

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591755

研究課題名（和文）外科的侵襲が免疫能抑制、臓器障害をおこす機序の解明とその制御法の開発

研究課題名（英文） The mechanisms of immunosuppression and organ dysfunctions following surgical stress and its modulation.

研究代表者

川崎 貴士 (KAWASAKI TAKASHI)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60299633

研究成果の概要（和文）：

外科的侵襲による免疫能抑制、臓器障害の機序解明をおこない、それを制御する戦略を開発することが研究目的である。マウス外科的侵襲（外傷出血）モデルを用いトロンボモジュリンの効果を中心に研究を行なった。Recombinant human soluble thrombomodulin (TM)を蘇生開始時に投与したマウスでは、血中の炎症メディエーター濃度が著明に低下し、血中肝逸脱酵素濃度上昇が抑制され、肝細胞のHMGB1発現も抑制された。TM処理により外科的侵襲による肝障害発生が改善されることがわかった。TMが外科的侵襲による臓器障害予防戦略の候補として有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purposes of this study were to investigate the mechanisms of surgical stress induced immunosuppression and organ dysfunction and to develop the strategy of its regulation. After trauma-hemorrhage (T-H), plasma levels of TNF- α , IL-6, and HMGB1 increased. Plasma AST and ALT concentrations also increased after T-H. Thrombomodulin (TM) treated improved plasma cytokines and HMGB1 concentrations. Liver injury also improved. TM may be a beneficial treatment for surgical stressed patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：臨床外科

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：外科的侵襲、臓器障害、トロンボモジュリン

1. 研究開始当初の背景

医学の著しい進歩にもかかわらず、外傷、熱傷等の外科的侵襲後の死亡率は相変わら

ず高いままである。外科的侵襲が免疫能を低下させ、敗血症、多臓器不全へ発展させることは今までに多数報告されている。我々は手

術中の免疫能変化に注目し、手術侵襲により術中早期に単球・マクロファージ、好中球機能が低下することを報告し、術中早期に始まる免疫能低下に注意を払うことが、術後の感染性合併症防止に重要であることを示唆してきた。また、マウス外傷出血モデルを用いた検討では、樹状細胞機能が侵襲により低下すること、女性ホルモンであるエストロゲンが機能低下を予防することを報告した。

本研究は先ず、侵襲による臓器障害発生における免疫担当細胞の関与について、急性肺傷害と肺泡マクロファージ・好中球、肝傷害と Kupffer 細胞・好中球との関係に焦点をあて検討をおこなう。外科的侵襲後の感染に対する初期の宿主防御機能を担うのが先天性免疫であり、マクロファージ、好中球が重要な役割を持っている。これら食細胞の走化性、貪食能、殺菌能を維持もしくは増加させることが侵襲後感染性合併症発生予防に必要である一方、活性化されたマクロファージ、好中球は血管内皮細胞とともに臓器障害発生に深く関与している。侵襲により活性化されたマクロファージから炎症性サイトカインが放出され、サイトカインにより好中球が活性化し、肺、肝に集積することが知られている。活性化された好中球は組織障害をおこすプロテアーゼ、活性酸素、リン脂質代謝物質や NO などのメディエーターを放出する。また近年、DNA 結合蛋白のひとつである High-mobility group box-1 (HMGB1) が敗血症動物モデルにおいて組織障害メディエーターとして働いていることが報告されている。HMGB1 は活性化マクロファージや壊死細胞から放出され、細胞外で組織障害を引き起こす。しかし、HMGB1 が外傷・出血、熱傷において臓器障害メディエーターとして作用しているのかどうかは未だ解明されていない。本研究では、マウス外科的侵襲モデルを用いて、侵襲後の肺、肝障害に活性化マクロファージ、好中球がどのように関与しているのか、HMGB1 が臓器障害メディエーターとして作用しているのかどうか、様々な免疫学的手法を用いて検討する予定である。

近年、antimicrobial peptide が感染防御において重要な働きをしていることが解明されている。侵襲後の易感染性に antimicrobial peptide 産生低下、機能低下が関与していることが予想されるが現在のところ十分な検討がなされていない。我々は熱傷患者の好中球が上皮細胞からの antimicrobial peptide 産生を抑制することを発見した。antimicrobial peptide は pathogen の進入路である気道、肺に多く発現

することが知られており、グラム陽性菌、陰性菌、真菌、ウイルスに対し広い抗菌、抗ウイルス作用を示す。今回の研究では、侵襲により呼吸器系の antimicrobial peptide (mouse beta-defensin1-3) 発現がどのように影響されるのか検討し、その制御法を開発する予定である。

さらに、我々が近年研究を続けている脾樹状細胞機能に侵襲が与える影響についても引き続き検討を加える。すでに我々は外傷出血マウスにおいて、侵襲後、樹状細胞の成熟化が抑制され抗原提示能が低下することを報告している。今回の研究では、Natural killer dendritic cell (NKDC) に焦点をあて検討する。NKDC は NK 細胞と樹状細胞の性質を兼ね備えた細胞で、強力な IFN- γ 産生能をもち、抗腫瘍作用があることが近年報告されている。我々も熱傷マウスにおいて NKDC が減少し、NKDC が熱傷後の易感染性に関与している可能性を見出している。マウス外科的侵襲モデルにおいて NKDC がどのように変化するか、どのような方法で制御可能か検討する予定である。

今回の研究では、免疫能、臓器機能の制御候補物質として、bicalutamide の効果を検討する。Bicalutamide は androgen receptor antagonist として働き抗男性ホルモン作用を示すことが確認され、前立腺癌の治療に有効性が認められている。免疫反応には性差があることが知られており、臨床研究においても外科的侵襲に対し女性が男性に比べ予後が良いことが示されている。また、動物実験においても女性ホルモンであるエストロゲンが侵襲後の免疫能維持、臓器機能維持に働くことが報告されている。我々も樹状細胞機能をエストロゲンが維持することを報告した。一方、testosterone などの男性ホルモンには免疫能抑制作用があることが知られている。近年、抗男性ホルモンである flutamide に侵襲後の免疫能維持、臓器機能維持効果があること報告されている。bicalutamide は抗男性ホルモンとして長時間作用し、我々の予備実験においてはエストロゲンの血中濃度を長時間上昇させることが分かっており、免疫能、臓器機能の制御物質として期待できる。

さらにもうひとつの免疫能、臓器機能の制御候補物質として、トロンボモジュリン (TM) の効果を検討する。TM は血管内皮細胞上にあり血管内凝固に重要な働きをもつ膜蛋白である。TM はプロテインC活性化を介し炎症性サイトカインを抑制する。しかし、TM が外科的侵襲において免疫能維持、臓器機能維持効果をもつかは明らかではない。最近我々は、

TMがHMGB1を抑制し敗血症性肝障害を予防することを見出した。TMが外科的侵襲において免疫能維持、臓器機能維持効果をもつ可能性は高く免疫能、臓器機能の制御物質として期待できる。

我々は、免疫能、臓器機能を維持することが外科的侵襲後の合併症予防に重要と考えている。この研究により、先天性免疫を担当するマクロファージ、好中球、樹状細胞機能および antimicrobial peptide 発現を制御し、臓器不全を予防する戦略を開発したい。

2. 研究の目的

外科的侵襲が免疫能抑制、臓器障害を惹起する機序の解明をおこない、それを制御する戦略を開発し合併症の発生、死亡率の低下を図ることがこの研究の目的である。マウス外科的侵襲（外傷出血・熱傷）モデルを用いて検討し、将来、臨床応用可能な戦略を開発することが目的である。今回は bicalutamide および トロンボモジュリンの効果を中心に研究する。

3. 研究の方法

C3H/HeNまたはBALB/c mice (male, 8-10 weeks old, weighing 20-25g)を使用し、外傷出血または熱傷モデル作成後、Recombinant human soluble TM (ART-123: 1mg/kg、静注)またはBicalutamide (5mg/kg、皮下注)を蘇生開始時または熱傷直後に投与する。薬物投与しない動物には、同量の生理食塩水を注射する。血液、臓器採取；蘇生後、熱傷後様々なタイムサイクルで麻酔下に血液、臓器採取を行う。

(1) 肺

①MPO assay;好中球集積を評価する。②肺胞マクロファージによるサイトカイン産生、肺胞洗浄液中IL-1 beta、IL-8濃度測定、肺胞洗浄液中mouse beta-defensin (MBD)濃度測定をELISAを用いて行う。③肺でのHMGB1発現(免疫染色)を行う。組織をパラフィン包埋後スライスし、rat anti-mouse CD107b (mouse macrophage marker, 1:500, Serotec)を用いる。

(2) 肝

①血漿AST、ALT濃度測定；肝障害の評価のため血漿AST、ALT濃度を測定する。②Kupffer細胞によるサイトカイン産生；LPS刺激によるTNF-alpha、IL-6、IL-10の産生をELISAにて測定する。③肝でのHMGB1発現(免疫染色)肝組織でのHMGB1発現を評価するため免疫染色を肺と同様に行う。

(3) 脾

①脾樹状細胞によるサイトカイン産生；LPS刺激によるTNF-alpha、IL-6、IL-12、IL-10の産生、IL-12刺激によるIFN-gamma産生をELISAにて測定する。②脾臓でのNKDC発現；脾細胞をマウス樹状細胞マーカーであるCD11c抗体とnatural killer cellのマーカーである抗CD11b抗体、または抗CD49b抗体で二重染色し脾樹状細胞中のNKDCの割合をFACSで評価する。③樹状細胞抗原提示能；D10.G4.1 cloned helper T cell増殖をBrdUを用いてELISAで測定し、樹状細胞の抗原提示能を評価する。

4. 研究成果

外科的侵襲が免疫能抑制、臓器障害を惹起する機序の解明をおこない、それを制御する戦略を開発し、合併症の発生、死亡率の低下を図ることがこの研究の目的である。マウス外科的侵襲（外傷出血）モデルを用いて検討し、将来、臨床応用可能な戦略を開発する。本研究はトロンボモジュリン(TM)の効果を中心に研究を行なった。

C3H/HeN マウス (male, 8-10 weeks old, weighing 20-25g)を使用し外傷出血モデル作成後、Recombinant human soluble TM (ART-123: 1mg/kg、静注)を蘇生開始時に投与した。薬物投与しない動物には、同量の生理食塩水を注射した。蘇生後、様々なタイムサイクルで麻酔下に血液、臓器を採取した。

外傷出血により血中の炎症メディエーター(TNF-alpha、IL-6、HMGB1)濃度は上昇した。また、肺のMPO活性は増加し、Wet-Dry weight ratioも増加した。このことから、外傷出血により肺への好中球集積が起き、炎症を惹起していることが推測された。さらに血漿AST、ALT濃度も著明に増加し、肝障害が発生していることも明らかになった。肝細胞免疫染色による検討では、肝組織でのHMGB1発現が外傷出血後、亢進していることがわかった。TMを蘇生開始時に投与したマウスでは、血中の炎症メディエーター濃度が著明に低下し、肺MPO活性、Wet-Dry weight ratioも改善した。また、血中肝逸脱酵素濃度上昇が抑制され、肝細胞のHMGB1発現も抑制された。

本研究により、TM処理により外科的侵襲による臓器障害発生が改善されることがわかった。TMが外科的侵襲による臓器障害予防戦略の候補として有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. Obara G, Toyohira Y, Inagaki H, Takahashi K, Horishita T, Kawasaki T,

Ueno S, Tsutsui M, Sata T, Yanagihara N.
Pentazocine Inhibits Norepinephrine Transporter Function by Reducing its Surface Expression in Bovine Adrenal Medullary Cells. 査読有
J Pharmacol Sci 121(2): 138-147, 2013

2. Kawasaki T, Kawasaki C., Ueki M., Hamada K., Habe K., Sata T.
Dexmedetomidine Suppresses Proinflammatory Mediators Production in Human Whole Blood *In Vitro* 査読有
J Trauma Acute Care Surg. 74(5):1370-5, 2013 doi: 10.1097/TA.0b013e31828db978

3. Kawasaki T., Chaudry IH.
The Effects of Estrogen on Various Organs: Therapeutic Approach for Sepsis, Trauma, and Reperfusion Injury Part 1: Central Nervous System, Lung, and Heart (Review) 査読有
J Anesth 26(6):883-891, 2012
doi: 10.1007/s00540-012-1425-3.

4. Kawasaki T., Chaudry IH.
The Effects of Estrogen on Various Organs: Therapeutic Approach for Sepsis, Trauma, and Reperfusion Injury Part 2: Liver, Intestine, Spleen, and Kidney (Review) 査読有
J Anesth 26(6):892-899, 2012
doi: 10.1007/s00540-012-1426-2.

5. Kawasaki T., Nakamura K., Jeschke MG., Kogiso M., Kabayashi M., Herndon DN., Suzuki F. :
Impaired ability of burn patient neutrophils to stimulate β -defensin production by keratinocytes 査読有
Immunol Cell Biol 90(8): 796-801, 2012
doi: 10.1038/icb.2012.3

6. Kawasaki T., Sata T.
Perioperative Innate Immunity and Its Modulation (Review) 査読有
J UOEH 33(2): 123-137, 2011

7. Suzuki T., Kawasaki T., Choudhry M. A., Chaudry I.H. :
Role of PPAR γ in the salutary effects of 17 β -estradiol on kupffer cell cytokine production following trauma-hemorrhage. 査読有
J Cell Physiol 226(1): 205-211, 2011
doi: 10.1002/jcp.22327.

8. Kawasaki T., Kawasaki C., Sata T., Chaudry I.H. :
Lidocaine suppresses mouse Peyer' s patch

T cell functions and induces bacterial translocation. 査読有
Surgery 149(1): 106-113, 2011
doi: 10.1016/j.surg.2010.03.024

[学会発表] (計 9 件)

1. 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, CA. U. S. A.

2. Hamada K., Kawasaki T., Kawasaki C, Ueki M., Habe K., Sata T.
Dexmedetomidine Suppresses plasma Pentraxin3 Level during Cardiac Surgery using Cardiopulmonary Bypass
2012 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. 2012, Oct10 Washington DC, U. S. A.

3. T Kawasaki, C Kawasaki, K Okamoto, T Sata.
Neutrophils from Surgical Stressed Patients Suppress Beta-Defensin Production by Human Epidermal Keratinocyte.
7th International Shock Congress, Shock Society 35th Annual Conference on Shock, June 9-13 (6/11 発表), 2012, Miami Beach, FL. U. S. A.

4. C Kawasaki, T Kawasaki, K Okamoto, T Sata.
The Anti-inflammatory Effect of Thrombomodulin on Brain in Experimental Heat Stroke.
7th International Shock Congress, Shock Society 35th Annual Conference on Shock, June 9-13 (6/10 発表), 2012, Miami Beach, FL. U. S. A.

5. Ueki M, Kawasaki T, Kawasaki C, Hamada K, Sata T.
Dexmedetomidine Suppresses plasma HMGB1 Level during Cardiac Surgery using Cardiopulmonary Bypass
2011 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. 2011, Oct.13 Chicago, IL. U. S. A.

6. T Kawasaki, C Kawasaki, K Okamoto, T Sata.
THROMBOMODULIN IMPROVES THE LIVER INJURY IN EXPERIMENTAL HEAT STROKE
Shock Society 34th Annual Conference on

Shock, June 11-14(6/12 発表), 2011, Norfolk, VA U.S.A.

7. Kawasaki T, Kawasaki C, Ueki M, Habe K, Sata T.

Dexmedetomidine Suppresses proinflammatory Mediators Production in Human Whole Blood In Vitro

2010 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. 2010, Oct.12, San Diego, CA. U.S.A.

8. Ueki M, Kawasaki T, Sata T.

Elevation of HMGB1 Level during Cardiac Surgery using Cardiopulmonary Bypass

2010 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists. 2010, Oct. 11, San Diego, CA. U.S.A.

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

HMGB1 CONTRIBUTES TO THE DEVELOPMENT OF LIVER INJURY AFTER HEAT STROKE

Shock Society 33rd Annual Conference on Shock, June 12-15(6/13 発表), 2010, Portland, OR U.S.A.

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・准教授

研究者番号：60299633

(2) 研究分担者

岡本 好司 (OKAMOTO KOHJI)

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・医学部・教授

研究者番号：60128030

(3) 連携研究者

植木 雅也 (UEKI MASAYA)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：40534144

波部 和俊 (HABE KAZUTOSHI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：50534145

濱田 高太郎 (HAMADA KOHTARO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：70461580