI 予防の戦略を開発する。

研究4と同様に薬物投与を行い、動物実験では研究2の手法でマウス表皮を採取しケラチノサイトを分離する。LPS または SAC で刺激し MBD1-4 産生を ELISA で測定する。

・臨床研究：

研究1：外科侵襲による免疫担当細胞(単球・マクロファージ、好中球、リンパ球)のプロフィール変化を評価する。

動物実験と同様に免疫担当細胞を分離し、LPS または SAC で刺激し CCL3、IL-12、CCL2、IL-10 産生能を ELISA で測定する。侵襲によるサイトカイン、ケモカイン産生プロフィールの変化を検討する。

研究2：免疫担当細胞と表皮ケラチノサイト間のインターアクションを検討する。

分離した単球、好中球、リンパ球と正常ヒト表皮ケラチノサイト cell line (NHEK) を dual-chamber transwell で培養する。免疫担当細胞を upper chamber に、NHEK を lower chamber に入れ、免疫担当細胞を LPS または SAC で刺激し NHEK からの HBD1-3 産生を ELISA で測定する。また、免疫担当細胞のみ、NHEK のみを刺激し HBD1-3 産生を ELISA で測定する。

研究3：侵襲下の免疫担当細胞プロフィール変化を制御する戦略を開発する。

臨床研究ではレミフェンタニル (0.25-1 γ) を開胸・開腹手術患者、デクスメドミジンを人工心肺患者に投与することで侵襲下での免疫担当細胞のサイトカイン、ケモカイン産生プロフィール変化を制御可能か検討する。

研究4：抗菌ペプチド産生制御による SSI 予防の戦略を開発する。

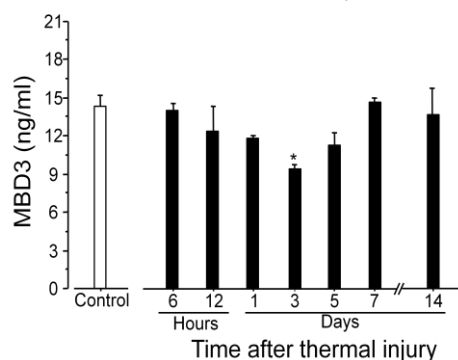
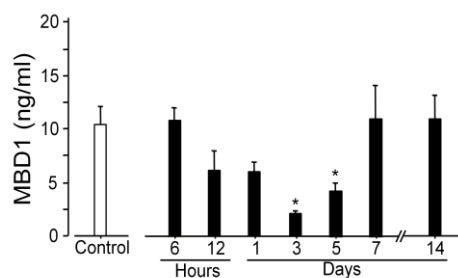
臨床研究ではレミフェンタニル (0.25-1 γ) を開胸・開腹手術患者、デクスメドミジンを人工心肺患者に投与し免疫担当細胞を分離後、研究2の手法で NHEK とともに dual-chamber transwell で培養する。免疫担当細胞を LPS または SAC で刺激し NHEK からの HBD1-3 産生を ELISA で測定する。薬物投与により抗菌ペプチド産生が制御可能か検討する。

4. 研究成果

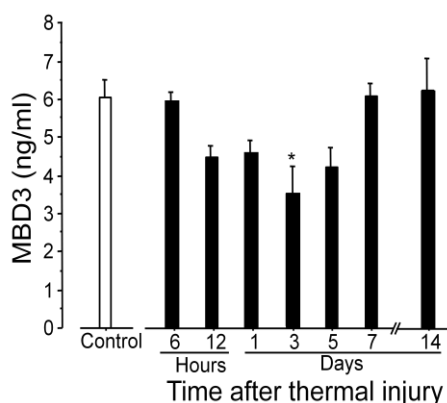
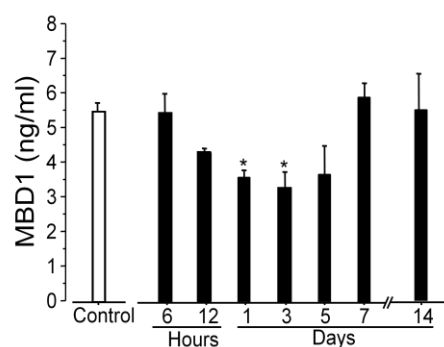
・動物実験

重症熱傷マウスの好中球は interleukin (IL)-10、CC-chemokine ligand 2 (CCL2) の産生が増加している一方で、CCL3、IL-12 の産生はコントロールマウスに比べ減少していた。

採集した好中球とケラチノサイトを共培養し LPS で刺激したところ、熱傷マウス好中球では MBD の産生が低下していた (図1)。



また、SAC で刺激した場合も熱傷マウス好中球では MBD の産生が低下していた (図2)。



現在、CCL2 inhibitor 投与による MBD 産生制御について検討中である。

・臨床研究

われわれはヒトにおいても外科侵襲下の患者の好中球で CCL3、IL-12 の産生が低下し、CCL2、IL-10 が誘導されていることを見出した(図 3)。

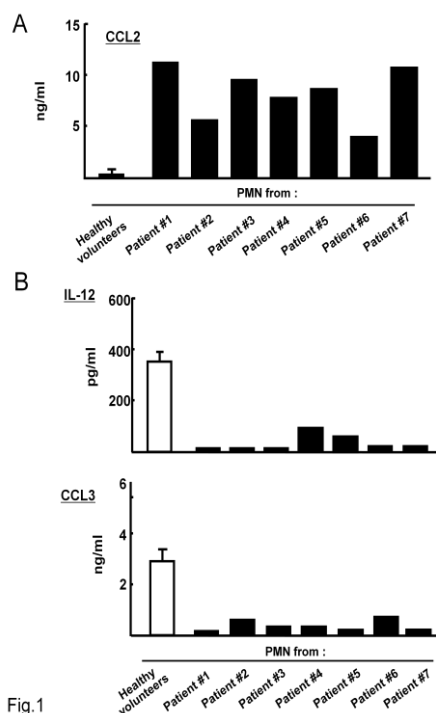
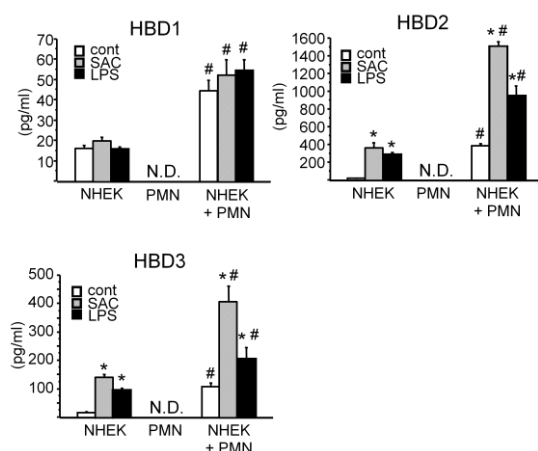


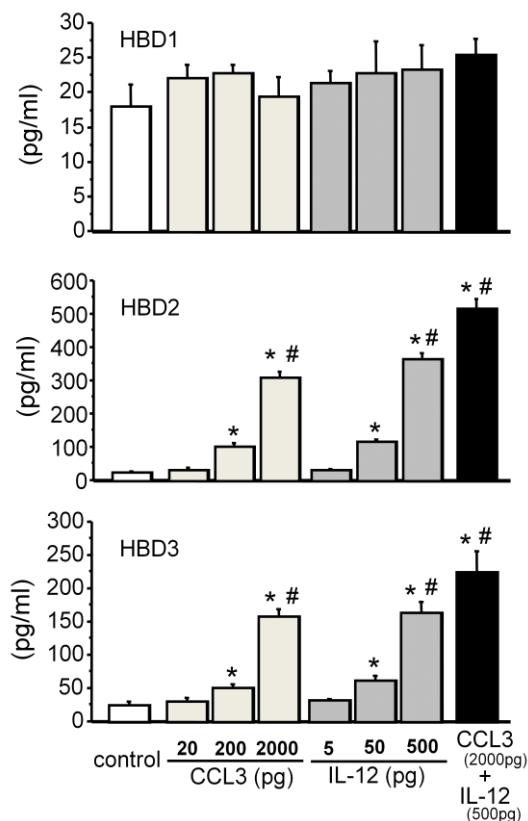
Fig.1

健常ボランティアから採取した好中球が正常ヒトケラチノサイト(NHEK)からの HBDs 産生の強力な増強効果を持つことを見出したが外科侵襲下の患者から採取した好中球には、NHEK からの HBDs 産生増強効果は認められなかった(図 4)。



CCL3、IL12 を健常ボランティアから採取した

好中球と NHEK に加えた時、HBD2、HBD3 産生は容量依存性に増加した(図 5)。



現在、レミフェンタニル、デクスメドミジンが外科侵襲下患者の好中球プロフィールに影響するか検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① 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)

② 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)

③ Kawasaki T., Okamoto K., Kawasaki C., Sata T.

Thrombomodulin improves the liver injury, coagulopathy, and mortality in an experimental heatstroke model in mic Anesth Analg 118(5):956-63, 2014 doi: 10.1213/ANE.000000000000170(査読有)

④ 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)

⑤ 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, 2013doi: 10.1097/TA.0b013e31828db978

(査読有)

[学会発表] (計2件)

① T Kawasaki, C Kawasaki, T Sata

Dexmedetomidine Suppresses inflammatory responses during Cardiac Surgery using Cardiopulmonary Bypass Shock Society 37th Annual Conference on Shock, June 7-10(6/9 発表), 2014, Charlotte, USA

② 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 貴士 (KAWASAKI, Takashi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60299633

(2) 研究分担者

岡本 好司 (OKAMOTO, Koji)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号: 50248572

佐多 竹良 (SATA, Takeyoshi)

産業医科大学・大学病院・病院長

研究者番号: 60128030