

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599019

研究課題名(和文)

オンコスタチンM遺伝子治療による腸管の線維性癒着の克服

研究課題名(英文)

Fibrous adhesion of the intestine overcome by Oncostatin M gene therapy.

研究代表者

濱田 哲宏 (HAMADA TETSUHIRO)

兵庫医科大学・医学部・研究生

研究者番号：50419826

研究成果の概要(和文)：

腹部悪性腫瘍に対する放射線照射によって、照射範囲に入る正常腸管は放射線腸炎や線維化をおこし、腹痛、下痢や下血の原因となる。申請者は、肝障害モデルラットにオンコスタチンM(OSM)遺伝子治療を試み、OSMに抗炎症作用と抗線維化作用があることを見出した(*Am J Pathol.* 171:872-881, 2007)。本研究では、腸管線維化モデル動物の腸管にOSM遺伝子を導入し、腸管上皮を調べて腸管の線維化に対するOSM遺伝子治療の有用性を検証した。OSM遺伝子投与群では対照群と比べて腸管の障害が抑制されていたことが判明した。OSMの抗炎症作用によって線維化の抑制ができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

By irradiation for abdominal malignancies, normal bowel into the irradiated area by bring radiation enteritis and fibrosis, abdominal pain, bloody diarrhea and causes. The applicant, a rat model of liver injury in Oncostatin M (OSM) gene therapy trial, OSM found that the effect of anti-inflammatory and anti-fibrosis (*Am J Pathol.* 171:872-881, 2007). In this study, the intestinal tract of animal models of fibrosis gene to OSM, examined for intestinal fibrosis intestinal epithelium OSM examined the usefulness of gene therapy. OSM gene was found in the treated group was suppressed by the failure of the intestinal tract compared with the control group. OSM suggesting the possibility that inhibition of fibrosis by anti-inflammatory effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	0	1,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

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) Oncostatin M (2) Gene therapy (3) 炎症

1. 研究開始当初の背景

各種の腹部悪性腫瘍に対する治療は、手術、化学療法と放射線治療を合わせた集学的治療が中心となり、その有用性も認められている。しかし、術後腸閉塞や内ヘルニアなどの癒着による合併症や、下痢、下血や吸収不良などの放射線腸炎がしばしば起こる。腸閉塞は発症すると、絶食、イレウスチューブ挿入による保存的加療と、手術による治療法があるが、どちらも治療に伴う患者の苦痛や、再発の危険性が伴う。また、放射線腸炎は一度発症すると、その進行は不可逆的で、根治する方法は確立されていない。いずれの合併症も患者のQOLを著しく損なう。臨床において、手術や放射線照射による合併症を防ぐことが重要である。これらの合併症の機序には腸管組織の炎症による線維化が関与していると考えられる。一方、サイトカインには、抗炎症作用や線維化組織の線維溶解を促す因子がある。最近、申請者の所属する教室では、マウスの術後癒着モデルに、リコンビナントHepatocyt growth factorを皮下注射にて投与すると、Interferon- γ が阻害されることによって、癒着が防止できることが見出された(Nat Med. 14:437-441, 2008)。これらのサイトカインを治療に用いることにより、腸管の線維化や線維性癒着による合併症の予防や改善が期待できる。

2. 研究の目的

OSM は、インターロイキン-6ファミリーに属するサイトカインであり、元来、炎症性サイトカインとして機能すると考えられていた(J Exp Med. 184:81-92, 1996 & J Immunol. 170:548-555, 2003)。しかし、最近、申請者らは、OSM 遺伝子を、ジメチルニトロサミン(DMN)投与による肝障害モデルラットに導入すると、肝細胞の増殖が促進されるばかりでなく、炎症細胞浸潤や線維化が抑制されることを見出した(Am J Pathol. 171:872-881, 2007)。これにより、OSM は、生体内において抗炎症性サイトカインならびに抗線維化性サイトカインとしての生理作用を持つことが示された。本研究の目的は、これらの事実を踏まえ、炎症に起因する腸管の線維化および線維性癒着に対する、OSM 遺伝子治療の有用性を検討することである。

3. 研究の方法

(1)ラットOSM発現ベクター(pEF-BOS with rat OSM cDNA)を作製し、これをHVJ-Envelope法を用いて封入した(HVJ-OSM)。また、pEF-BOSをHVJ-Eで封入、対照に用いた(HVJ-Vector)。

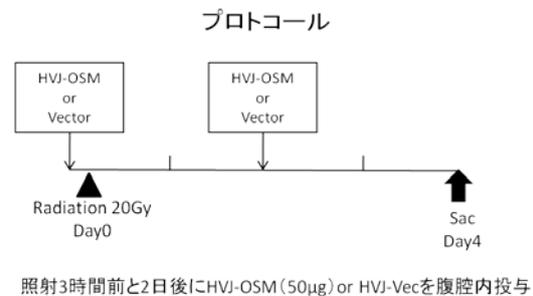
(2)放射線照射による腸管線維化モデル

①放射線照射による腸管線維化モデルの作製とOSM遺伝子導入

SDラット(雄性、4週齢)に放射線20Gyを1回、全身照射により炎症を惹起して、腸管線維化モデルを作製する。実験を5日間に渡って行うモデルを作製する。腸管線維化誘発3時間前、2日後にHVJ-OSMを注腸投与腹腔内投与し、腸管へOSM遺伝子を導入する。対照にHVJ-Vectorを投与する。

②治療効果の評価

・理学所見による全身状態の検討放射線照射4日後にラットを屠殺して、体重と下血、下痢の具合および体重変動量で全身状態を検討する。

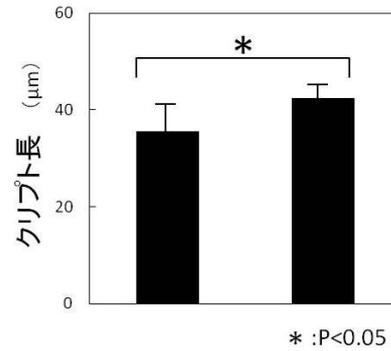
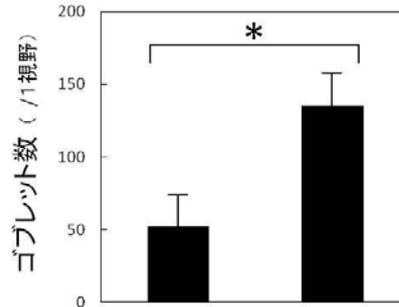


続いて、腸管の病理組織標本作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を用いて、腸管の炎症細胞浸潤、粘膜上皮の障害の程度を評価し、OSMの腸管保護作用および再生作用を評価する。また、放射線による急性期障害は、小腸のクリプトに存在する幹細胞がもっとも受けやすい。光学顕微鏡40倍の条件でのクリプト長および1視野あたりのゴブレット細胞数を計測し、腸管上皮障害を検討する。障害部位におけるアポトーシス細胞を、TUNEL染色を行って検出する。上皮の再生を、Ki-67染色を行って検出する。

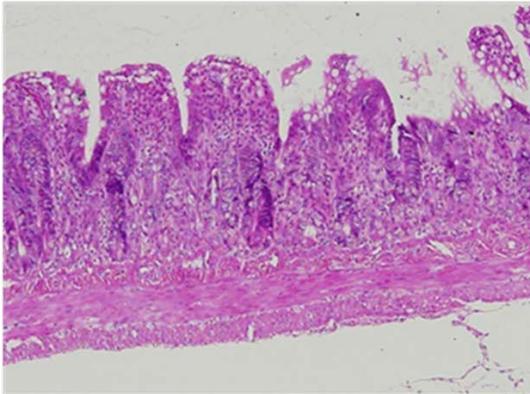
4. 研究成果

HVJ-OSM投与群とHVJ-Vector群、各々5匹ずつで検討した(n=5)。理学所見では下痢はHVJ-OSM投与群では1匹に認められ、HVJ-Vector投与群では2匹に認められた。下血は両群とも0匹であった。体重変動量はHVJ-OSM投与群では19.12 \pm 3.5gであったの

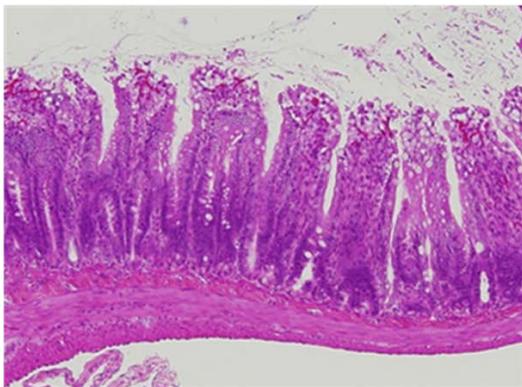
に対して、HVJ-Vector 投与群では $21.18 \pm 1.4g$ であり、に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。作製した病理組織標本を用いて腸管の炎症性変化および線維化の評価を行った。すると回腸末端において HVJ-OSM 投与群の放射線腸障害ラット腸管組織では、各々の標本から、ランダムに選択したクリプト 4 カ所のクリプト長が $42.5 \pm 16.2 \mu m$ であつたのに対して、HVJ-Vector 投与群では $35.5 \pm 4.8 \mu m$ であつた。HVJ-OSM 投与群では HVJ-Vector 投与群と比べてクリプト長が有意に長いことが確認できた ($P < 0.05$)。さらに goblet 数を検討すると HVJ-OSM 投与群では平均が 135.2 ± 25.4 個/視野であつたのに対して HVJ-Vector 投与群では 52.2 ± 41.4 個/視野であつた。HVJ-OSM 投与群では HVJ-Vector 投与群と比べて goblet 数が有意差をもって多いことが確認された ($P < 0.05$)。粘膜上皮のうっ血の程度 3 段階での評価を行つて、比較したが、改善傾向を認めたものの有意差は認めなかった ($P > 0.05$)。



病理組織学的検討 回腸末端：HE染色

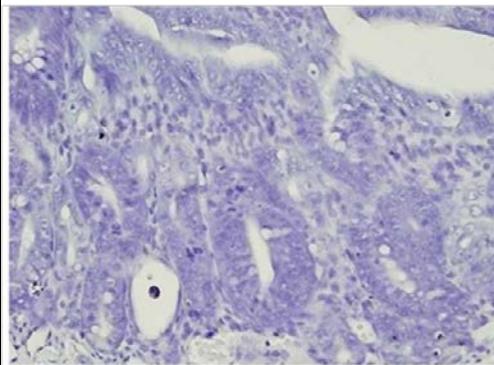


Vector投与群

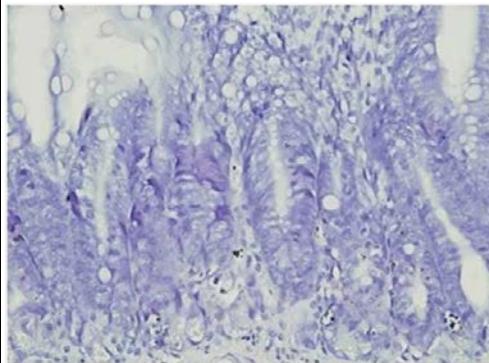


OSM投与群

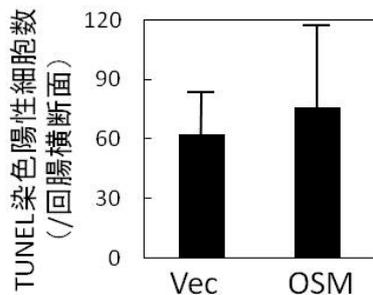
TUNEL染色



Vector投与群

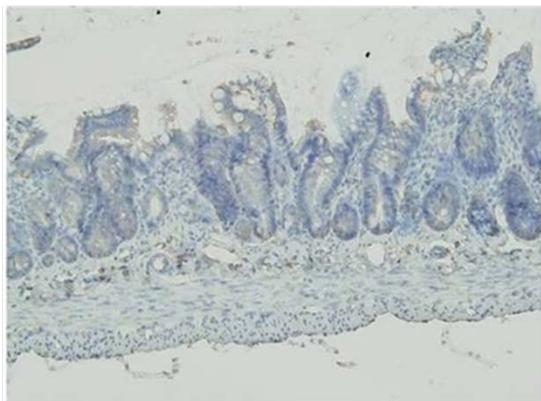


OSM投与群

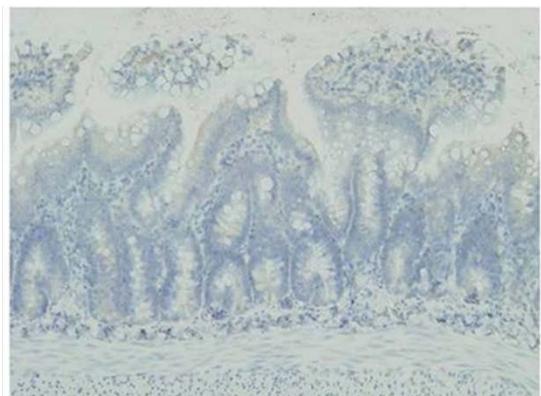


TUNEL染色を行って、回腸横断面あたりの陽性細胞数を測定し、アポトーシスの評価を行ったところ HVJ-OSM 投与群では 96.6 ± 31.0 であったのに対して HVJ-Vector 投与群では 62.2 ± 10.8 であり有意差は認めなかった ($P > 0.05$)。Ki-67染色を行って上皮再生の評価を行ったが有意差は認めなかった。

Ki-67染色



Vector投与群



OSM投与群

これらの結果によって OSM は腸管上皮に対

して抗炎症作用を持つことが判明した。

このモデルにおいては、OSM は腸管上皮細胞の再生促進作用は認められなかった。また、抗アポトーシス作用も認められなかった。

今後、OSM の発現ならびに作用機序を明らかにするために研究をすすめる予定である。

OSM の抗炎症作用によって線維化ならびに線維性癒着の抑制ができる可能性が示唆された。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 哲宏 (HAMADA TETSUHIRO)
兵庫医科大学・医学部・研究生
研究者番号：50419826

(2) 研究分担者

辻村 亨 (TSUJIMURA TOHRU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20227408

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：90199373

鳥井 郁子 (TORII IKUKO)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：70207661

佐藤 鮎子 (SATO AYUKO)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：20419823

(3) 連携研究者