

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591512

研究課題名（和文） プロテオームおよびメタボローム解析による過大侵襲時の免疫抑制機序の解明

研究課題名（英文） Evaluation of immune cell functions in patients with postoperative complications using proteome and metabolome analysis.

研究代表者

木村 文夫（FUMIO KIMURA）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70334208

研究成果の概要（和文）：

過大侵襲時の重症感染症・臓器不全発症機序を明らかにする目的で、肝胆膵外科周術期における免疫抑制機序を解析した。(1) 肝胆膵術後の合併症には多様な因子が関与するが、HTX 術後臓器不全では DAMPs が、PD 術後感染では膵外分泌機能が重要な因子と考えられた。(2) 感染例の PBMC における P2X7 や T-bet/GATA-3 比の術直後の低下は感染防御能の低下を示唆した。(3) 感染例の PBMC における術後3日以降の TLRs 発現増強は起因菌の排除に関与していると考えられた。以上の結果より、術後合併症発症における DAMPs および PAMPs シグナルの重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The role of immune cells function in pathogenesis of postoperative critical illness following major surgery was prospectively investigated. The mechanism of postoperative complications following hepato-biliary-pancreatic surgery is multifactorial. DAMPs play a major role in pathogenesis of organ dysfunction following liver resection, whereas postoperative infection depends on exocrine function of the pancreas in patients undergoing pancreatoduodenectomy. P2X7 mRNA levels and T-bet/GATA-3 ratios in PBMC significantly decrease after major surgery in patients with postoperative infection, suggesting that high expression of P2X7 and Th1 have protective effects against bacterial infection in early postoperative period. TLRs mRNA levels in PBMC increased on day 3 and afterwards. These results suggest that DAMPs and PAMPs signals play a pivotal role in pathogenesis of postoperative complications following major surgery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：外科総論、術後感染症、臓器不全

1. 研究開始当初の背景
食道癌や胆道癌に対する拡大切除術後には感染性合併症が起りやすく、重症感染症や

それに伴う多臓器不全は致命的となる。また、多発外傷や重症熱傷においても同様に、重症感染症の遷延や臓器不全が大きな問題とな

る。敗血症に対しては抗 Endotoxin 抗体や抗サイトカイン療法が開発され、多くの臨床試験が行われたが、その結果は悲観的なものだった。重症感染症と多臓器不全対策は、未だに解決されない外科領域における大きな課題である。(Ann Surg 1996;224:647-64.)

過大侵襲時の重症感染症の発症機序は多くの実験モデルで研究が進められ、自然免疫と獲得免疫の免疫担当細胞の機能変化が報告されている。好中球や Macrophage の貪食能の低下、Macrophage の type I(pro-inflammatory cytokine 産生)から type II(anti-inflammatory cytokine 産生)への変化、樹状細胞の抗原提示機能の低下、TH1/Th2 バランスの Th2 へのシフトなど、自然免疫から獲得免疫に至る多くの免疫担当細胞の機能的、質的变化が起こり、これが感染症を助長し、臓器不全を誘発すると考えられている。(J Immunol 2003;170:3263-72.) また、免疫担当細胞の機能分化は type I および type II の cytokine, chemokine により誘導され、過大侵襲時には type II の cytokine, chemokine が優位となり、SOCS や GILZ などの転写因子を介して免疫抑制状態に陥る可能性が報告されている(図 1)。(Nature Medicine 2003;9:517-524.)

一方、ヒトにおける過大侵襲時の免疫担当細胞の機能的、質的变化については不明の点が多い。ヒトを対象とした研究の多くが、方法論の問題から、断片的な報告に終わっている。我々も、これまで、肝胆膵外科領域における術後感染症・臓器不全の発症機序において、Danger signal(Endotoxin, TNF, Hsp, HMGB1)、PBMC における pro-inflammatory cytokine (TNF, IL-1)、anti-inflammatory cytokine (IL-10, IL-6)、chemokine (MCP-1, IL-8)などの Mediator の遺伝子発現、Th2 誘導転写因子(GATA-3)発現などが重要な役割を果たすことを報告してきた。(Am J Surg 2004;187:777-84.) しかし、過大侵襲時の免疫担当細胞 [Neutrophil (PMN), CD4+ Tcells, CD8+ T cells, CD19+ B cells, CD56+ NK, CD14+ Monocytes] における細胞間・細胞内シグナル伝達にどのような経時的変化が起きているのか、その詳細は殆ど知られていない(図 1, 2)。本研究では、最新の Proteomics および Metabolomics を応用して、各免疫担当細胞分画における TLR、転写因子、mRNA、蛋白、脂質 mediator 発現の網羅的な解析を行う。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究結果を踏まえ、過大侵襲時の重症感染症・臓器不全発症機序を明らかにする目的で、肝胆膵外科周術期における免疫担当細胞の動態を以下の観点か

ら解析する。

(1) 過大侵襲時の免疫担当細胞 [PMN, CD4+ Tcells, CD8+ T cells, CD19+ B cells, CD56+ NK, CD14+ monocytes] における TLR-2, TLR-4、転写因子、mRNA、および cytokine, chemokine 発現の網羅的検索による細胞間・細胞内シグナル伝達の経時的変化の解析。

(2) 過大侵襲時の PMN における脂質 Mediator の代謝経路の解析。

(3) 術後重症感染症・臓器不全に関わる新たな血中分子マーカーの検索。

3. 研究の方法

対象症例：肝切除・膵頭十二指腸切除施行症例。

方法：術前、術直後、術後 1、3、7、14 日に末梢血を採取する。下記項目を測定し、術後感染症・臓器不全合併症例と非合併例での比較検討を行う。

<PMN 及び PBMC の採取>

全血を in vitro で LPS または S. aureus 刺激を加え、培養する。刺激前・刺激後の免疫担当細胞分画 [PMN, CD4+ Tcells, CD8+ T cells, CD19+ B cells, CD56+ NK, CD14+ monocytes] を採取する。PMN 分画は leukocyte separation media

(Histopaque-1119 及び Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を用いて分離する。単核球分画 (PBMC) は Vacutainer CPT Cell Preparation Tubes (Becton & Dickinson, Bridgeport, NY, USA) で採取した検体を RosetteSep negative selection methods (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) を用いて、CD4+ Tcells, CD8+ T cells, CD19+ B cells, CD56+ NK, CD14+ monocytes の各分画を採取する。

<TLR-2, TLR-4 発現動態の解析>

免疫担当細胞分画 について PCR, FACS により TLR-2, TLR-4 発現動態を解析する。

<A2a, P2X7 発現動態の解析>

免疫担当細胞分画 について PCR により A2a (adenosine receptor), P2X7 (ATP receptor) 発現動態を解析する。

<DNA Microarray>

各分画から mRNA を選択的に抽出し (Genset oligos, Genset Corp., La Jolla, Calif., USA)、cDNA を作成する (SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit; Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif., USA)。さらに biotin 標識した cRNA を作成し (BioArray high-yield RNA transcript labeling kit, Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, N.Y., USA)、GeneChip (Human U95Av2) に hybridization し、Affimetrix scanner により画像化する。

<cytokine, chemokine 産生>

末梢血中及び各細胞分画の cell lysate および培養液中の cytokine, chemokine 濃度を TranSignal Human Cytokine Antibody Array I (Panomics, Inc., CA, USA) にて測定する。

4. 研究成果

- (1) HTX 術後感染に関する多変量解析では出血量及び IL-6 が有意な因子であった。
- (2) PD 術後感染に関する多変量解析では術後腓液量、IL-6 及び IL-8 が有意な因子であった。
- (3) HTX 術後臓器不全は血中 Hsp70 及び HMGB-1 が術直後に高値を示した ($P < 0.05$)。
- (4) P2X7, A2A mRNA は HTX, PD 術直後から増強したが、P2X7 は感染例が有意に低値を示した ($P < 0.05$)。
- (5) T-bet/GATA-3 比は術直後に感染例で有意に低値を示し、P2X7 と相関を示した ($P < 0.05$)。
- (6) TLR2, TLR4 mRNA は感染例において術後 3 日以降に高値を示した ($P < 0.05$)。

[結語]

- (1) 肝胆膵術後の合併症には多様な因子が関与するが、HTX 術後臓器不全では DAMPs が、PD 術後感染では膵外分泌機能が重要な因子と考えられた。
- (2) 感染例における P2X7 や T-bet/GATA-3 比の術直後の低下は感染防御能の低下を示唆した。
- (3) 感染例における術後 3 日以降の TLRs 発現増強は起因菌の排除に関与していると考えられた。
- (4) 術後合併症発症における DAMPs および PAMPs シグナルの重要性が示唆された。

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)

1. Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. Surg Today. 2010;40(9):793-808. (査読有)

2. Suzuki D, Furukawa K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Effects of perioperative immunonutrition on cell-mediated immunity, T helper type 1 (Th1)/Th2 differentiation, and Th17 response after pancreaticoduodenectomy. Surgery. 2010;148(3):573-81. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

第 65 回日本消化器外科学会総会(下関 2010.7.14)

パネル-6 消化器外科と術後感染症-周術期感染対策の温故知新-

肝胆膵外科領域の術後感染発症機序の解明と Immunonutrition による予防効果

木村文夫、古川勝規、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、吉富秀幸、竹内男、高屋敷史、須田浩介、高野重紹、宮崎勝

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 文夫 (KIMURA FUMIO)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70334208

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70166156
吉留 博之 (YOSHIDOME HIROYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：10312935
加藤 厚 (KATO ATSUSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：70344984
竹内 男 (TAKEUCHI DAN)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20400822
高野 重紹 (TAKANO SHIGETSUGU)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20436380
(辞退平成 23 年 3 月 31 日)