

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591432

研究課題名（和文）腸管不全の新たな治療法としての腸管再生促進因子の研究

研究課題名（英文）Study of growth factors in intestinal failure

研究代表者

和佐 勝史（WASA MASAFUMI）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10240467

研究成果の概要（和文）：

代表的な腸管不全である抗がん剤投与に伴う腸管障害において、グルタミンの投与効果及びそのメカニズムを検討した。その結果、本モデルにおけるグルタミンの投与効果が明らかとなり、そのメカニズムとして、グルタミンによるApoptosis発現の抑制、腸管粘膜上皮細胞の分裂・増殖の促進、活性酸素の作用の抑制、および抗がん剤投与に伴うグルタミントランスポート活性の増強であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the present study was to examine the effect of glutamine on mucosal damage induced by cyclophosphamide in a rat and elucidate the mechanism for its protective effects. Glutamine prevents intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide by the mechanism of increased glutathione, decreased apoptosis and increased proliferation of intestinal epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般、代謝栄養外科学

キーワード：腸管不全、再生促進因子、グルタミン

1. 研究開始当初の背景

腸管不全とは、腸管の機能が著しく低下し、それ自身の機能だけでは生体の維持が困難な病態の総称である。小児では、壊死性腸炎、

腸回転異常症に伴う絞扼性イレウス、多発性小腸閉鎖症などが原因での腸管大量切除に伴う短腸症候群、CIIPSなどの広範な腸管の運動障害、乳児難治性下痢症などがこれにあ

たる。これらの病態では、長期間静脈栄養（以下 TPN）を中心とした栄養管理を必要とし、TPN より離脱できない場合は小腸移植の適応となる。しかし、小腸移植は心移植や肝移植と比較し、拒絶反応の発生率が高く、移植腸管の graft survival rate は現時点においても 50%程度である。また、恒常的なドナー不足の問題にも直面していることより、移植医療に代わる新たな治療法の開発は緊急の課題である。

近年、再生医学の概念が注目されている。これは、増殖能の高い幹細胞を増殖、分化させ、人工的な組織構築 tissue engineering を行い、これを生体内へ移植して臓器として用いるという考え方で、臓器移植の欠点を補う治療法を目指すものである。近年、ヒト ES 細胞（胚性幹細胞）株が樹立され、これより誘導された血球細胞、血管細胞、軟骨細胞、神経細胞などを臨床に応用する試みがなされている。しかし、腸管、肝、腎などの複雑な臓器構成を必要とする臓器再生には多くのプロセスが必要であり、中でも腸管増殖因子 growth factor の導入が重要な因子である。

2. 研究の目的

グルタミンは生体にとって最も重要な細胞外アミノ酸で、多機能に寄与し、抗酸化物質の glutathione の前駆物質で、腸管粘膜上皮細胞にとって重要な栄養源であり、侵襲からの腸管粘膜保護作用ある。

われわれはこれまで、様々な腸管不全の病態モデルにおいて、主に基礎実験によりそれらの治療法の開発、病態の解明に寄与してきた。具体的には、腸管大量切除後の短腸症候群における残存腸管の代償機能促進因子の解明、炎症性腸疾患の病因物質の同定、虚血性腸疾患における腸管粘膜防御因子の解明、抗癌剤投与に伴う増殖因子グルタミンの投与効果などである。

今回、臨床的にしばしば遭遇する代表的な腸管不全である、抗癌剤投与に伴う腸管障害において、グルタミンの投与効果及びそのメカニズムを検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤 cyclophosphamide (CPM) によるラット腸管粘膜障害に対するグルタミン (Gln) の投与効果

Wistar 雄ラットを Control 群 (A 群; n=8) : 生理食塩水 (以下生食) 腹腔内注入 (i. p.) + 生食胃内注入、CPM 投与群 (B 群; n=8) : CPM 300mg/kg (i. p.) + 生食胃内注入、Gln 投与群 (C 群; n=8) : CPM 300mg/kg (i. p.) + Gln 1g/kg 胃内注入の 3 群に分類した。生食、Gln の胃内注入は 1 回とし、CPM の投与と同時に施行した。3 日目に回腸を採取し、粘膜湿重量、組織学的検査 (Villus height, Crypt depth)、粘膜蛋白量、粘膜グルタチオン (GSH) 量を測定した。次に Gln の腸管粘膜保護作用が apoptosis の抑制作用又は粘膜細胞の増殖作用のどちらに有効なのかを検討した。apoptosis は TUNEL 法を用いて行い、粘膜細胞の増殖は BrdU の取り込みにて評価した。Control 群、CPM 投与群、Gln 投与群を 6 時間、12 時間、24 時間、48 時間の 4 群 (各群 n=5) に分けて評価した。また、10-villus 当たりの染色された核を集計して apoptosis index、proliferation index として評価した。

(2) ヒト腸管上皮細胞において抗癌剤投与がグルタミントランスポート活性に与える影響

ヒト腸管上皮細胞として Caco-2 cell を用い、37°C, 5% CO₂/95% air の条件下で培養液 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) を用いて細胞培養した。細胞が 100% confluent になった段階で、細胞を Cisplatin 群と対照群 (前記標準条件下培養群) に分けた。Cisplatin 群は、Cisplatin 5 μg/ml を含む培養液に交換することで作成した。グルタミントランスポーター (ASCT2) の mRNA および蛋白発現量の解析を、それぞれ定量的 RT-PCR 法および western blot を用いて行った。また各アミノ酸トランスポート活性は、³H-グルタミン、³H-ロイシンおよび ³H-グルタミン酸を用いて、Gazolla の方法にて測定した。

4. 研究成果

(1) 3日目に採取した回腸粘膜の組織像ではCPM投与群は絨毛、陰窩が著しく委縮しており、一部では絨毛の脱落をも認めた。そのため、抗癌剤による強い腸管粘膜障害を認めたが、Gln投与群では粘膜委縮をほとんど認めない事より、Glnによる粘膜保護効果を認めた。また、粘膜湿重量、Villus height、Crypt depth、粘膜蛋白量及び粘膜GSH量のすべての検討項目において、CPM投与群はControl群、Gln投与群と比較して有意に低値となっているが、Gln投与群はCPM投与群と比較して有意に増加し、Control群とほぼ同等であった。

粘膜GSHは、CPMにより有意に低下したが、グルタミン投与により有意に上昇し、コントロールのレベルまで復した。CPM投与によりクリプト領域でApoptosisの発現が著明に観察されたが、グルタミン投与によりApoptosisの発現は著明に抑制された。CPM投与によりクリプト領域での粘膜上皮細胞の分裂・増殖は著明に抑制されたが、グルタミン投与により、コントロールに近いレベルまで回復した。GSHは抗がん剤により誘導される活性酸素を抑制する作用を有する。以上より、抗がん剤に伴う腸管障害モデルにおけるグルタミン投与効果のメカニズムは、活性酸素の作用の抑制、Apoptosis発現の抑制、腸管粘膜上皮細胞の分裂・増殖の促進、であることが明らかとなった。

(2) グルタミン(System ASC)およびロイシン(System L) トランスポート活性はシスプラチン投与により有意に上昇した。同時に、これらのアミノ酸トランスポート mRNA および蛋白の発現に上昇を認めた。グルタミン酸(System X-AG)トランスポート活性には変化を認めなかった。以上より、抗がん剤(シスプラチン)投与が腸管上皮細胞アミノ酸トランスポートに与える影響が遺伝子レベルで明らかとなった。

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 2件)

- ① OWARI M, WASA M, OUE T, NOSE S, FUKUZAWA M, Glutamine prevents intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide in rats, *Pediatr Surg Int*, 査読有、28巻、(2012)、299-303
- ② TAZUKE Y, WASA M, FUKUZAWA M, Protective mechanism of glutamine on the expression of proliferating cell nuclear antigen after cisplatin-induced intestinal mucosal injury, *Pediatr Surg Int*, 査読有、27巻、(2011)、151-158

[学会発表] (計 1件)

- ① 野瀬聡子、和佐勝史、福澤正洋、化学療法後の腸管粘膜障害に対するグルタミンの保護機構、日本外科代謝栄養学会、2010.7.9、横浜

[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

5. 研究組織

(1) 研究代表者

和佐 勝史 (WASA MASAFUMI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10240467

(1) 研究分担者

福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)
大阪大学・医学系研究科・名誉教授
研究者番号：60165272

(3) 研究分担者

曹 英樹 (SOH HIDEKI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00457011

(4) 研究分担者

上原 秀一郎 (UEHARA SHUICHIRO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00448060