

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号： 14101  
研究種目： 若手研究 (B)  
研究期間： 2011~2012  
課題番号： 23791523  
研究課題名 (和文) 術後早期白血球除去療法によるクローン病術後感染制御法の開発  
研究課題名 (英文) Early Postoperative application of extracorporeal leukocyte apheresis in patients with crohn's disease to prevent postoperative septic complications  
研究代表者  
吉山 繁幸 (YOSHIYAMA SHIGEYUKI)  
三重大学・大学院医学系研究科・リサーチアソシエイト  
研究者番号： 60444436

## 研究成果の概要 (和文)：

我々は潰瘍性大腸炎の末梢血好中球が異常に活性化された状態であり、これら異常白血球を白血球除去カラムで除去することで、過剰な好中球反応を抑制し術後手術部位感染を低下させることを報告した。また、クローン病においても同様に末梢血好中球が異常に活性化されていることを確認した。

今回、クローン病術後感染性合併症制御を目指し、周術期の好中球機能プロファイルを解析し、術後白血球除去カラムの意義を検討した。

クローン病患者の末梢血好中球と大腸菌と共培養ではアポトーシスはコントロールに比べ有意に低く、アポトーシスが抑制されている可能性が示唆された。一方、ネクローシスは有意に高かった。末梢血中好中球数とネクローシスは有意な負の相関を示した。潰瘍性大腸炎での検討では、白血球除去カラムによりアポトーシス/ネクローシス比の上昇やネクローシス低下が誘導された。白血球除去カラムはネクローシスをきたしやすい状態の好中球を除去している可能性が示唆された。潰瘍性大腸炎の好中球は、健常人と比べ、OPA1、SH3GLB1、BCL2A、BNIP2、BIRC1 などのアポトーシスを制御または抑制する遺伝子の発現が高く、Real-time PCR による validation 結果も同様であった。

以上より、IBD 周術期 LCAP 使用は、necrosis により様々な炎症メディエーターやサイトカインを放出する可能性のある好中球の割合を減少させることで、術後感染性合併症の制御に有用である可能性が示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

We previously reported that ulcerative colitis (UC) patients had excessively activated neutrophils which were less apoptotic and more necrotic by co-cultured with *Escherichia coli* (*E. coli*). Postoperative leukocyte removal therapy (leukocytapheresis: LCAP) reduced the rate of surgical site infection (SSI) in UC patients. LCAP may inhibit excessive immune response due to excessively activated neutrophils.

In this study, we examine the induction rate of viable neutrophils, apoptotic cells, necrotic cells and secondary necrotic cells after co-culture with *E. coli* to explore the functional profile of neutrophils of Crohn's disease (CD) patients.

The induction rate of apoptotic cells after co-culture with *E. coli* was significantly lower in CD patients than that of control, suggesting that neutrophils of CD patients are likely to suppress apoptosis induction when exposed by bacteria. In contrast, the induction rate of necrotic cells after co-culture with *E. coli* was significantly higher in CD patients than that of control, suggesting that neutrophils of CD patients are likely to induce necrosis when exposed by bacteria. Preoperative LCAP significantly increased the ratio of apoptosis to necrosis after co-culture with *E. coli* in UC patients. Postoperative LCAP significantly decreased the rate of necrosis after co-culture with *E. coli* in UC patients.

These results suggested that LCAP may remove the neutrophils which are likely to

induce necrosis when exposed by bacteria. The cDNA microarray analysis showed that neutrophils obtained from UC patients had significantly higher expression in apoptosis related genes such as OPA1, SH3GLB1, BCL2A, BNIP2, and BIRC1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：小腸大腸肛門外科学

## 1. 研究開始当初の背景

白血球除去療法 (leukocytapheresis: LCAP) は、血液中の活性化した白血球 (顆粒球、単球、リンパ球) をフィルターによる吸着で取り除き、炎症を抑制する治療法で、2001 年より潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) で、2010 年よりクローン病 (Crohn's Disease: CD) で保険適応となり広く用いられている。LCAP の抗炎症作用の詳細なメカニズムは不明であるが、末梢血中の炎症に関与していると考えられる白血球を除去し、骨髄から新たな好中球を動員させ生体をリセットすると考えられている。

我々のデータでも、UC 患者の末梢血好中球は健康人と比べ、大腸菌との共培養による好中球機能解析で、apoptosis 誘導の抑制と necrosis の亢進を認め、組織障害の原因となる炎症メディエーターやサイトカインを放出しやすい状態にあることを証明した。さらに、そのような状態は UC 手術後の末梢血好中球においても同様であった。

同一 UC 患者において LCAP 施行前後の好中球機能解析を行うと、LCAP 施行後の apoptosis/necrosis 比は有意に上昇し、necrosis (%) は有意に低下していた。すなわち、LCAP は非選択的な (末梢血中すべての) 白血球除去であるものの、細菌感染時に necrosis をきたしやすい状態の好中球を除去している可能性が示唆された。

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) 手術は消化管外科手術の中でも、Contaminated operation (準無菌手術) または Dirty operation (汚染手術) となることが多く大腸菌を中心とした細菌暴露の頻度が高くなり、術後感染性合併症の発症は非常に高率である。抗生剤、膿瘍ドレナージ等の一般的な治療に抵抗し敗血症、敗血症性ショックに至る例も多く、その制御は喫緊の課題である。

これまでに我々は報告してきたデータは、LCAP により潜在的な機能不全 (細菌刺激による apoptosis 抵抗性または necrosis 誘導性) 状態の好中球を除去することで過剰な

好中球反応 (免疫反応) を抑制し術後感染性合併症の発症を抑えることができる可能性を示した。実際、preliminary study であるが LCAP 施行群の術後手術部位感染 (surgical site infection: SSI) が有意に低率であることを報告した。

以上より、CD の術後感染性合併症制御を目指し、CD 周術期の好中球機能プロファイルを解析し、術後 LCAP 導入の意義を検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

今回、CD の術後感染性合併症制御を目指し、CD 周術期の好中球機能プロファイルを解析し、術後 LCAP 導入の意義を検討した。

## 3. 研究の方法

CD 患者末梢血から好中球を分離後、大腸菌と共培養し、viable neutrophil, apoptosis, necrosis, secondary necrosis の割合を Flow Cytometer (FACS) で解析し、白血球数、好中球数、CRP、末梢血中好中球エラスターゼ (neutrophil elastase: NE)、共培養時の上清中 NE との関連を検討した。

### 好中球分離

[1] 患者より採取した末梢血を PBS にて 1 : 1 に希釈する。

[2] 希釈したサンプルを Ficoll-Paque PLUS (stemcell 社) 上に重層し、600g、30 分遠心分離する。

[3] 血清、単核球、Ficoll-Paque PLUS の層を除去し、残った赤血球、好中球の層に ACK lysing buffer (stemcell 社) を加え、溶血させる。

[4] 溶血したサンプルを遠心後、PBS にて洗浄を行なう。

[5] 洗浄後のサンプルに StemSep Granulocyte Enrichment Cocktail (stemcell 社) を加え、氷上にて 30 分 incubate する。

[6] incubate したサンプルに磁気コロイドを加え、さらに氷上で 30 分 incubate する。

[7] サンプルを磁気カラムに通し (standard StemSep Protocol) 好中球をネガティブセレクションにて分離する。

### 大腸菌と分離好中球との共培養

大腸菌(ATCC25922:  $2.5 \times 10^6$  CFU/ml)と分離好中球( $2.5 \times 10^5$ /ml)を共培養し、3時間後の好中球と上清をそれぞれ用いた。

### Flow cytometry

Annexin V-FITC Apoptosis Kit (BioVision, Inc. CA, USA)を用い、大腸菌共培養後の viable neutrophil, apoptosis, necrosis, secondary necrosis の割合(%)を Flow cytometry で測定した。

### ELISA

患者末梢血中及び大腸菌共培養後上清中 Neutrophil elastase は ELISA kit (Immunodiagnostik, Bensheim, Germany)にて測定した。

### トランスクリプトーム解析

UCと健常者それぞれの好中球より RNA を抽出し、amino-allyl RNA amplification Kit (Sigma-Aldrich Japan K.K, Ishikari, Japan)にて増幅。AceGeneR Human Oligo Chip (Hitachi Software Engineering Co., Ltd)を用い、UC患者と健常人の好中球の遺伝子発現プロファイルを比較し、過剰な活性化に関する遺伝子を同定した。

## 4. 研究成果

### CD患者の好中球機能プロファイル

大腸菌と共培養後の apoptosis (%)は control に比べCDでは有意に低く( $P=0.0171$ ) (図1)、apoptosis 誘導が抑制されている可能性が示唆された。一方 necrosis (%)は有意に高く( $P=0.0296$ ) (図2)、CD患者では necrosis をきたしやすい状態である可能性が示唆された。Secondary necrosis もCDでは有意に低かった( $P=0.0281$ ) (図3)。末梢血中 NE と大腸菌と共培養後の necrosis (%)に関連はなかったが、末梢血中好中球数と necrosis (%)は有意な負の相関を示した( $r=-0.49$ ,  $P=0.0238$ ) (図4)。

図1.

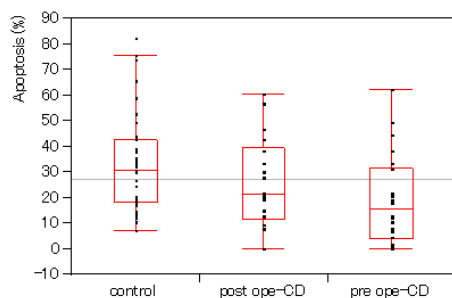


図2.

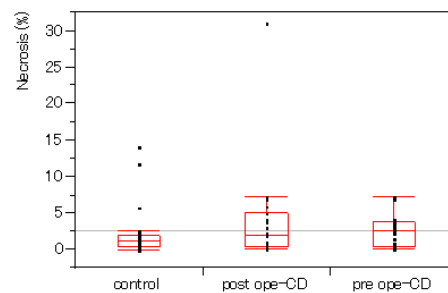


図3.

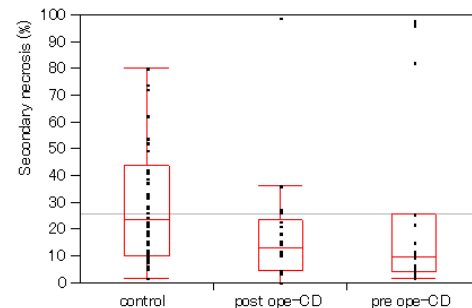
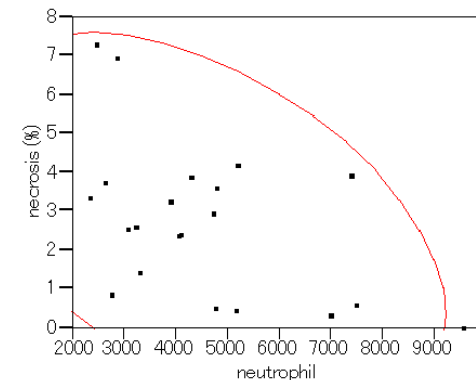
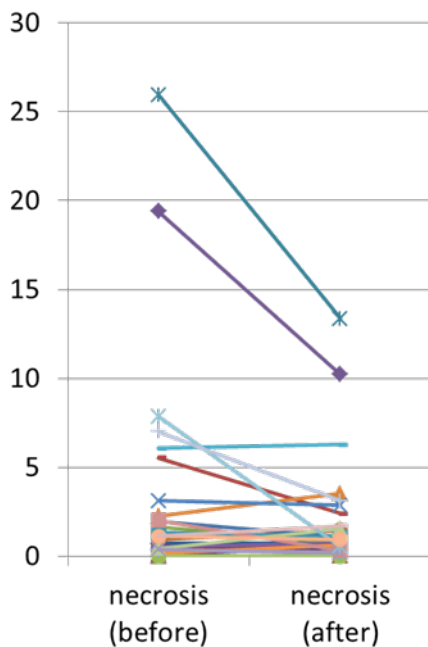
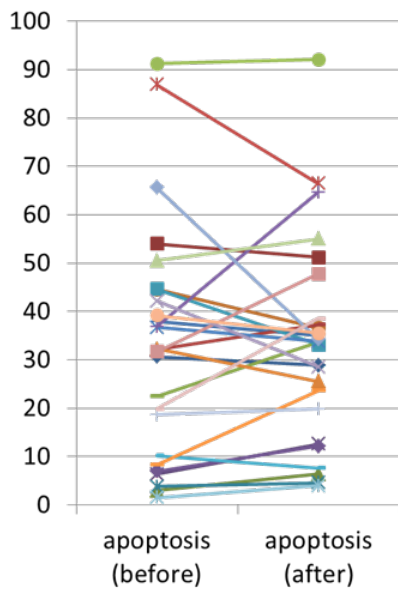


図4.



### LCAPによる好中球機能プロファイル変化

UC術前LCAP施行はapoptosis/necrosis比を有意に上昇させた(apoptosis↑、necrosis↓)。また、UC術後LCAP施行はnecrosis(%)を有意に低下させた( $P=0.0458$ )。すなわち、LCAPはnecrosisをきたしやすい好中球を除去している可能性が示唆された。



**IBD 患者の好中球トランスクリプトーム解析**  
 UC 患者の好中球は健常人と比べ、OPA1、SH3GLB1、BCL2A、BNIP2、BIRC1 などの apoptosis を制御または抑制する遺伝子の発現が高く、Real-time PCR による validation 結果も同様であった。

Gene name	Accession Number
<b>higher expression gene in UC patients</b>	
OPA1	AB011139
PROK2	AF333025
SH3GLB1	AF333025
BCL2A	NM_004049
BNIP2	NM_004330
BIRC1	NM_004536
<b>lower expression gene in UC patients</b>	
RAP1A	AB051846
SCARB1	NM_005505
GZMA	NM_006144
SIVA	NM_021709

### 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 4 件)

1. Uchida K, Yoshiyama S, Inoue M, Koike Y, Yasuda H, Fujikawa H, Okita Y, Araki T, Tanaka K, Kusunoki M. Double balloon enteroscopy for pediatric inflammatory bowel disease. *Pediatr Int.* 2012;54:806-9. (査読有り)
2. Yasuda H, Tanaka K, Okita Y, Araki T, Saigusa S, Toiyama Y, Yokoe T, Yoshiyama S, Kawamoto A, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. CD133, OCT4, and NANOG in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2011;2:1065-1071. (査読有り)
3. Okita Y, Miki C, Yoshiyama S, Otake K, Araki T, Uchida K, Kusunoki M. Neutrophil dysfunction in steroid-overdosed patients with ulcerative colitis: potential relevance of macrophage migration inhibitory factor to increased postoperative morbidity. *Surg Today.* 2011;41:1504-11. (査読有り)
4. Toiyama Y, Inoue Y, Yasuda H, Yoshiyama S, Araki T, Miki C, Kusunoki M. Hepatocellular adenoma containing hepatocellular carcinoma in a male patient with familial adenomatous polyposis coli: Report of a case. *Surg Today.* 2011;41:1442-6. (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

1. 小児期クローン病に対するダブルバルーン内視鏡施行の意義 井上 幹大, 大

- 北 喜基, 井出 正造, 橋本 清, 安田 裕美, 藤川 裕之, 小池 勇樹, 吉山 繁幸, 荒木 俊光, 内田 恵一, 楠 正人 第 54 回日本消化器病学会大会 神戸、2012/10/10-13
2. クロウン病術後再手術抑制に対するインフリキシマブ維持投与の影響 荒木 俊光, 吉山 繁幸, 大北 喜基, 藤川 裕之, 川村 幹雄, 沖上 正人, 北嶋 貴仁, 松下 航平, 大竹 耕平, 井上 幹大, 内田 恵一, 三木 誓雄, 楠 正人 第 111 回日本外科学会定期学術集会、東京、2011/4
  3. 小児潰瘍性大腸炎手術例における QOL 評価 内田 恵一, 井上 幹大, 大竹 耕平, 荒木 俊光, 吉山 繁幸, 大北 喜基, 松下 航平, 橋本 清, 田中 光司, 三木 誓雄, 楠 正人 第 111 回日本外科学会定期学術集会、東京、2011/4
  4. 単孔式内視鏡手術にて回盲部切除を施行した小児クロウン病の 1 例 井上 幹大, 内田 恵一, 大竹 耕平, 橋本 清, 松下 航平, 大北 喜基, 吉山 繁幸, 荒木 俊光, 楠 正人 第 48 回日本小児外科学会学術集会、東京、2011/7/20-22
  5. 炎症性腸疾患に対する外科治療と成績 潰瘍性大腸炎術後回腸囊不全に対する回腸囊肛門再吻合術の成績 荒木 俊光, 吉山 繁幸, 大北 喜基, 藤川 裕之, 川村 幹雄, 間山 裕二, 井上 幹大, 内田 恵一, 三木 誓雄, 楠 正人 第 66 回日本消化器外科学会総会、名古屋、2011/7/13-15
  6. クロウン病術後腹腔内膿瘍に対する経皮ドレナージの有用性 大北 喜基, 荒木 俊光, 吉山 繁幸, 井出 正造, 橋本 清, 大竹 耕平, 井上 幹大, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 66 回日本消化器外科学会総会、名古屋、2011/7/13-15
  7. クロウン病術後再発に対するインフリキシマブ維持投与の適応と予後予測因子の検討 荒木 俊光, 吉山 繁幸, 大北 喜基, 小池 勇樹, 藤川 裕之, 井上 幹大, 大井 正貴, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 66 回日本大腸肛門病学会学術集会、東京、2011/11/25-26
  8. 潰瘍性大腸炎に対する鏡視下手術の適応と現状 大北 喜基, 荒木 俊光, 廣 純一郎, 吉山 繁幸, 大井 正貴, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 66 回日本大腸肛門病学会学術集会、東京、2011/11/25-26
  9. 単孔式内視鏡手術にて手術を施行した小児クロウン病の 2 例 井出 正造, 井上 幹大, 内田 恵一, 橋本 清, 松下 航平, 小池 勇樹, 大北 喜基, 吉山 繁幸, 荒木 俊光, 楠木 正人 第 38 回日

本小児栄養消化器肝臓学会、盛岡、2011.10.8-9

10. インフリキシマブ登場後の IBD に対する手術療法 手術のタイミングとその術式 潰瘍性大腸炎術前治療薬が術後合併症に与える影響の検討 荒木 俊光, 吉山 繁幸, 大北 喜基, 藤川 裕之, 川村 幹雄, 近藤 哲, 小池 勇樹, 井上 幹大, 間山 裕二, 大井 正貴, 井上 靖浩, 田中 光司, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 73 回日本臨床外科学会総会、東京、2011/11/17-19
11. 梨状筋膿瘍を合併したクロウン病の 1 例 押 正徳, 荒木 俊光, 吉山 繁幸, 大北 喜基, 藤川 裕之, 川村 幹雄, 間山 裕二, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 第 73 回日本臨床外科学会総会、東京、2011/11/17-19
12. 小児に対する小腸ダブルバルーン内視鏡施行症例の検討 井上 幹大, 内田 恵一, 吉山 繁幸, 井出 正造, 橋本 清, 松下 航平, 安田 裕美, 小池 勇樹, 大北 喜基, 大竹 耕平, 荒木 俊光, 楠 正人 第 38 回日本小児内視鏡研究会、軽井沢、2011.7.2

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉山 繁幸 (YOSHIYAMA SHIGEYUKI)  
三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ  
アソシエイト  
研究者番号： 60444436

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：