

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591858

研究課題名(和文)パターン認識受容体シグナルを介した周術期免疫応答の解明と術後臓器不全対策

研究課題名(英文) Perioperative expression of pattern-recognition receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients undergoing hepatobiliary pancreatic surgery

研究代表者

木村 文夫 (Kimura, Fumio)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：70334208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：肝胆膵術後感染症・臓器不全合併症例(感染群)では、周術期のPBMCsにおけるP2X7(ATP受容体)発現が減弱し、術後TLR-2、TLR-4発現が増強していた。術前P2X7発現は術後感染の重症度と負の相関を示した。免疫担当細胞の各分画の中でCD14+ monocytesが同様の傾向を示した。また、感染群では、PBMCのT-bet(Th1)及びGATA3(Th2)発現比率(T-bet/GATA3)が対照群に比べ減弱していた。CD14+ monocytesの周術期におけるパターン認識受容体シグナルが宿主免疫能(細菌感染感受性および病原体排除能)に深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Background: The role of purinergic receptors in pathogenesis of postoperative critical illness following major surgery was prospectively investigated. Methods: Expression levels of P2X7, A2A, T-bet, and GATA-3 mRNA in peripheral blood mononuclear cells were assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction perioperatively in 49 consecutive patients who underwent major hepatobiliary pancreatic surgery. Results: P2X7 mRNA expression and P2X7/A2A ratio were significantly lower in unfavorable group ( $p < 0.05$ ) in preoperative or early postoperative period. Postoperative T-bet/GATA-3 ratio was significantly lower in unfavorable group ( $p < 0.05$ ). T-bet/GATA-3 ratio correlated significantly with P2X7 mRNA expression and P2X7/A2A ratio on POD 0 and 1 ( $p < 0.01$ ). P2X7 mRNA expression on POD 0 negatively correlated with severity of complications ( $p < 0.05$ ). Conclusions: These results suggest that P2X7 and A2A may play a pivotal role in pathogenesis of postoperative critical illness.

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：パターン認識受容体 プリン受容体 重症感染症 臓器不全

### 1. 研究開始当初の背景

過大侵襲時の重症感染症・臓器不全の発症機序とパターン認識受容体(PRRs)食道癌や胆道癌に対する拡大切除術後にはしばしば重症感染症や臓器不全を合併し、多臓器不全時には時に致命的となる。また、多発外傷や重症熱傷においても同様に、重症感染症や臓器不全の合併が大きな問題となる。過大侵襲時の重症感染症や臓器不全の発症機序は、これまで SIRS, CARS, MARS 等の液性因子の変化、好中球や Macrophage の貪食能低下、Macrophage の type I (pro-inflammatory) (M1)から type II (anti-inflammatory) (M2)への変化、樹状細胞や単球の抗原提示機能低下、Helper T (TH)1/Th2 バランスの Th2 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変化として断片的に捉えられてきた。これら免疫担当細胞の機能的変化は従来、cytokine/chemokine、抗原刺激、細胞間相互作用を介するとされてきたが(J Immunol 2003;170:3263-72.)、近年、パターン認識受容体(pattern-recognition receptors:PRRs)を介した免疫応答として包括的に理解されるに至った。

PRRs [Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)] は種々の菌体成分 pathogen-associated molecular-pattern molecules (PAMPs)のみならず、自己の障害組織由来の damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs)をも認識し、免疫担当細胞の機能制御に関与する(Clin Microbiol Rev. 2009;22:240-73.)。TLRs と NLRs はそれぞれ、細胞外・細胞内の PAMPs を認識し、MyD88 や TRIF を介して pro-inflammatory cytokine (TNF, IL-1)や IFN の産生を促進する。また、障害・壊死組織から細胞外に放出された heat shock protein (Hsp), HMGB1, 核酸, ATP 等の DAMPs は PRRs や RAGE, プリン受容体 (P2X7)を介して炎症反応を惹起する(Nature. 2010 ;464:41-2.)。過大侵襲時には PAMPs や DAMPs が大量に放出されることから、過剰免疫応答が惹起され臓器不全にいたるといった概念が提唱されている (Mol Med. 2010;16:69-82.)。PAMPs, DAMPs-PRRs シグナルとしては LPS-TLR4 シグナル(NF B, AP-1 を介する TNF, INF 産生)がすでに広く知られているが、最近では、複合蛋白 NLRP3 inflammasome の形成から caspase-1 の活性化、IL-1 及び IL-18 分泌に至る NLRP3 シグナル(Nat Rev Immunol. 2010 ;10:210-5. ) や mitochondrial DNA-TLR-9 シグナル( Cell. 2010;140 :821-32. )などが極めて重要な免疫応答として注目を集めている。

また、プリン受容体(P2X7,A2A)は細胞外に

放出された核酸代謝産物 DAMPs として認識し、免疫応答を調節する (Curr Opin Immunol. 2008 ;20:524-9. )。P2X7 は ATP を、A2A は adenosine を認識し、それぞれ炎症反応と抗炎症反応を惹起する。ATP-P2X7 シグナルは Monocyte/Macrophage において NLRP3 inflammasome の形成、caspase-1 の活性化、IL-1 産生を促進し生体防御に重要な役割を果たし、Th においては Th17 (ROR T)の分化を促す(Nat Immunol. 2009 10:241-7.)。一方、adenosine-A2A シグナルは Monocyte/Macrophage において cAMP 濃度上昇、CREB, CEBP 等の転写因子を介して、IL-10 産生を促し(M2 Macrophage)、Th においては regulatory T cells (Tregs)の分化を促進することが報告されており、共に過大侵襲時の免疫不応答の重要な因子と考えられている (Nat Rev Drug Discov. 2008 ;7:759-70.)。

このように、パターン認識受容体やプリン受容体を介した免疫応答は、従来から断片的に報告されてきた過大侵襲時の免疫担当細胞の機能異常を包括的に説明する極めて重要な概念である。しかし、その論拠の多くは動物実験モデルの結果であり、臨床データによる裏付け極めて少ないのが現状である。我々はこれまで、肝胆膵術後の臨床検体を用いて、血中 DAMPs (Hsp70 や HMGB1)濃度や PBMCs における TLRs, P2X7, A2A 等の受容体発現を検討し、術後臓器不全合併例においては血中 DAMPs 濃度の上昇(Am J Surg 2004;187:777-84.)や P2X7 受容体の持続的高発現の可能性を確認しており、DAMPs, PAMPs-PRRs シグナルやプリン受容体シグナルは臨床的にも極めて重要な役割を果たしているものと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、過大侵襲時の免疫担当細胞分画 [Neutrophil (PMN), CD4+ T cells, CD8+ T cells, CD19+ B cells, CD56+ NK, CD14+ Monocytes]について、パターン認識受容体・プリン受容体シグナルと免疫細胞の機能変化・機能異常との関係を解析し、その治療戦略を構築する。

### 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。

本研究では、過大侵襲時の免疫担当細胞の各分画 [PMN, CD4+ T cells, CD8+ T cells, CD19+ B cells, CD56+ NK, CD14+ monocytes]について、パターン認識受容体・プリン受容体シグナルと免疫細胞の機能変化・機能異常との関係を解析する。各分画について、シグナルと機能の網羅的解析を進めるとともに、

CD14+ Monocytes については TLRs, NLRP3 及びプリン受容体シグナルと M1, M2 機能を制御する転写因子 (AP-1, NF B, IRF3, CREB, CEBP $\alpha$  等) CD4+ Tcells については NLRP3 及びプリン受容体シグナルと Th1, Th2, Treg 及び Th17 への分化誘導関与する転写因子 (T-bet, GATA-3, FOXP3 及び ROR T)、Neutrophils については mitochondrial DNA-TLR-9 シグナルを中心に解析を進める。重症感染症や臓器不全の発症機序をパターン認識受容体・プリン受容体シグナルの側面から解明するとともに、その治療戦略を構築する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血漿 IL-6 及び IL-10 の周術期変化

血漿 IL-6 及び IL-10 はともに、術後感染・臓器不全発症例において、術後早期に対照群に比べ高い値を示した。(図 1)

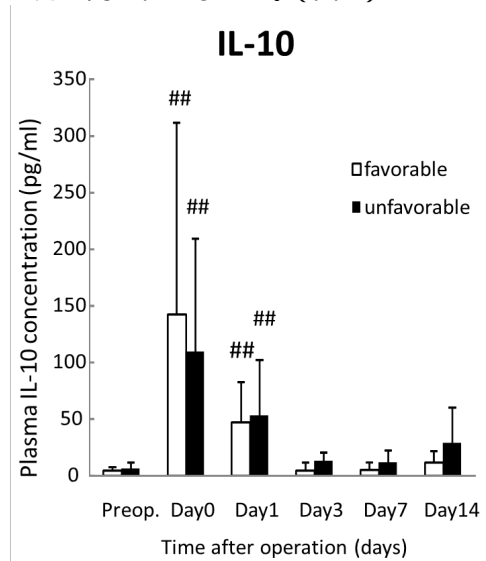


図 1A 血漿 IL-10 の周術期変化

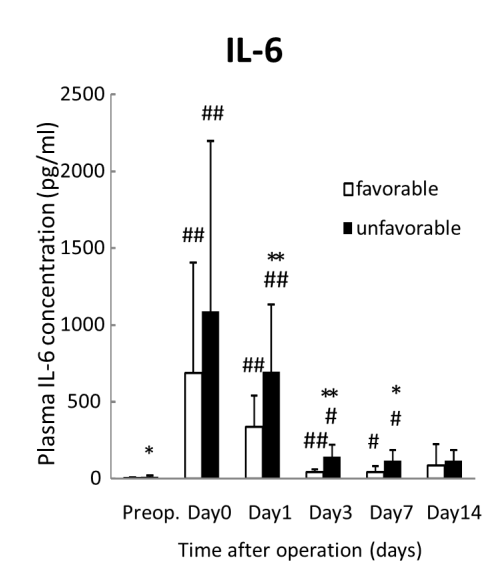


図 1B 血漿 IL-6 の周術期変化

##### (2) PBMC における TLR-2, TLR-4 発現の周術

#### 期変化

術後感染症・臓器不全合併症例 (感染群) では、PBMC の術後 TLR-2, TLR-4 発現が、対照群に比べ増強していた。

免疫担当細胞の各分画の中では CD14+ monocytes CD14+ monocytes が同様の傾向を示した。

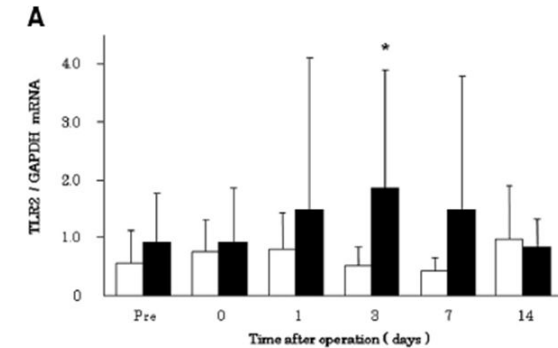


図 2A PBMC における TLR-2 発現の周術期変化

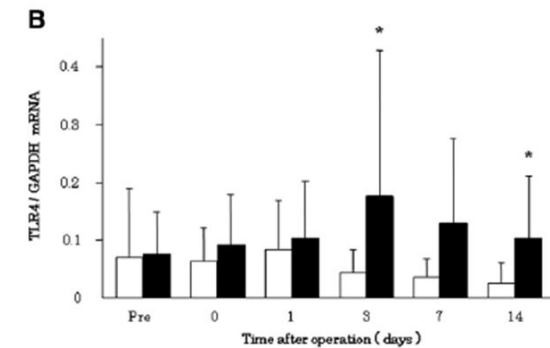


図 2B PBMC における TLR-4 発現の周術期変化

##### (3) PBMC における P2X7 (ATP 受容体) 及び A2A (Adenosine 受容体) 発現の周術期変化

術後感染症・臓器不全合併症例 (感染群) では、PBMC の術前 P2X7 (ATP 受容体) 発現が対照群に比べ減弱していた (図 3A)。一方、A2A (Adenosine 受容体) は 2 群間に差を認めなかった (図 3B)。P2X7/A2A ratio は術前・術直後に感染群が有意に低値を示した (図 3C)。

免疫担当細胞の各分画の中では CD14+ monocytes CD14+ monocytes が同様の傾向を示した。

##### (4) PBMC における T-bet(Th1) 及び GATA3(Th2) 発現の周術期変化

術後感染症・臓器不全合併症例 (感染群) では、PBMC の T-bet (Th1) 及び GATA3 (Th2) 発現比率 (T-bet/GATA3) が対照群に比べ減弱していた。(図 4) CD4+ Tcells の T-bet/GATA3 が同様の傾向を示した。

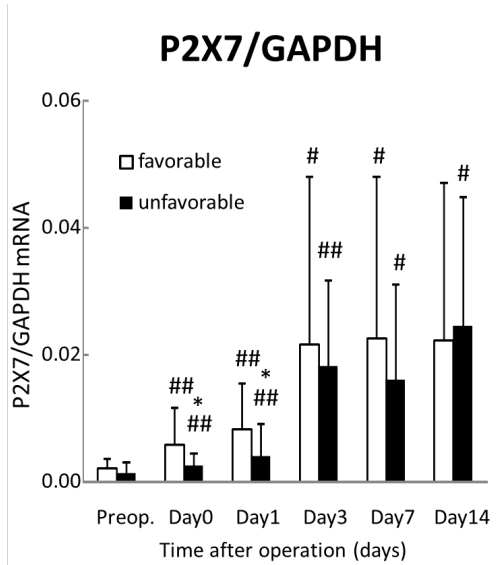


図 3A PBMC における P2X7 発現の周術期変化

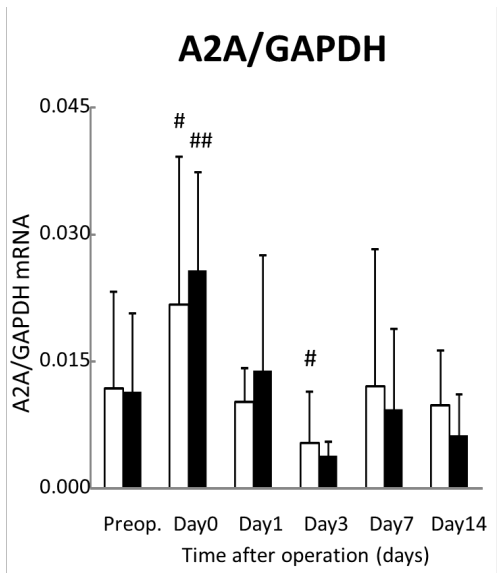


図 3B PBMC における A2A 発現の周術期変化

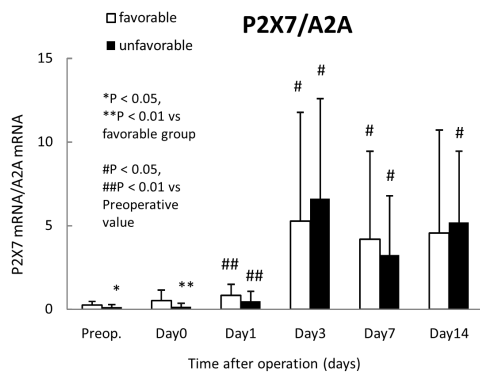


図 3C PBMC における P2X7/A2A ratio の周術期変化

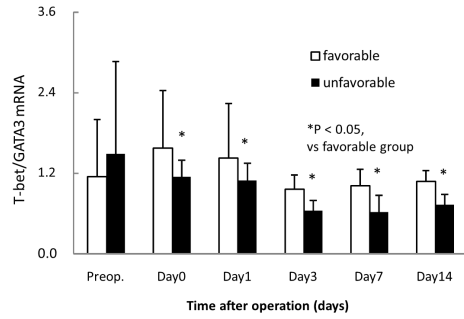


図 4 PBM における T-bet/GATA3 ratio

(5) 非感染群では周術期の CD4+ T cells の ROR T 発現が増強していた。

(6) これに対して PMN, CD8+ T cells, CD19+ B5cells, CD56+ NK については、周術期の PRRs シグナルの発現に有意な変化はなく、術後感染・臓器不全との関連は認められなかった。

以上の知見から、CD14+ monocytes の周術期におけるパターン認識受容体シグナルが宿主免疫能（細菌感染感受性および病原体排除能）に深く関与していることが示唆された。

#### 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)

高屋敷 吏, 清水 宏明, 加藤 厚, 吉留 博之, 大塚 将之, 吉富 秀幸, 古川 勝規, 竹内 男, 久保木 知, 鈴木 大亮, 中島 正之, 木村 文夫, 宮崎 勝, SSI 発症予防からみた適切な胆道癌術前胆道ドレナージ法の検討、日本外科感染症学会雑誌、査読有、9巻、2012、97-103

DOI: 201304548

Okaya T, Nakagawa K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Morita Y, Miyazaki M. The alterations in hepatic microcirculation and Kupffer cell activity after biliary drainage in jaundiced mice. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読有、Vol. 19, 2012, 397-404.

DOI: 10.1007/s00534-011-0435-0

〔学会発表〕(計 8件)

高屋敷 吏, 清水 宏明, 宮崎 勝, 他、胆管炎制御目的の経皮経肝胆道ドレナージ、第26回日本外科感染症学会総会学術集会、2013年11月25日、神戸国際会議場（神戸）

吉留 博之, 清水 宏明, 大塚 将之, 宮崎 勝, 他、一般外科医にもわかる侵襲と免疫応答 手術侵襲と炎症・免疫反応、第26回日本外科感染症学会総会学術集会、2013年11月25日、神戸国際会議

場(神戸)

古川 勝規、清水 宏明、宮崎 勝、他、感染症対策における術前 immunonutrition の有効性、第 75 回日本臨床外科学会総会、2013 年 11 月 21 日、名古屋国際会議場(名古屋)

鈴木 大亮、清水 宏明、吉留 博之、木村 文夫、宮崎 勝、他、高度侵襲手術における immunonutrition の術後早期経腸投与の有効性に関する検討、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 07 月 11 日、富山国際会議場(富山)

古川 勝規、清水 宏明、吉留 博之、木村 文夫、宮崎 勝、他、当科における膵頭十二指腸切除術に対する感染症対策のための栄養管理、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 07 月 11 日、富山国際会議場(富山)

古川 勝規、木村 文夫、清水 宏明、吉留 博之、宮崎 勝、他、侵襲に対する生体反応とその制御 免疫栄養療法におけるエイコサペンタエン酸の手術侵襲に対する生体反応の制御とその機序、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 04 月 12 日、幕張メッセ(千葉)

竹内 男、吉留 博之、木村 文夫、宮崎 勝、他、好中球機能からみた、肝胆膵領域手術症例の合併症発症予測、日本肝胆膵外科学会・学術集会、2011 年 6 月 9 日、京王プラザホテル(東京)

横山 元昭、木村 文夫、清水 宏明、吉留 博之、宮崎 勝、他、肝胆膵外科領域術後合併症における末梢血白血球 Purinergic receptor の意義、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 27 日、東京国際フォーラム(東京)震災の影響により誌上発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ho.chiba-u.ac.jp/5/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 文夫(KIMURA, Fumio)  
千葉大学・医学研究院・特任教授  
研究者番号：70334208

(2) 研究分担者

宮崎 勝(MIYAZAKI, Masaru)  
千葉大学・医学研究院・教授  
研究者番号：70166156

清水 宏明(SHIMIZU, Hiroaki)  
千葉大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：80272318

吉留 博之(YOSHIDOME, Hiroyuki)  
千葉大学・医学研究院・講師  
研究者番号：10312935  
(平成 23 年度から平成 24 年度)

高屋敷 吏(TAKAYASHIKI, Tsukasa)  
千葉大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：30456024

(3) 連携研究者

なし