

機関番号：14101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890107

研究課題名（和文） 二光子レーザー顕微鏡を用いた壊死性腸炎モデルの作成とその病態・治療法の解明

研究課題名（英文） Research of pathogenesis and treatment of the necrotizing enterocolitis model induced by in vivo real-time two-photon microscopic imaging

研究代表者

小池 勇樹 (Yuhki Koike)

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：10555551

研究成果の概要（和文）：

本研究計画は、GFP actin transgenic mouse を用いた壊死性腸炎モデルを用いてマイクロレベルでのリアルタイムイメージを二光子レーザー顕微鏡（Two-photon laser-scanning microscopy; TPLSM）にて観察し、疾患とその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。

現在、TPLSM と独自に開発した organ stabilizing system をさらに発展させ、Isolectin IB4 を用いて、血管内皮を選択的に赤色発光させることにより、マウス腸管の微少血管において、血管内皮層を選択的に Laser 照射することが可能となった。次に壊死性腸炎モデル作成であるが、我々は、新生児マウスにおいては、開腹することなく、直接腹壁にレーザー照射をすることで、腹腔内の小腸粘膜層まで観察する新たな固定法を発明し、このモデルを用いて LPS 投与を行い、リアルタイムでのマウス腸間膜微少血管における変化や、腸管粘膜における変化を捉え、生体内薬剤効果判定を行っている。

研究成果の概要（英文）：

This research project is making the necrotizing enterocolitis model created in beta-actin-green fluorescent protein transgenic mice observed by two-photon laser-scanning microscopy(TPLSM), and figuring out the pathogenesis and treatment of this disease using this model and system.

Currently, because the further development of organ stabilizing system identify each of the layers of vascular smooth muscle and endothelium, endothelial layer were identified by selective in vivo staining with fluorescent Griffonia simplicifolia IB4 isolectin. As for the necrotizing enterocolitis model, we invented the new stabilizing system that enable us to observe the mucosal layer of the small intestine without laparotomy in neonatal mice. Now we try to evaluate the real-time change of the mucosal layer and drug efficiency of the necrotizing enterocolitis model induced by LPS injection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	980,000	294,000	1,274,000
2010 年度	770,000	231,000	1,001,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,750,000	525,000	2,275,000

研究分野：小児外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：two-photon laser-scanning microscopy, green fluorescent protein, thrombus formation, laser irradiation, vascular endothelium injury, necrotizing enterocolitis model

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。現在、各国において、**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。

2. 研究の目的

小児外科領域において壊死性腸炎は、近年発生率が上昇している致死率の高い疾患であり、その病態の解明や治癒率の向上が急務である。この壊死性腸炎の実験モデルは、最新技術である二光子レーザー顕微鏡と **GFP** マウスを使用することにより、リアルタイムな観察・評価が実現可能なものとなり、この疾患の病態解明や治癒率の向上に、絶大な影響を与えるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、第一に、最新技術である2光子レーザー顕微鏡によって、現在までに研究してきた高分子デキストラン硫酸(**DSS**)大腸炎モデルや **bacterial translocation** モデルの作成・観察の実験経験を活かし、壊死性腸炎モデルの作成・観察を行う。これは同一個体の病理組織学的変化のリアルタイムイメージを提示するという画期的なモデルとなる。さらに **Laser induced thrombosis model** を用いて、マウスの腸間膜の微小血管に血栓を形成し、その直後より腸管粘膜が障害される様子を同一個体・同位相における変化としてマイクロレベルの観察を行い、その病態変化を明らかにする。この上で過去に報告された壊死性腸炎モデルと今回作成するマウス腸間膜微小血管の血栓モデルとの中で、臨床的に最も **acceptable** かつ **reasonable** な壊死性腸炎モデルを腸管障害のリアルタイムイメージと同一個体同一腸管の **H&E** 染色と比較して同定する。こうして得られた最も臨床的に有用性のあるマウス壊死性腸炎モデルを用いて、その予防・治療として注目されるプロバイオティクス等の効果判定を同一個体の病理組織学的リアルタイムイメージの変化としてとらえ、これらを通じて薬物動態とその効果さらには粘膜再生のメカニズムをマイクロレベルで評価を行う。また壊死性腸炎では、粘膜透過性の亢進を来し、腸管バリア

の脆弱性により、敗血症性ショックを引き起こすとされている。このため我々は第二の目的として、壊死性腸炎モデルにおける **bacterial translocation** のリアルタイムイメージを提示し、その **mechanism** を深く追求するとともに抗生剤もしくは乳酸菌製剤などの整腸剤を使用することでの薬剤効果判定をマイクロレベルで可能とする。

4. 研究成果

まず、**TPLSM** と **GFP** マウスを用いて、腸管の動脈血管壁において、血管内皮層と血管平滑筋層をそれぞれ個別の層構造として同定できるかどうかを検討した。

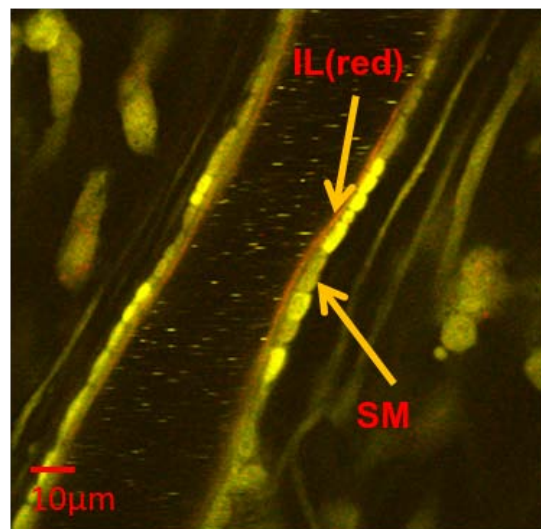


図1

図1は **IsolectinIB4** を用いて、血管内皮層のみを生体内で **Real-time** な画像として、**Red** に染色したものである。

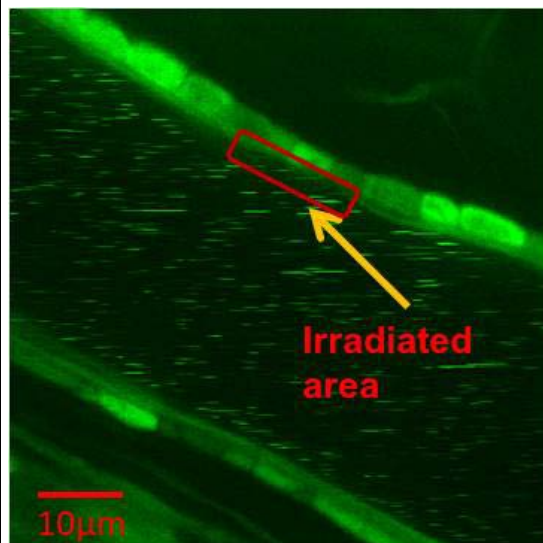


図2

このように TPLSM の increased depth of tissue penetration, less tissue photobleaching and photodamage といった長所により、非常に解像度の高い Intravital image の獲得が可能となった。

そして血管内皮層のみを選択的にレーザー照射することで、血管内皮層の障害部位の下流端より、Straight line formation という血小板の列状に連なり、やがて血小板血栓が形成されていくことが、世界で初めて Intravital imaging として捉えられた。(図 3、図 4)

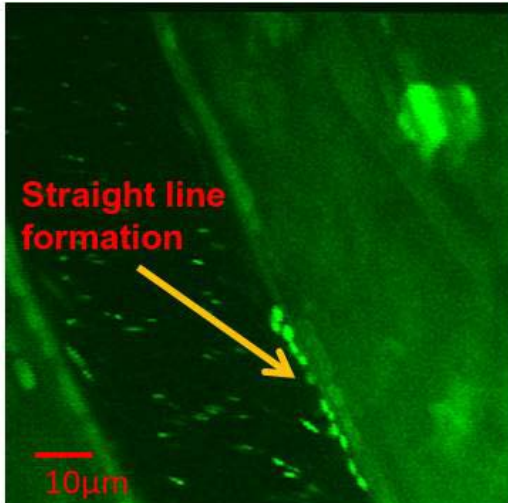


図 4

このようにして作成された血栓を経時的に長時間の観察が可能となり、血栓増大の過程を、2D image を積分する(図 5)ことで血栓 Volume を算出すると、表 1 のようなグラフとなった。これより、血管内皮層選択的な障害による血栓は、約 1 時間経過後に、プラトーに達する傾向があることが判明した。

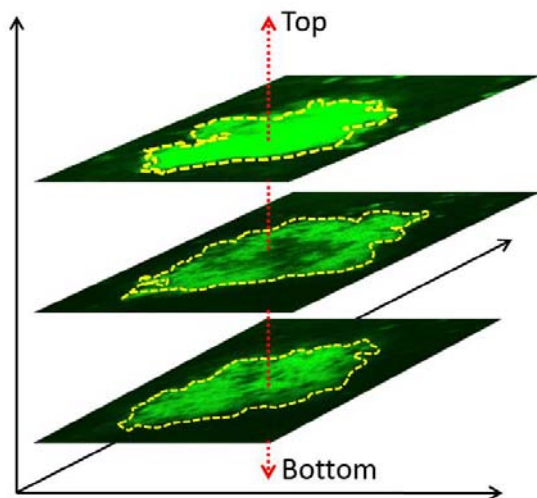


図 5

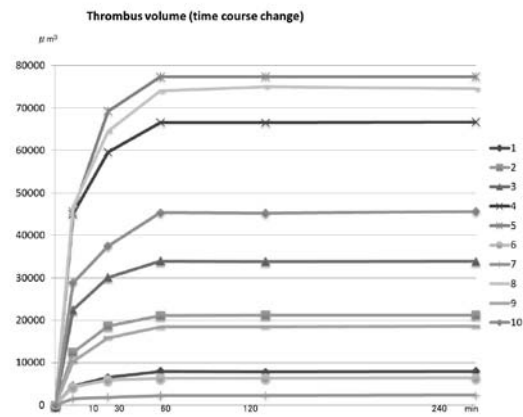


表 1

このようにして作成されたプラトーに達した血栓に対し、既存薬剤の同一固体内薬剤効果判定を行った。

Anticoagulant drug efficiency for the early and late phase of thrombus formation

	Early phase	Late phase	
	Straight-line formation disappearance*	Thrombolytic change*	Reduction of Thrombus volume **
Isotonic saline (n=25)	1/25 (4%)	0%	0%
Heparin (n=25)	13/25 (52%)	8/25 (32%)	14/25 (56%)
rt-PA (n=25)	21/25 (84%)	20/25 (80%)	22/25 (88%)

*: Each drugs were injected bolus after appearance of the straight-line formation
 ††: Each drugs were injected bolus after appearance of the thrombus formation
 *: Platelets detachment of the thrombus surface
 **: >50% reduction of thrombus volume by injection of anticoagulant drug

表 2

表 2 のように、血栓形成の早期・晩期のどちらにおいても、血小板血栓に対しては、ヘパリンより t-PA の有効性が示された。

NEC model の作成に関しては、当初低酸素・LPS 投与・低体温等を複合させたストレスに暴露することで、モデル作成を試みていたが、他の報告ではラットでの実験が多い中で、GFP マウスにおいて、同様のストレス暴露を行うと、圧倒的な致死率となってしまう、TPLSM による Intravital の観察すら困難な状況に至った。このため、まずは最も影響が強いとされる LPS 投与のみで、腸管粘膜の変化を Intravital image として捉えている状況である。尚、この新生児マウスの観察において、我々は、TPLSM の Tissue penetration を最大限に利用し、マウスを開腹することなく、小腸粘膜層までを Real-time に観察する手法を考案した。これにより、より低侵襲で、観察時の侵襲や影響を最小限に抑えた、生理学的にも最も理想的な観察モデルに近い将来実現可能なものとなると考えられた。

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)

〔学会発表〕(計2件)

1.

2010年4月9日 名古屋国際会議場

日本外科学会学術集会

サージカルフォーラム

「二光子レーザー顕微鏡を用いた血管内皮選択的 real-time laser induced thrombosis モデルの確立」

小池勇樹、田中光司、奥川喜永、森本雄貴、問山裕二、井上靖浩、内田恵一、三木誓雄、溝口明、楠正人

2.

2009年6月2日 大阪国際会議場

日本小児外科学会学術集会

ポスターセッション

「二光子レーザー顕微鏡と GFP transgenic mouse を用いた腹腔内臓器観察モデルの確立と小児外科疾患への応用」

小池勇樹、問山裕二、奥川喜永、松下航平、大竹耕平、井上幹大、内田恵一、三木誓雄、溝口明、楠正人

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 勇樹 (Yuhki Koike)

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：10555551

(2) 研究分担者

()

研究者番号：