

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20335

研究課題名(和文) Ncx KOマウスにおける腸管apoptosisの検討

研究課題名(英文) Investigating relationship between apoptosis of intestinal epithelial cells and sepsis using Ncx KO mice.

研究代表者

砂原 聡 (SUNAHARA, Satoshi)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：70568667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：病理組織学的にヒルシュスプルング病類縁疾患のモデルマウスであるNcx KOマウスの敗血症モデルは重篤化する。この結果を腸管免疫の観点から解析することを目的とした。重篤化には腸内細菌叢の異常が関与していることが示唆された。Ncx KOマウスの小腸上皮にはapoptosisの亢進およびゴブレット細胞の増加が認められ、これらも敗血症の病態に関与していると考えられた。また敗血症モデルとして盲腸結紮穿孔モデルを用いたが、より長期間観察可能な侵襲の小さいモデルとしてESMモデルの作成も試みた。その結果、Ncx KOマウスの糞便を投与したマウスは重症度が上がる傾向にあり、ESMモデルの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ncx KO mouse shows increased number of enteric neurons and is regarded as the animal model of human Hirschsprung related disease. Ncx KO mice develop severe sepsis compared to control mice after CLP procedure. We analyzed intestinal immune system and bacterial flora of the intestine. We found that dysbiosis took place in the intestine of KO mice. In addition, number of apoptotic cells and goblet cells were increased in the KO mice intestinal epithelium. We speculate that these conditions contribute to the severe outcome of the sepsis in CLP model in the KO mice. In order to observe long-term outcome of sepsis, we tried the easy stool methods (ESM) instead of CLP procedure. In ESM, feces are injected intraperitoneally to mice and this method is thought to induce less severe sepsis compared to CLP method. The mice injected with the feces from Ncx KO mice have a tendency to develop more severe sepsis compared to the mice that injected with the feces from wild type mice.

研究分野：救急集中治療医学

キーワード：Ncx KOマウス 盲腸結紮穿孔 敗血症 腸管免疫 apoptosis

## 1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞に特異的に発現しているホメオボックス遺伝子である Neural crest homeobox (Ncx) knockout (KO) マウス [1]は、その解析から、2週齢より正常マウスで見られる腸管神経細胞のアポトーシスが起らないことにより、腸管神経節数が増加し、成体では、胃から直腸までの腸管全領域で腸管神経節数が増加している。結果、一部の Ncx KO マウスでは巨大結腸症を発症し [2]、ヒトのヒルシュスプルング病類縁疾患のモデルマウスとして位置づけられている。これまで、Ncx KO マウスを用いて、腸管における神経系と免疫系のクロストークについての解明を目指し、(1) DSS 誘導腸炎モデル高感受性 (2) 小腸上皮細胞の透過性亢進 (3) 大腸上皮細胞における細胞間接着分子の発現低下 (4) 腸内細菌叢バランス異常などを明らかにしている (論文投稿中)。

一方で、敗血症では腸管上皮細胞の apoptosis が亢進するという報告があり、腸管免疫は敗血症の病態において重要な役割を担っている。Bcl-2 を過剰発現するトランスジェニックマウスで腸管の apoptosis を抑制すると、緑膿菌肺炎によるマウス敗血症モデルで死亡率がコントロールに比し改善したという報告 [3]をはじめ、マウス Cecal ligation and puncture (盲腸結紮穿孔; CLP) 腹膜炎敗血症モデルで、腸管の apoptosis の亢進、絨毛の障害が認められ、これを epidermal growth factor (EGF) によりコントロールすることで生存率が改善したという報告 [4]さらに、緑膿菌肺炎モデルでも同様の結果 [5]が報告されており、腸管の apoptosis のコントロールが敗血症の病態改善に有効であると考えられている。また、重症敗血症患者の消化管機能は低下していることが多く、腸管粘膜透過性の亢進や蠕動低下が認められる。経腸栄養によって消化管を刺激することにより、腸管機能が維持されバクテリアルトランスロケーションを防ぐという報告 [6]もあり、敗血症の病態に、腸管が重要な役割を担っていることは間違いない。しかし、そのメカニズムは十分に解明されておらず、申請者は敗血症病態において特に腸管バリア機能が重要であると考えた。

また、腸内細菌叢と敗血症の関わりについても報告がある。腸内細菌叢は、直接的にはバクテリアルトランスロケーションに関与するほか、TLR signaling を介して腸管上皮細胞を刺激し interleukin-6 (IL-6) や cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) を産生するとされる。さらにこの腸内細菌叢による TLR signaling には核内因子 B (nuclear factor- $\kappa$ B: NF- $\kappa$ B) が関与しており、炎症を誘導するとともに局所の抗 apoptosis 効果も指摘されている。また、同経路で細胞

保護蛋白である HSP (heat shock protein) 25, HSP72 などが産生される [7] とされ、腸内細菌叢バランス異常はこれらの免疫機構を破綻させ、敗血症の病態を悪化させると考えられる。

我々は、CLP モデルマウスを用いて敗血症の病態解明について研究・発表を行ってきた [8, 9, 10]。そこで腸管バリア機能に異常の認められる遺伝子組換えマウスを用いて CLP による敗血症モデルを作製し敗血症病態と腸管バリア機能の関わりを明らかにすることを考えた。これらを踏まえて、本研究の予備実験として、野生型 C57BL/6 マウス (WT マウス) と Ncx KO マウス (腸管神経過剰であるが巨大結腸症を発症しない系統) に CLP を施行し、survival study を行ったところ、Ncx KO マウスは有意差をもって早期に死亡するという結果を得た。

## 2. 研究の目的

(1) 腸管神経過剰が腸管上皮細胞の機能に与える影響について: Ncx KO マウスにおける CLP モデルでは重篤化するという結果をうけ、敗血症における、腸管神経が与える腸管バリア機能の役割について検討する。Ncx KO および WT マウスの小腸における apoptosis の検討、さらにマウス CLP モデルの小腸における組織学的検討を行い、敗血症の病態と密接に関係すると考えられる腸管炎症の評価を行う。

(2) easy stool method (ESM) モデルの作製と有用性について: Ncx KO マウスの CLP モデルでは、CLP 施行から 24 時間以内に死亡する個体が認められたため、より侵襲の小さいモデルとして、ESM モデルを WT マウスで作成し、実験モデルとしての有用性を検討する。

(3) ESM モデルを用いた、腸内細菌叢バランス異常と敗血症の病態悪化の関係について: 敗血症の病態悪化に腸内細菌叢のバランス異常が関与するか検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) CLP モデルの作成

5%イソフルレンで全身麻酔導入し、2%イソフルレンで全身麻酔を維持した。まず、腹部正中小切開にて開腹し、盲腸を腹腔内から挙上した。そして、腸内容を盲腸先端まで圧搾した後回腸から大腸への便通を妨げないように盲腸根部を 3-0 絹糸で結紮した。結果として緊満している盲腸を、22 ゲージ注射針で 2 回穿刺した。その後、その穿孔された盲腸をさらに圧搾し便を少量各孔から搾り出した。そのまま、盲腸を腹腔内に擦れ無きよう環納し 2 層に閉腹した。コントロールには、盲腸の結紮穿孔以外は全て同じ処置を行う単開腹 (Sham) モデ

ルを使用した。腸管の採取は、敗血症急性期の評価を想定し、CLP 施行から 6 時間および 24 時間で行った。

### (2) 組織学的解析

CLP および sham を施行した Ncx KO マウスおよび WT マウス(6hrs, 24hrs), 手術を施行していない Ncx KO マウスおよび WT マウスの小腸腸管組織について、4% PFA 固定後、アルコール脱水・キシレン透徹を行い、パラフィン包埋サンプルを作製した。ミクロトームにて 5um の切片を作製し、HE および TUNEL 染色を行い、炎症像やアポトーシスについて評価を行った。TUNEL 染色には、MEBSRAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct(MBL)を用いた。

### (3) ESM モデル

#### 予備実験 1

WT マウスから、直腸便を採取し、PBS を用いて約 0.1g/ml に調整し、ボルテックス後 500G にて 5 分遠心し、上清を回収した。分光光度計にて、OD600 時における濁度を 0.15 に調整した。調整便を 300ul 計測し、WT マウスに腹腔内注射を行った。これらのマウスを観察し、侵襲後の活動性によって重症度を評価するために、以下に示すような disease activity score (DAS)を設定し、経時的にスコアリングした。

#### 【disease activity score】

- 0 点：元気に動き回る
- 1 点：無動だがケージを揺らすと動く
- 2 点：ケージを動かしても無動
- 3 点：うずくまっている状態
- 4 点：瀕死の状態
- 5 点：死亡

#### 予備実験 2

Ncx-KO および WT マウスの腸内細菌叢を比較するため、MacConky 培地を用いて評価した。Ncx-KO マウスおよび WT マウス (n=4, 5 週齢)の直腸便を採取し、PBS にて希釈後、MacConky 培地に塗布した。24 時間 37 °C にて培養後、出現コロニー数のカウントを行った。

#### 本実験

Ncx KO マウスおよび WT マウスそれぞれから採取した直腸便を、PBS を用いて 0.15 OD600 に調整した。WT マウス(11 週齢)に対し、調整便をそれぞれ 300ul ずつ、腹腔内に投与した(Ncx-KO マウス便 4 匹、WT マウス便 4 匹)。これらのマウスの DSA を経時的にスコアリングした。

また、便投与から 45 時間経過して生存していたマウスは、安楽死させ、血清を採取した。そして、その血清を用いて、細胞免疫にかかわる各種サイトカイン (IL-6, IL-10, IL-12, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , MCP-1) について、flex キット(BD)を用いてフローサイトメトリー法により、血中濃度測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 腸管神経過剰が腸管上皮細胞の機能に与える影響について

Ncx KO マウスの腸管上皮細胞における apoptosis の評価

手術を施行していない Ncx KO マウスおよび WT マウスの小腸に TUNEL 染色を行い、小腸上皮細胞の apoptosis を評価した。その結果、Ncx KO マウスの小腸では、WT マウスのそれに比し、apoptosis が亢進している傾向を認めた。

Ncx KO マウスによる CLP モデルの HE 染色による評価

WT sham 6hrs : 異常なし

WT sham 24hrs : 異常なし

WT CLP 6hrs : ゴブレット細胞の増加

WT CLP 24hrs : 異常なし

Ncx-KO sham 6hrs : ゴブレット細胞の増加

Ncx-KO sham 24hrs : サンプル不良により解析不可

Ncx-KO CLP 6hrs : ゴブレット細胞の増加

Ncx-KO CLP 24hrs : ゴブレット細胞の増加、管腔内出血

以上の結果から、Ncx KO マウスの小腸上皮細胞では、apoptosis が亢進していた。survival study において Ncx KO マウスの CLP モデルが WT マウスのそれに比し予後が悪かったことと apoptosis の亢進は関連性があるかもしれない。一方、HE 染色では、WT マウスにおいて、CLP 6hrs でゴブレット細胞の増加を認めたが 24hrs では異常を認めなかった。それに対し、Ncx KO マウスでは CLP 6hrs でゴブレット細胞の増加を認め、24hrs ではさらに管腔内出血を認めた。この結果より、Ncx KO マウスの CLP モデルでは、腸管上皮の傷害が悪化する傾向にあるといえる。この結果も、survival study の結果に矛盾しない。

ゴブレット細胞は粘液の主成分であるムチンを多量に産生し分泌することにより腸の粘膜をおおう粘液の恒常性を維持し、腸管上皮細胞への腸内細菌の侵入を防ぐとされる。Ncx KO マウスにおける CLP モデルの小腸上皮細胞で認められた apoptosis の亢進やゴブレット細胞の増加が、Ncx KO マウスに特異的なものであるのか、それとも、より強い腸管傷害に対する防御機構として発現しているものなのかは、更なる検討を行い、明らかにする必要がある。

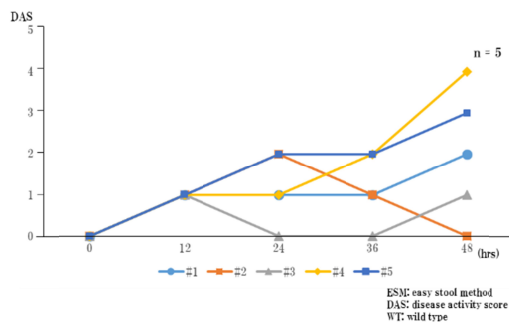
### (2) easy stool method (ESM)モデルの作製とその有用性について

予備実験 1 の結果

DAS は図 1 のように推移した。

5 例中 3 例で経時的に DAS が悪化した。また、5 例中 1 例では、24 時間までは経時的に悪化した。その後回復した。

(図1) WT マウスの ESM モデルにおける DAS の経時的变化 (WT マウスの糞便を投与)



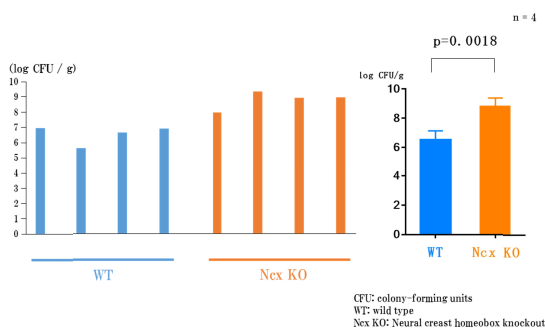
この ESM モデルの経時的な重症度の変化に、一定の傾向が認められたため、敗血症モデルとして評価に値すると判断した。また、Ncx KO マウスではさらに病態が重篤化すると予想された。

(3) ESM モデルを用いた腸内細菌叢バランス異常と敗血症悪化の関係の評価

予備実験 2 の結果

図 2 に示すように、Ncx KO マウスの糞便の log CFU は WT マウスの糞便のそれに比し、有意に値が大きく、Ncx KO マウスは腸内細菌叢のバランス異常が大きいと考えられた。

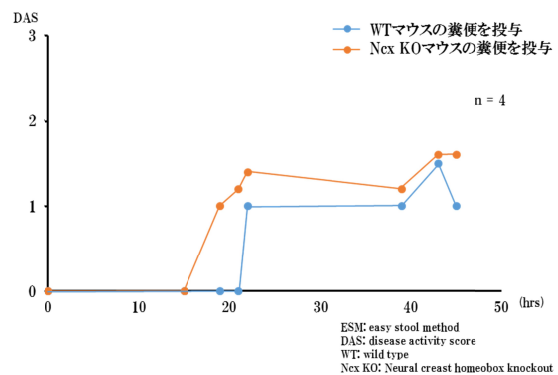
(図 2) Ncx KO マウスおよび WT マウスの糞便培養における MacConkey Corony Counting



本実験の結果

図 3 に示すように糞便投与 15 時間後までは Ncx KO マウス糞便投与モデル群および WT マウス糞便投与モデル群の双方ともすべて DAS 0 であったが、19-21 時間後では有意に Ncx KO マウスにおいて DAS 平均値が高かった。一方、22 時間後以降では、両群で有意差を認めなかった。

(図 3) Ncx KO マウスおよび WT マウスの糞便を投与した ESM モデルマウスにおける DAS (平均値) の経時的变化



各種サイトカイン血中濃度測定に関しては、いずれのサイトカイン血中濃度においても両群に有意差を認めなかった。

Ncx KO マウスと WT マウスの糞便を用いた ESM モデルを作成し、経時的に DAS を付けた結果、Ncx KO マウスの糞便を用いたモデルの方が一定期間ではあるが DAS が高くなる傾向にあった。以上の結果から、Ncx KO マウスの糞便は WT マウスのそれに比べ、腹腔内投与した際に敗血症が重篤化する可能性が示唆された。すなわち、Ncx KO マウスの敗血症が重篤化する一因として、腸管細菌叢の異常が関与していると考えられる。

一方で、本実験では ESM 施行から 45 時間経過して、DAS 3 点以上となる個体はなかった。さらに、これらのマウスの血清の炎症サイトカイン濃度を測定したところ、2 群間に有意差はなかった。今後、Ncx KO マウスの ESM モデルで敗血症の評価をするためには、作成方法を見直すべきであると考えられる。具体的には、より侵襲度を高くし、重篤化させつつ一定期間はマウスが生存するというモデルを作り上げる方法を模索する必要がある。

・総括

腸管神経が過剰に発現している Ncx KO マウスの敗血症モデルが重篤化する原因として、腸内細菌叢の異常が関与していることが示唆された。また、apoptosis および小腸のゴブレット細胞の増加も敗血症の病態に関与していると考えられた。

【引用文献】

- [1]. Hatano M, Aoki T, Dezawa M, Yusa S, Iitsuka Y, Koseki H, Taniguchi M, Tokuhisa T. A novel pathogenesis of megacolon in Ncx/Hox11L.1 deficient mice. J Clin Invest. 1997;100:795-80.
- [2]. 1. Hatano M, Iitsuka Y, Yamamoto H, Dezawa M, Yusa S, Kohno Y, Tokuhisa T.

Ncx, a Hox11 related gene, is expressed in a variety of tissues derived from neural crest cells. *anat. embryo*, 1997; 195(5):419-25.

[3]. Coopersmith CM, Stromberg PE, Dunne WM, Davis CG, Amiot DM, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA*. 2002;287:1716-21.

[4]. Clark JA, Clark AT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Coopersmith CM. Epidermal growth factor treatment decreases mortality and is associated with improved gut integrity in sepsis. *Shock*. 2008;30:36-42.

[5]. Dominguez JA, Vithayathil PJ, Khailova L, Lawrance CP, Samocha AJ, Jung E, Leathersich AM, Dunne WM, Coopersmith CM. Epidermal growth factor improves survival and prevents intestinal injury in a murine model of pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Shock*. 2011;36:381-9.

[6]. Elke G, Schädler D, Engel C, Bogatsch H, Frerichs I, Ragaller M, Scholz J, Brunkhorst FM, Löffler M, Reinhart K, Weiler N; German Competence Network Sepsis (SepNet). Current practice in nutritional support and its association with mortality in septic patients--results from a national, prospective, multicenter study. *Crit Care Med*. 2008;36:762-7.

[7]. Rakoff-Nahoum S et al; Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118:229-241.

[8]. Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhisa T, Oda S, Hatano M. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care* 2013;17:R160.

[9]. Setoguchi D, Yatsuki H, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Watanabe E, Tateishi Y, Oda S. Effects of a peripheral cholinesterase inhibitor on cytokine production and autonomic nervous activity in a rat model of sepsis. *Cytokine*. 2012 ;57:238-44.

[10]. Setoguchi D, Nakamura M, Yatsuki H, Watanabe E, Tateishi Y, Kuwaki T, Oda S. Experimental examination of anti-inflammatory effects of a 5-HT3 receptor antagonist, tropisetron, and concomitant effects on autonomic nervous function in a rat sepsis model.

*Int Immunopharmacol*. 2011;11:2073-8.

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

砂原 聡 (SUNAHARA, Satoshi)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教  
研究者番号: 70568667

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

渡邊 栄三 (WATANABE, Eizo)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 40375639

織田 成人 (ODA, Shigeto)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 90204205

幡野 雅彦 (HATANO, Masahiko)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 20208523