

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19591571

研究課題名(和文) おとり型核酸と肝細胞増殖因子を用いた放射線腸炎に対する治療効果の検討

研究課題名(英文) Ameliorating effect of NF- κ B and hepatocyte growth factor on radiation enteropathy in experimental model.

研究代表者

王 孔志 (OH KOUSHI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号80340968

研究成果の概要:腹部、骨盤内悪性腫瘍に対する放射線療法は有用であるが放射線腸炎という障害をきたすことがある。本研究はマウス放射線腸炎モデルに対し、様々な組織に対し修復効果をもたらす肝細胞増殖因子(HGF)と、様々なサイトカインの転写因子であるNF- κ Bの活性を抑制するおとり型核酸を投与することにより、どのような改善効果が得られるかを検討した。HGFとおとり型核酸の投与により抗アポトーシス効果を示し炎症が軽減することが示唆された。

交付額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・消化器外科

キーワード:(1)放射線腸炎 (2)肝細胞増殖因子(HGF) (3)おとり型核酸 (4)サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

腹部、骨盤内悪性腫瘍に対する放射線療法は新規抗悪性腫瘍剤の開発がすすむにつれ併用される機会も多く補助療法を含めた治療成績は良好なものをおさめている。しかし放射線照射は一定の照射線量を超えると高率に障害をきたすため治療に限界があり、腹部では重大な副作用として放射線腸炎がある。その殆どの外科的手術を含め対

処的治療がなされるのみであり、一度発症すると急性期では粘膜障害に伴う出血、下痢、吸収不良を認め、晩発期障害として消化管線維化に伴う狭窄、穿孔、難治性ろう孔など重篤な合併症を引き起こし、しばしば外科的処置を必要とするが消化管組織のダメージが強く治療に難渋する。

これまでに研究代表者らはHVJ法を用い

て生体に高効率かつ反復的に遺伝子導入可能なことを報告し、また、おとり型核酸である NF-kB decoy をこの方法を用いマウス急性肝炎モデルに導入し肝炎発症を抑制したことを報告した。急性期放射線腸炎は放射線照射後早期に TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8 などの炎症性サイトカインの活性化が起こっており、この点に注目し NF-kB の活性化を decoy を用いて抑制することで早期放射線障害の抑制効果が期待でき、さらに晩期障害への移行を予防できる可能性があるかと推測できる。次に、当教室では難治性疾患である肝硬変に対し肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) を遺伝子導入し線維化の抑制がみられたことを報告し、さらに骨髄移植における GVHD 腸炎の発症を抑制したことも報告した。HGF は肝細胞の増殖因子のみならず多種多様の細胞に対し多様な生物学的活性を有し、消化管上皮細胞に対しても増殖作用を示し我々はマウス炎症性腸疾患モデルに対し HGF 遺伝子導入を行い、上皮再生促進と抗アポトーシス効果により良好な治療効果が得られたことを報告した。晩期放射線腸炎の病態は、粘膜障害ならびに血管の閉塞性硬化性病変に伴う線維化であり、線維化の促進因子として TGF- β 1、CTGF が知られている。HGF の上皮再生作用、血管新生作用および抗 TGF- β 1、CTGF 効果による線維化を抑制する作用に着目し HGF を遺伝子導入し、その治療効果が期待できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究はマウス放射線腸炎モデルを用い急性期障害および晩期障害の病態を解明し、分子生物学的なアプローチにより抑制および修復効果を得られるかどうかを検討する。また、急性期傷害の抑制が晩期傷害抑制に

関与するかどうかを検討し、晩期障害に対しては組織修復因子により障害が改善するかどうかを検討する。

急性期では炎症性サイトカインの発現の解析を行い、転写因子である NF-kB の活性を NF-kB decoy (おとり型核酸) の導入により抑制し、急性期傷害を予防する。また、晩期障害に対し HGF 遺伝子導入し、TGF- β 1 及びその下流にある CTGF (connective tissue growth factor) などの線維化因子を抑制することにより、粘膜障害ならびに血管の閉塞性硬化性病変に伴う線維化を改善させるかどうかを検討する。具体的に、1) NF-kB decoy により障害が抑制されたかどうか観察し、上皮組織の中でも放射線感受性が高く障害を受けやすい Crypt に存在する幹細胞のアポトーシスの改善について検討する。2) HGF の放射線腸炎における上皮再生作用と線維化抑制作用、血管新生作用について検討する。放射線腸炎の線維化のメカニズムに TGF- β 1 の関与が知られているが、HGF の発現により TGF- β 1、CTGF の発現がどのように影響を受けるか検討する。3) また、線維化抑制因子である MMP 2 の発現について解析し、CTGF、TGF- β 1 の活性を抑制する INF- γ や、他の炎症性サイトカインとのその関連性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成: 放射線照射装置を用い BALB/c マウスの頭部および胸部を遮蔽し全腹部に照射をおこない、主に小腸をターゲットとし腸炎を作成する。適切な照射線量の確率と腸炎の発症経過を体重変化、下痢の程度、生存率などを評価し安定したモデルの作成を行う。

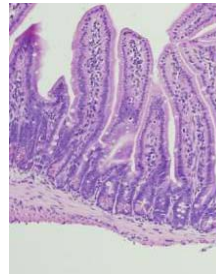
(2) 病理組織学的評価：急性期および晩期障害の経時的变化を H-E 染色や免疫染色により上皮の障害の程度、炎症細胞浸潤、上皮の再生の程度を評価する。また、急性期障害においては放射線によるダメージは小腸において crypt に存在する幹細胞がもっとも受けやすく、アポトーシス細胞の検出を TUNEL 染色により検討する。上皮の再生、血管の新生などを Ki-67 染色を行い、晩期障害における線維化の程度については sirius red 染色を行い検討する。

(3) 分子生物学的解析：急性期における血清や腸炎組織における炎症性サイトカインの発現について ELISA 法を用いて解析し、そのサイトカインが NF-kB decoy により抑制されるかどうか検討する。また、晩期障害において HGF、TGF- β 、CTGF の発現について ELISA 法やウエスタンブロット法を用い解析する。また、放射線腸炎において HGF の receptor である c-met の発現およびリン酸化についてウエスタンブロット法を用い検討する。

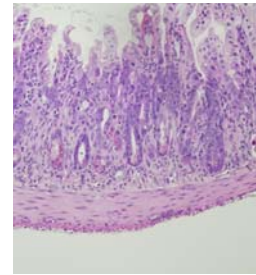
(4) 遺伝子導入：HVJ 法を用いヒト HGF 遺伝子をマウス四肢骨格筋に注入する。NF-kB decoy は腹腔内投与を行なう。

4. 研究成果

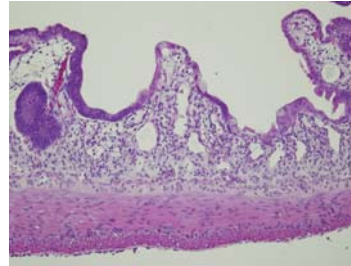
(1) モデルの作製：6 週齢 BALB/c マウスに対し頭部および胸部を遮蔽し全腹部に 5Gy, 10Gy, 15Gy, 20Gy の 1 回照射を行なった。耐用線量は 15Gy までで 20Gy 照射では高度の炎症を生じるが著明な骨髄抑制をきたし 1 週以内に全マウスが死亡した。また、5Gy では炎症は軽微で持続しなかった。



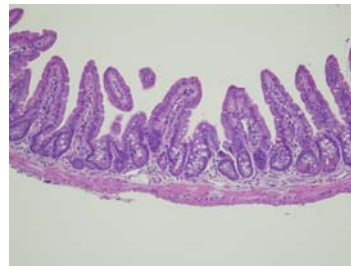
正常回腸末端部



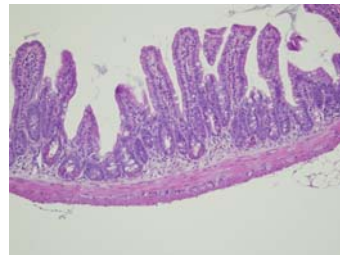
72 時間後



1 週間後



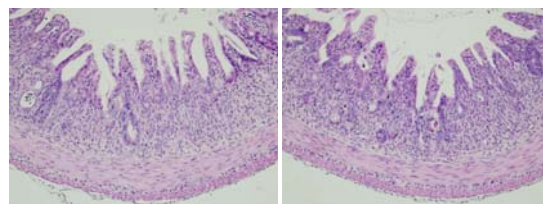
2 週間後



4 週間後

致適線量は 10~15Gy で上皮障害は 1 週間後が強く 2 週目より自然修復をきたしはじめた。4 週目では上皮の再生はしているが粘膜下層には炎症は持続していた。本実験では 15Gy を用いることとした。

(2) HGF の効果
① H-E 染色

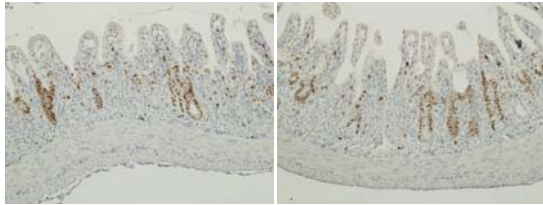


Control

HGF

HGF 群は Control 群に比べ炎症は軽微な傾向を示した。

② Ki-67 染色



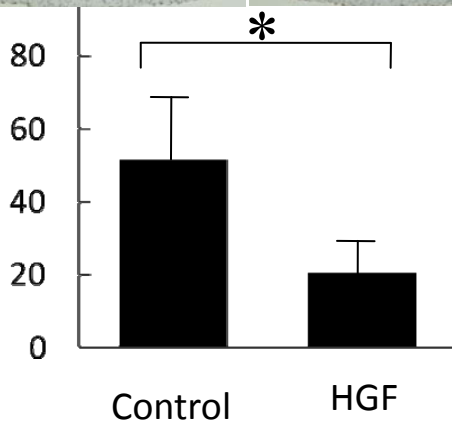
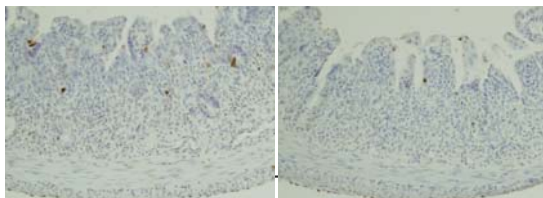
Control

HGF

HGF 群と Control 群に mitosis に差は見られなかった。

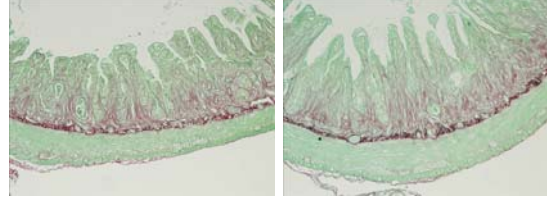
③ TUNEL 染色

アポトーシスについて TUNEL 法を用い検討した。



HGF 群は Control 群に比べ TUNEL 陽性細胞は著明減少し抗アポトーシス作用を示しました。(P=0.001007)

④ Sirius red 染色



Control

HGF

Sirius red 染色による線維化の程度について検討した。線維化の程度は、HGF 群は Control 群に比べ軽微な傾向を示したが有意な差はなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 孔志 (OH KOUSHI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 8 0 3 4 0 9 6 8

(2) 研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIROU)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：9 0 1 9 9 3 7 3

飯室 勇二 (IIMURO YUUJI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：3 0 2 5 2 0 1 8

平野 公通 (HIRANO TADAMICHI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：9 0 3 4 0 9 6 8

岡田 敏弘 (OKADA TOSHIHIRO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：7 0 3 5 1 7 9 9

吉田 康彦 (YOSHIDA YASUHIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：4 0 4 3 4 9 4 8

(3) 連携研究者