

令和元年9月4日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10978

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能からみた外科侵襲による白血球プロフィール変化の解明と制御法開発

研究課題名(英文) The role of mitochondrial function on the on the surgical stress induced immune suppression.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は、外科侵襲下の免疫担当細胞プロフィール変化とミトコンドリア機能障害との関係について検討し、それを制御する戦略を開発することである。外傷出血マウスにおいて、血液のIL-12、CCL3産生能は低下した。一方、IL-10産生能は上昇した。ミトコンドリア機能を改善するCoQ10を蘇生中に投与すると、IL-12、CCL3産生能低下が抑制され、ミトコンドリア機能を減弱させるOligomycinを投与するとIL-12産生能はさらに低下し、IL-10、CCL2産生能は増加した。ミトコンドリア機能を改善することで外科侵襲による免疫能低下を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、外科侵襲下の免疫担当細胞のプロフィール変化とミトコンドリア機能障害とのinteractionについて検討することができた。また、ミトコンドリア機能障害を抑制し白血球のプロフィール変化を制御することで、SSI発生、周術期感染性合併症発生を抑える戦略を開発できる可能性がある。ハイリスク、コンプロマイズドホストの症例増加が予想される将来にも貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the role of mitochondrial function on the surgical stress induced immune suppression. Neutrophils (PMN-) appears in association with surgical injury play a role on the increased susceptibility of patients to various infections and were known to produce IL-10 and CCL2. The production of IL-12 and CCL3 by blood from trauma-hemorrhage mice was suppressed compared to control mice. The blood from surgical mice confirmed as PMN- rich blood, because these blood produced IL-10, but not IL-12 and CCL3. CoQ10 treatment improved IL-12 and CCL3 production. Oligomycin treatment further suppressed IL-12 production and increased IL-10 and CCL2 production. These results indicate that mitochondrial function plays a role in maintain immune function and CoQ10 may be a beneficial treatment for surgical injured patients.

研究分野：麻酔科学

キーワード：外科的侵襲 免疫能 ミトコンドリア 白血球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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。ミトコンドリアは動物細胞においてエネルギー産生に重要であり、解糖系、TCA 回路、電子伝達系がエネルギーである ATP の産生経路である。われわれは以前、ミトコンドリア機能は好中球機能維持に重要であることを報告した(J Trauma 68:401-408, 2010)。また、ミトコンドリア機能は好中球のアポトーシスにも重要であることを報告した。好中球は侵入してくる微生物を貪食し生体防御に関与しているが、一方では活性化好中球はエラスターゼを放出し臓器障害を引き起こすことが知られている。好中球機能はミトコンドリア機能をコントロールすることで制御できる可能性がある。

外科侵襲(手術、熱傷)により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。好中球においても、重症熱傷マウスの好中球は interleukin(IL)-10、CC-chemokine ligand 2(CCL2)を産生することで免疫抑制作用を持ち、classically activated macrophage(M1Mφ)産生を抑制する alternatively activated macrophage(M2Mφ)を誘導することが報告されている (J Immunol 172: 1407-13, 2004, Immunity 21:215-26, 2004)。このような好中球は immunosuppressive neutrophils (PMN-) と呼ばれている。PMN- は感染に対して宿主を易感染性にする。われわれはヒトにおいても熱傷患者の好中球で PMN- が誘導されていることを報告した(Immunol Cell Biol 90:796-801, 2012)。

最近の研究で、外科侵襲時に放出される炎症性サイトカインである TNF-α は、ミトコンドリアの呼吸 (mitochondrial respiration) を障害すること、TNF 受容体を介してミトコンドリアの透過性 (permeability) 転換を促進し、ミトコンドリア内膜の透過性亢進により、ミトコンドリアの膜間スペースからシトクロム c が放出され、核に caspase-3 を活性化させ、アポトーシスを誘導することが報告されている。侵襲時に放出されるカテコラミンも小動脈収縮、毛細管低灌流、組織低酸素、細胞内アシドーシスからミトコンドリア機能障害を起こす。また、末梢血の白血球がミトコンドリアの機能障害のバイオマーカーになること (Redox Biol 2: 206-10, 2014) さらに、ミトコンドリアは単なるエネルギー産生器官ではなく、細胞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(Cell Metab 19: 757-66, 2014)。このことから、外科的侵襲下の患者において免疫担当細胞のプロフィール変化はミトコンドリア機能障害が一因となっており、ミトコンドリア機能を制御することで免疫担当細胞のプロフィール変化

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)外科侵襲によるミトコンドリア機能障害を評価する。(3)免疫担当細胞プロフィール変化とミトコンドリア機能障害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ミトコンドリア機能から制御する戦略を開発する。(5)免疫担当細胞プロフィール変化制御による SSI 予防の戦略を開発する。以上 5 項目について検討し、外科侵襲下の免疫担当細胞プロフィール変化とミトコンドリア機能障害との interaction 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：当大学の動物実験委員会の承認を得て全ての動物実験を行う。マウスは C 3 H/HeN または BALB/c mice (male, 8-10 weeks old、weighing 20-25g)を使用する。

外傷出血モデル作成；我々の以前の研究と同様にモデルを作成する。イソフルラン麻酔下にマウスを仰臥位にし、腹部正中切開を行い開腹後、縫合閉腹する。その後、両側大腿動脈にカテーテルを顕微鏡下に挿入し、一方を動脈圧モニター用、一方を血液脱血および輸液ルートとして使用する。麻酔からマウスを覚醒させ、血圧が正常(80mmHg)に回復後、脱血を開始する。脱血は 30 分かけ、総循環血液量の 60%を脱血の後、平均血圧を 35 ± 5 mmHg に 90 分間維持する。低血圧維持後、脱血量の 4 倍のリンゲル液で 30 分間かけて蘇生し血圧を正常範囲まで上昇させる。その後、カテーテルを抜去し、保温されたケージ内で飼育する。

(1) 研究 1：外科侵襲(外傷出血)による血中炎症性サイトカイン濃度変化を評価する。

蘇生 2 時間後、セボフルラン麻酔下に血液採取を行う。血液は遠心後血清を採取し、血中 IL-6、TNF-alpha、HMGB1 濃度を ELISA で測定する。侵襲による血中炎症性サイトカイン濃度の変化を検討する。

(2) 研究 2：外科侵襲(外傷出血)による免疫担当細胞のプロフィール変化を評価する。

蘇生 2 時間後、セボフルラン麻酔下に血液採取を行う。全血を培養液で 5 倍希釈し LPS または Staphylococcus aureus cell suspension (SAC)で 24 時間刺激し 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。

(3) 研究 3：ミトコンドリア機能変化により侵襲下の免疫担当細胞プロフィール変化を制御できるか検討する。

蘇生開始 15 分後に、ミトコンドリア内膜・呼吸鎖に關与する薬物；CoQ10 (40mg/kg i.p.)

ミトコンドリアの抗酸化、活性酸素除去に關与する薬物；N-acetylcystein(NAC: 150mg/kg i.p.)、の投与を行う。また、ミトコンドリア機能を deplete する薬物(Oligomycin; ATPase inhibitor 0.5mg/kg i.p.)でマウスを処理した場合、外科侵襲で免疫担当細胞のプロフィールが変化するか検討する。

(4) 研究 4：免疫担当細胞プロフィール変化とミトコンドリア機能障害間のインターアクシ

ヨンを検討する。

ミトコンドリア機能を変化させる薬物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ァイル変化を制御可能か検討する。

4. 研究成果

・動物実験

(1) 研究1：外科侵襲（外傷出血）による血中炎症性サイトカイン濃度変化を評価する。

外科的侵襲（外傷出血モデル）マウスの血中 HMGB1、IL-6 濃度は外科的侵襲のないコントロールマウスに比べ上昇していた。TNF-alpha は外科的侵襲マウス、コントロールマウス両方で検出されなかった。

(2) 研究2：外科侵襲（外傷出血）による免疫担当細胞のプロファイル変化を評価する。

外科的侵襲マウスの血液は LPS 刺激による IL-10 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。CCL2 の産生はコントロールマウスと差は認められなかった。

SAC による刺激では外科的侵襲マウスの血液は IL-10 の産生が増加していたが、CCL2、CCL3 の産生はコントロールマウスと差は認められず、IL-12 の産生は外科的侵襲マウス、コントロールマウスともに検出できなかった。

(3) 研究3：ミトコンドリア機能変化により侵襲下の免疫担当細胞プロファイル変化を制御できるか検討する。

ミトコンドリア内膜・呼吸鎖に関する薬物；CoQ10 (40mg/kg i.p.) ミトコンドリアの抗酸化、活性酸素除去に関する薬物；N-acetylcystein(NAC: 150mg/kg i.p.)、ミトコンドリア機能を deplete する薬物(Oligomycin; ATPase inhibitor 0.5mg/kg i.p.)投与を蘇生中に行い、血中 HMGB1、IL-6 濃度、LPS または SAC 刺激による IL-10、IL-12、CCL2、CCL3 産生に与える影響を検討した。血中 HMGB1、IL-6 濃度は CoQ10、NAC、Oligomycin 投与により影響を受けなかった。CoQ10 は外科的侵襲マウスにおいて LPS による IL-12 産生低下をコントロールマウスレベルまで増加させた。CCL3 産生も外科的侵襲による低下を抑制した。NAC は外科的侵襲による CCL2 産生増加を抑制した。一方、Oligomycin は外科的侵襲による IL-12 産生低下をさらに悪化させ、外科的侵襲による IL-10、CCL2 産生増加をさらに悪化させた。

(4) 研究4：免疫担当細胞プロファイル変化とミトコンドリア機能障害間のインターアクションを検討する。

これらの結果から、ミトコンドリア機能を増加または低下させる薬物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ァイル変化が制御可能であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

T Kawasaki, C Kawasaki, T Sata

Lidocaine suppresses LPS-induced dendritic cell maturation in vitro.

2016 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. Oct., 2016, Chicago, IL USA

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川崎 知佳

ローマ字氏名：KAWASAKI, Chika

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：非常勤医師

研究者番号(8桁): 60258621