

## 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 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591475

研究課題名（和文） 大建中湯によるクローン病腸管再手術率低下を目指した基礎的研究

研究課題名（英文） Daikenchuto for preventing postoperative recurrence of Crohn's disease: a preclinical study

研究代表者

河野 透 (KONO TORU)

旭川医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：60215192

研究成果の概要（和文）：クローン病腸管では炎症、潰瘍により粘膜や神経組織に強い傷害が繰り返される。その結果、神経組織で産生される神経ペプチドは顕著に減少し、血流は正常値の半分程度となる。これらの結果から神経再生を保持し、血流に配慮した新たなクローン病腸管手術を考案し、吻合部狭窄が防止できる可能性を明らかにし、大建中湯によるクローン病腸管血流改善、クローン病の病因論的関与が示唆される TNF $\alpha$ 、インターフェロン $\gamma$  産生を特異的に抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Segments of diseased bowel in Crohn's disease (CD) typically show severe mucosal and neuronal damage from recurring episodes of inflammation and ulceration. We have subsequently confirmed approximately 50% decrease in intestinal blood flow. On the basis of these findings, we devised a novel surgical technique that at once preserves neuroregeneration and blood flow, and demonstrated its therapeutic potential in the prevention of anastomotic stenosis. In this study we showed that daikenchuto (DKT) normalizes blood flow. We also confirmed that DKT specifically suppresses TNF $\alpha$  and INF $\gamma$  production in a colitis model, the purported etiological factors in CD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	100,000	30,000	130,000
2012 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：大建中湯・クローン病腸管・カルシトニン遺伝子関連ペプチド・アドレノメデュリン・トランジェントレセプターポテンシャル・TNF $\alpha$ ・ハイドロキシ $\alpha$ -サンショール・6 ショーガオール

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病は診断がついて 10 年以内に 60% 以上の患者が主に腸管狭窄が理由で手術を受け、術後再手術率は 5 年で 20-45% と報告

されている。特に、腸管吻合部からの再発が必発で、消化器外科領域で解決すべき難題となっている。原因として必然的に起こる吻合部血流低下が重要な因子であると言われて

いる。ヒトのクローン病腸管自体、CGRP 低下による血流異常が報告されており、腸管血流低下が狭窄病変形成に寄与していると言われている。しかしながら、ヒトに外来性の CGRP や ADM を投与することは不可能で、その理由は、外来性に投与されても極短時間で分解され、目的とする病変部に到達できないだけでなく、循環系への副作用が出るためである。そこで、われわれはこれまでの研究結果から、大建中湯が内因性の CGRP と ADM の activator であることを利用して、クローン病の治療、特に、術後の再手術の大きな要因となっている吻合部血流低下の改善やクローン病再発防止に貢献できないかという発想に至った。

## 2. 研究の目的

大建中湯は臨床で高い実績と信用を得た漢方薬でありながら、その EBM は必ずしも十分とは言えず、薬効発現の本質的な機序が不明であった。腸管吻合部の縫合不全、狭窄、癒着発生を最小限にして治癒を高めるには、虚血状態をできる限り短縮することが有効と考えられている。特に、血流低下が著しいクローン病腸管では、吻合部狭窄、癒着が起りやすい。そこで、外科領域で汎用される大建中湯の薬効発現の本質が腸管血流増加作用にあると想定し、クローン病動物モデルをはじめとした虚血を伴う *in vivo* 系で、同剤の有効性を検証する。

## 3. 研究の方法

- (1)クローン病動物モデルにおける腸管血流測定と大建中湯による血流増加機序解明
- (2)クローン病動物モデルにおける大建中湯による腸炎抑制効果の検証と機序解明
- (3)クローン病動物モデルにおける腸管縫合部の血流測定と治癒促進効果の検証

## 4. 研究成果

- (1)大腸血流系での TRPA1 の関与：TRPA1 アゴニスト Cinnamaldehyde の血流増加作用を完全拮抗する TRPA1 拮抗薬 HC-030031 の投与条件を確認した。同拮抗薬の併用により大建中湯の血流増加がほぼ消失した。この作用は小腸でも確認された。
- (2)小腸血流系での TRPV1, ADM の関与：小腸血流測定系での大建中湯の血流増加作用は、抗 ADM 抗体の前処理で消失した。TRPV1 アゴニストであるカプサイシンの血流増加作用を拮抗する条件下のカプサイシン拮抗薬 BCTC 前処理は、大建中湯の同作用に影響されなかった。つまり、大建中湯は TRPV1 を介さず腸管血流を高めることがわかった。
- (3)大腸血流系での 6SG, HAS の作用：大建中湯成分、ヒドロキシ $\alpha$ サンショール(HAS), 6 ショーガオール(6SG) 6SG は DKT と類似の

血流増加パターンを示し、その作用は TRPA1 拮抗薬の併用によりほとんど消失した。HAS は無作用であった。

(4)ADM 遊離活性の機序：腸管上皮培養細胞において 6SG や TRPA1 既知刺激薬は 6 時間培養系で著明な ADM 遊離活性を示した。HAS も微弱ながら有意な活性を示した。これら活性は、TRPA1 拮抗薬 HC-030031 の共存で消失したので TRPA1 を介する。Ca や HCO<sub>3</sub> イオンの除外で活性消失がみられ、PKC の関与が示唆される。

(5)腸管上皮細胞の単離・同定・TRPA1 発現：小腸と大腸の腸管上皮細胞の単離・同定法を確立した。免疫染色では cytokeratin と E-cadherin が >90%、CD45, PGP9.5 と GFAP が 0%であった。これら細胞は、遺伝子レベル(RT-PCR)及び蛋白レベル(FACS)で、TRPA1 を発現することがわかった。

(6)脾臓細胞とサイトカイン：脾臓細胞は LPS 刺激で IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL17, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF が増加したが、ADM は IL6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF を選択的に抑制した。

(7)siRNA を用いた TRP 受容体解析：大建中湯の ADM 産生機序:Gapdh siRNA 処理により、Gapdh の mRNA 発現が著しく低下した。Green 標識 siRNA を加えた細胞では、蛍光発色が観察された。TRPV1, V2, V3, V4, V5, V6, A1 の siRNA の処理細胞では、大建中湯及び AITC 刺激による ADM 産生増強活性が減弱した。特に、TRPA1 ノックダウンで顕著であった。

(8)クローン病動物モデル(TNBS 腸炎)で大建中湯の薬理評価：腸炎惹起の 8 時間目から連日同剤を経口投与すると、病態形成が阻害され、同剤の抗腸炎作用と癒着形成阻害作用が確認された。大腸炎症部の粘膜内 IFN $\gamma$  と TNF $\alpha$  の蛋白量が同剤投与群で低値を示し、全身炎症マーカーである肝臓由来急性期蛋白質 (serum amyloid A) の血中濃度が同剤投与群で有意な減少を示した。潰瘍性大腸炎モデル(OXN 腸炎)でも、大建中湯投与による腸管の病態改善作用を確認した。

## 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 24 件)

1. Kono T, Kaneko A, Omiya Y, Ohbuchi K, Ohno N, Yamamoto M. Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 査読有 304: 428-36, 2013  
DOI:10.1152/ajpgi.00356.
2. Munekage M, Ichikawa K, Kitagawa H,

- Uehara H, Watanabe J, Kono T, Hanazaki K. Population Pharmacokinetic Analysis of Daikenchuto, a Traditional Japanese Medicine (Kampo) in Japanese and US Health Volunteers. *Drug Metab Dispos.* 査読有 2013; doi: 10.1124/dmd.112.050112.
3. 河野 透 Crohn 病の腸管病変に対する手術適応と術式の選択 *消化器外科* 36(1), 65-76, 2013
  4. Fischera A, Zoccali M, Kono T. Antimesenteric functional end-to-end handsewn (Kono-S) anastomosis. *J of Gastrointestinal Surgery* 査読有 2012;16(7), 1412-1416 doi: 10.1007/s11605-012-1905-7
  5. 河野 透, 岡本耕太郎, 高後 裕 Crohn 病腸管手術の新たな標準術式となる可能性と現状:Kono-S 吻合 *消化器内視鏡* 24(2), 251-257, 2012
  6. 河野 透, 上園 保仁 腸管血流からみた大建中湯の役割 アメリカ臨床治験薬 TU-100 になった理由 *医学のあゆみ* 241(2), 163-169, 2012
  7. 河野 透, 高後 裕、アレハンドロウイラ、大毛宏喜、坂井義治、前田耕太郎 達人こだわりの手術テクニック *手術* 65(10), 1355-1360, 2012
  8. 河野 透 海老澤良昭、千里直之、北川真吾、古川博之 炎症性腸疾患における機能温存手術の適応と限界 *北海道外科雑誌* 57(2): 20-25, 2012
  9. Kono T, Ashida T, Ebisawa Y, Chisato N, Okamoto K, Katsuno H, Maeda K, Fujiya M, Kohgo Y, Furukawa H. A new antimesenteric functional end to end hand-sewn anastomosis. Surgical prevention of anastomotic recurrence in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 査読有 54(5), 586-592, 2011 doi: 10.1007/DCR.0b013e318208b90f.
  10. Kono T, Omiya Y, Hira Y, Kaneko A, Chiba S, Suzuki T, Noguchi M, Watanabe T. Daikenchuto (TU-100) ameliorates colon microvascular dysfunction via endogenous adrenomedullin in Crohn's disease rat model. *J Gastroenterol.* 査読有 2011 46(10):1187-96. doi: 10.1007/s00535-011-0438-2.
  11. Munekage M, Kitagawa H, Ichikawa K, Watanabe J, Aoki K, Kono T, Hanazaki K. Pharmacokinetics of daikenchuto, a traditional Japanese medicine (kampo) after single oral administration to healthy Japanese volunteers. *Drug Metab Dispos.* 査読有 2011 39(10):1784-8. doi: 10.1124/dmd.111.040097.
  12. 河野 透 クロウン病外科治療の新たな展開 グラフ *日本医事新報* 4565, 67-72, 2011
  13. 河野 透 今のクロウン病治療に大建中湯が貢献できる可能性について *日本医事新報 一週一話* 2011
  14. 河野 透 漢方の CAM からの脱出:大建中湯を中心に *日薬理誌* 137, 13-17, 2011
  15. 河野 透 大建中湯のエビデンスと国際化 *老年医学* 49(6), 643-649, 2011
  16. 河野 透 腸管粘膜血流に対する漢方の作用 *消化器の臨床* 14(3), 246-251, 2011
  17. 河野 透 今のクロウン病治療に大建中湯が貢献できる可能性について *日本医事新報* 4548, 48-49, 2011
  18. Kono T, Kaneko A, Hira Y, Suzuki T, Chisato N, Ohtake N, Miura N, Watanabe T; Anti-colitis and -adhesion effects of daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in Crohn's disease mouse model. *Journal of Crohn's and Colitis*, 査読有 2010;4:161-170, 2010. doi: 10.1016/j.crohns.2009.09.006.
  19. 河野 透 クロウン病に外科的再発を防ぐ *INTESTINE* 14(5): 491-498, 2010
  20. 河野 透 Crohn 病小腸病変に対する治療効果 狭窄形成術の進歩 *胃と腸* 45(10): 1-6, 2010
  21. 河野 透 クロウン病に対する外科療法 法の進歩 *日本消化器病学会雑誌* 107(6): 876-884, 2010
  22. 花井恒一、前田耕太郎、升森 宏次、勝野秀稔、河野 透 腸管吻合-手縫い吻合について *手術* 64(10): 1483-1489, 2010
  23. 河野 透 消化管血流と漢方 G. I. *Research* 18(4): 268-275, 2010
  24. 河野 透 外科臨床に取り入れたい漢方治療とエビデンス *外科治療* 103(6): 539-544, 2010
- [学会発表] (計 8 件)
1. Activation of transient receptor potential A1 expressed in intestinal epithelial cell increases intestinal blood flow via release of adrenomedullin 全米消化器病週間 2010 2010 年 5 月 (ニューオリンズ) Kono T, Kaneko A, Omiya Y, Suzuki T, Koseki T, Hira Y, Chisato N, Watanabe T, Kohgo Y
  2. A new combined stapled and hand-sewn side-to-side anastomosis after resection for Crohn's disease 全米消

- 化器病週間 2010 2010年5月 (ニューオリンズ) Kono T, Ebisawa Y, Chisato N, Yamada S, Okamoto K, Maemoto A, Ashida T, Maeda K, Kohgo Y
3. Daikenchuto improves bowel microvascular dysfunction and inflammation in animal and clinical studies of Crohn's disease ASCRS 全米大腸肛門病外科学会 2010年5月 (ミネソタ) Kono T, Omiya Y, Kaneko A, Suzuki T, Koseki T, Hira Y, Chisato N, Watanabe T, Kohgo Y
  4. Transient receptor potential A1 is a new therapeutic target for intestinal microvascular dysfunction in Crohn's disease 2010 Advances in Inflammatory Bowel Diseases 2010年12月 (フロリダ) Kono T, Omiya Y, Hira Y, Kaneko A, Chiba S, Suzuki T, Furukawa H, Watanabe T
  5. Upregulation of fibrinolytic system by daikenchuto (TU-100)-induced adrenomedullin in mesothelial cell: A possible mechanism for prevention of peritoneal adhesion by TU-100 全米消化器病週間 2011 2011年5月 (シカゴ) Kono T, Suzuki T, Kaneko A, Ohno N, Kushida H, Hira Y, Omiya Y, Chisato N, Furukawa H, Watanabe T
  6. What is traditional Japanese Kampo medicine An Overview of Basic Clinical Challenges ISW 国際外科学週間 2011年9月 (横浜) Kono T
  7. Efficacy of a new combined stapled and hand-sewn antimesenteric functional end-to-end anastomosis after resection for Crohn's disease: a multicenter study in Japan and the United States 欧州クローン病腸炎学会 2012年2月 (バルセロナ) Kono T, Fichera A, Ebisawa Y, Chisato Y, Okayama T, Furukawa H, Okamoto K, Maemoto A, Ashida T, Kohgo Y, Katsuno H, Masumori H, Hanai K, Maeda K, Yamada M, Sakai Y, Shimizu W, Uegami S, Ohge H, Hanauer S
  8. Intraluminal TRPA1 agonists: an effective means to increase intestinal blood flow 全米消化器病週間 2012 2012年5月 (サンディエゴ) Kono T, Omiya Y, Kaneko A, Yamamoto M

[図書] (計3件)

1. 河野 透、前田耕太郎、坂井義治、大毛宏喜、Alessandro Fichera 新しい腸管吻合法: Kono-S 吻合 著書名: 炎症性腸疾患の外治療 pp139-145, 2013

2. 河野 透、千里直之、山田理大、海老澤良昭 再燃・再発防止を目指したクローン病の外科治療 著書名: 大腸疾患 NOW2010 日本メディカルセンター pp. 233-240

3. 河野 透 Topics 新しい治療法 著書名: クローン病の診療ガイド、編集者: NPO 法人日本炎症性腸疾患協会 2012

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河野 透 (KONO TORU)

旭川医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号: 60215192

##### (2) 研究分担者

鈴木 達也 (SUZUKI TATSUYA)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号: 40516415

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: