

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11508

研究課題名(和文) 腸管壁内の生体内微小循環解析からみた壊死性腸炎の病態解明と治療戦略

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis and treatment strategy for necrotizing colitis by realtime observation of intestinal microcirculation

研究代表者

小池 勇樹 (Koike, Yuhki)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10555551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Remote ischemic conditioning(RIC)の手技を行った壊死性腸炎マウスでは、二光子レーザー顕微鏡による生体内観察において、その小腸壁内における循環不全に改善がみられた。さらにRIC手技を追加した壊死性腸炎モデルは、コントロールモデルと比べて、H&E染色による病理組織学的評価において、小腸粘膜の傷害程度に改善が有意にみられていた。そのRICの壊死性腸炎に対する予防的・治療的效果のメカニズムとして、蛍光免疫染色法により、H₂Sを産生する酵素の発現が、RIC付加の壊死性腸炎モデルにおいて、コントロール群と比べ有意差をもって上昇がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Remote ischemic conditioning(RIC)という心臓血管外科領域では臨床研究がなされ、その有効性が報告されている手法は、壊死性腸炎モデルにおいても、腸管の微小循環を改善し、予防的・治療的效果がみられることが、実証された。この実験結果は、病態モデルマウスの生体内観察において確認されているため、実臨床へのトランスレーショナル・リサーチとしても、有益性の高いものであり、またRIC自体は患者への侵襲はほとんどないため、臨床応用が十分期待できる研究結果となった。

研究成果の概要(英文)：Remote ischemic conditioning (RIC) ameliorated intestinal injury in necrotizing enterocolitis mice model through the improvement of intestinal microcirculation which was analyzed by intravital observation of small intestine by using multi-photon laser scanning microscopy. These preventive and treatment effects could be induced by the increase of hydrogen sulfate production in injured small intestine.

研究分野：小児外科

キーワード：壊死性腸炎 腸管微小循環 多光子レーザー顕微鏡 生体内観察

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年わが国においては、低出生体重児の発生率が年々上昇しており、それに伴い低出生体重児における新生児管理と強い影響があるとされる壊死性腸炎（**Necrotizing Enterocolitis:NEC** 以下 **NEC** と略す）の発生率が、本邦のみでなく世界中で急増している。しかし、近年の新生児医療の管理技術や医療器具の発展にも関わらず、**NEC** を発症した患児の致死率・合併症率は依然として高いままである。現在、**NEC** の病態究明に関して、多くの研究・報告がされているが、いずれも実際の臨床における治癒率の上昇までを期待できるトランスレーショナルリサーチはなされていない。わが国における出生率低下やそれに伴う人口減少・超高齢化社会・少子化問題においても、その発生率・死亡率を減少させる研究が、急務である。また一旦、**NEC** を発症した患児は、高度かつ高額な医療を要することから、発症を未然に防ぐ、もしくは病状を緩和可能な予防法や治療法は、医療経済の面からみても、急務である。主に心臓外科の分野で発展してきた **Remote ischemic conditioning (RIC)** という手法を用い、さらに研究代表者が有する 2 光子レーザー顕微鏡の生体内観察手技の技術を有効活用して、壊死性腸炎の発生機序だけでなく、**RIC** の作用効果とそのメカニズムに至るまでを明らかにするのが、本研究の骨子である。

2. 研究の目的

本研究は、**Remote ischemic conditioning(RIC)** という心臓血管外科領域では臨床研究がなされ、その有効性が報告されている手法を、壊死性腸炎モデルに適用し、その効果判定を分子生物学的アプローチだけでなく、二光子レーザー顕微鏡を用いた新生児マウスの腸管内微小循環の生体内観察と解析を併せることで、壊死性腸炎の発生機序だけでなく、**RIC** の作用効果とそのメカニズムに至るまでを明らかにする。これにより、**RIC** の壊死性腸炎に対する有効性を証明することと、**RIC** 自体は駆血帯を巻いて血圧を凶る行為と同等のため、患児に対する侵襲性はないものに等しいため、実臨床への還元し、壊死性腸炎患児のリスクを減少させることが目的である。

3. 研究の方法

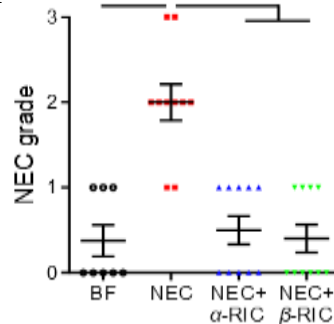
本研究は、**NEC** モデルマウスを用いて疾患特有の障害領域である小腸（特に回腸末端）の組織サンプルを用いて、**Remote ischemic conditioning (RIC)** の有無により、粘膜障害や炎症レベル、酸化ストレスレベルなどが、どのように変化しているかを分子生物学的アプローチ[病理組織学的（**H&E** 染色や免疫染色）、リアルタイム PCR、**ELISA**, **Western blotting** など]で、実験を行う。またこれと平行して、障害領域の小腸壁内微小循環の変化をリアルタイムイメージとして二光子レーザー顕微鏡にて観察し、且つ **RIC** による微小循環への影響も併せて解析する。これにより **NEC** の微小循環不全の発症機序を明らかにするだけでなく、**RIC** によるその予防効果・治療効果を経時的に同一個体で判定することを可能とするものである。

4. 研究成果

新生児 **NEC** モデルの作成と二光子レーザー顕微鏡を用いた新生児マウスの小腸微小循環の生体内観察を確立した。本年度は、正常マウスと **NEC** モデルマウスとの比較を行い、**NEC** モデルマウスは作成よりおよそ 3 日後から小腸壁内の微小循環不全が発生し、腸管障害も生後 7 日目以降に顕著化し、粘膜障害が絨毛の先端から進行することが判明した。具体的には壊死性腸炎モデルでは、正常マウスと比べて、絨毛へ循環する直前の粘膜下の動脈領域において、その血流速度や血管径、血流量が減少していた。一方で、**RIC** の手技(壊死性腸

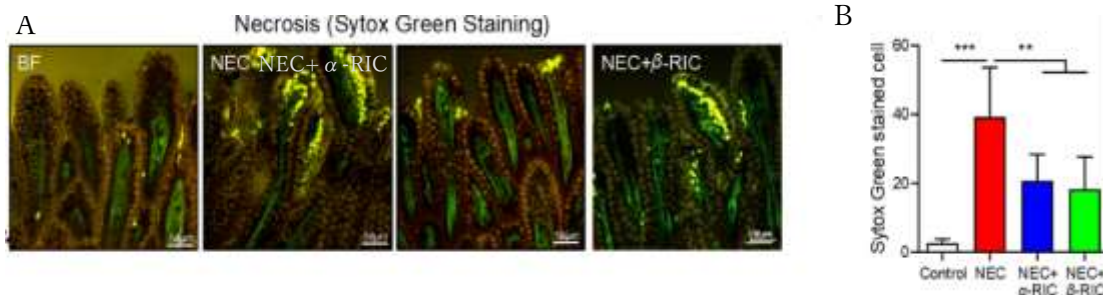
炎モデル作成直前より RIC 手技を付加する α RIC[予防目的]と、壊死性腸炎モデル作成途中から RIC 手技を付加する β RIC[治療目的]を付加した壊死性腸炎マウスでは、二光子レーザー顕微鏡による生体内観察において、その小腸壁内における循環不全に改善がみられた。さらに RIC 手技を追加した壊死性腸炎モデルは、壊死性腸炎モデルと比べて、H&E 染色による病理組織学的評価において、小腸粘膜の傷害程度に改善が有意にみられていた (Figure1)。

Figure 1



さらに Sytox green staining を用いて回腸の絨毛レベルでの壊死細胞の局在を確認すると、

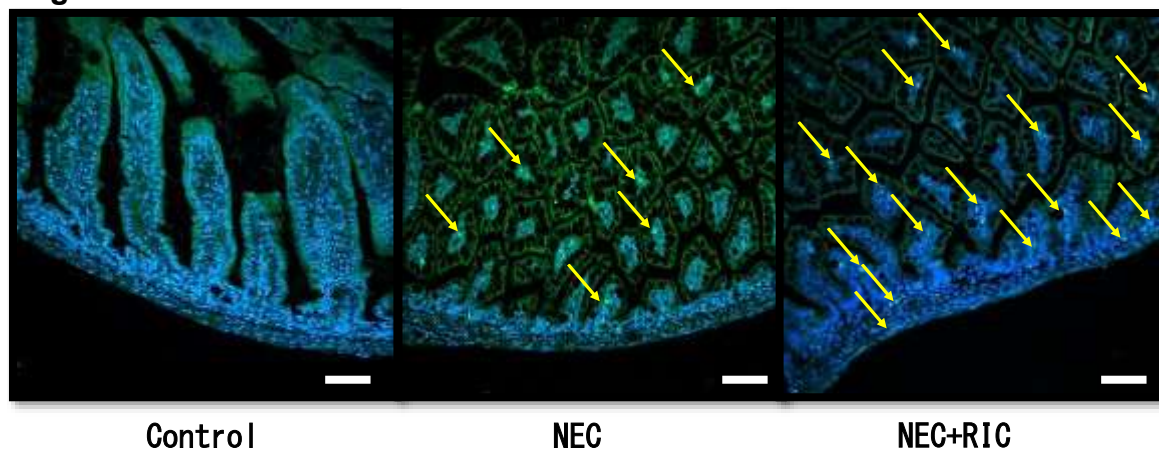
Figure 2



NEC モデルでは、腸管壊死が絨毛の先端より発生していることが判明し、RIC 付加により、その壊死細胞の数は減少していることが判明した(Figure 2, A&B)

またその RIC の壊死性腸炎の予防的・治療的効果のメカニズムを確認するため、二光子レーザー顕微鏡による各群 (正常マウス・壊死性腸炎マウス・RIC 付加壊死性腸炎マウス) の観察終了後に、各種臓器(脳・心臓・肺・肝臓・脾臓・小腸・大腸・腎臓)を摘出し、蛍光免疫染色による検討を行った。これにより、ガストランスミッターの一つである H_2S を産生する酵素(CBS)の発現が、RIC 付加の壊死性腸炎モデルにおいて、他の群と比べ心臓と小腸のみにおいて有意差をもって上昇がみられた(Figure 3)。

Figure 3



H_2S は、微小血管の拡張作用により循環改善作用が知られており、RIC により壊死性腸炎モデルマウスの小腸壁内の微小循環が改善した一つのメカニズムが明らかとなった。以上より、NEC モデルマウスの絨毛へのダメージは、RIC 付加によって H_2S 産生が増加し、これにより傷害を受けた小腸における微小循環が改善することで、治療効果がみられる

という一つのメカニズムが証明された。

RIC 手技自体はマンシエットを上肢または下肢に巻いて血圧測定を行う行為の延長であり、侵襲としてはほとんどないような手技であり、壊死性腸炎を発生するリスクのある患児や、壊死性腸炎発症直後の患児において、有効な予防的・治療的効果が期待できる手技であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koike Yuhki, Li Bo, Chen Yong, Miyake Hiromu, Lee Carol, Chi Lijun, Wu Richard, Inoue Mikihiro, Uchida Keiichi, Kusunoki Masato, Delgado-Olguin Paul, Pierro Agostino	4. 巻 1752
2. 論文標題 Live Imaging of Fetal Intra-abdominal Organs Using Two-Photon Laser-Scanning Microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mouse Embryogenesis(Part of the Methods in Molecular Biology)	6. 最初と最後の頁 63～69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7714-7_6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小池勇樹, Bo Li, Carol Lee, 三宅 啓, Yong Chen, 井上幹大, 内田恵一, Agostino Pierro, 楠 正人
2. 発表標題 Remote ischemic conditioningの 壊死性腸炎モデルマウスにおける 予防・治療効果の検討
3. 学会等名 日本周産期新生児学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小池勇樹、井上幹大、内田恵一
2. 発表標題 2光子レーザー顕微鏡を用いた壊死性腸炎モデルにおける 小腸壁内微小循環と粘膜障害の検討
3. 学会等名 第54回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小池勇樹、井上幹大、内田恵一
2. 発表標題 壊死性腸炎モデルマウスにおけるRemote ischemic conditioningと その予防効果の検討
3. 学会等名 第33回 日本小児外科学会 秋季シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuhki Koike
2. 発表標題 Remote ischemic conditioning improves intestinal perfusion in experimental necrotizing enterocolitis
3. 学会等名 International Symposium on Pediatric Surgical Research 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内田 恵一 (Uchida Keiichi) (30293781)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	
研究分担者	井上 幹大 (Inoue Mikihiro) (30422835)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	
研究分担者	大竹 耕平 (Otake Kohei) (40378344)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	
研究分担者	松下 航平 (Matsushita Kohei) (70750777)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	