

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791513

研究課題名(和文) 大腸全摘および回腸囊肛門吻合術後の回腸囊粘膜変化の解明

研究課題名(英文) Assessment of ileal pouch mucosa after total proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis

研究代表者

渡辺 和宏 (WATANABE, KAZUHIRO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：30569588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎(UC)および家族性大腸腺腫症(FAP)の手術治療は、大腸全摘・回腸囊肛門吻合術(IPAA)が標準術式となっているが、合併症として回腸囊炎が知られている。回腸囊炎の原因はいまだはっきりしておらず、これらの病態の解明が、両疾患そのものの病態の解明につながる可能性を秘めている。本研究では、(1)潰瘍性大腸炎または家族性大腸腺腫症に対してIPAAを施行した症例を対象に経時的変化を追い、回腸囊炎を発症した症例における遺伝子変化の検討、および、(2)正常小腸粘膜と正常大腸粘膜の遺伝子発現プロファイルの検討、および(3)回腸間置マウスを作成しSham群との遺伝子発現の差異の検討を目的とした。

研究成果の概要(英文)：Restorative proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis (IPAA) is a standard operation for patients with "Ulcerative colitis (UC)" and "Familial adenomatous polyposis (FAP)". Pouchitis is a major complication after IPAA, which pathogenesis is unknown. The aim of this study is to evaluate (1) the time-dependent change of the gene expression at the pouch mucosa after IPAA, (2) the differences of gene expressions between colonic mucosa and small intestinal mucosa, and (3) the difference of gene expressions between "ileal interposition" mouse and sham mouse.

研究分野：外科

科研費の分科・細目：消化器外科

キーワード：潰瘍性大腸炎 家族性大腸腺腫症 回腸囊炎 大腸全摘術

1. 研究開始当初の背景

大腸全摘および回腸囊肛門吻合術 (Ileal-pouch Anal Anastomosis: 以下、IPAA) は、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; 以下、UC) および家族性大腸腺腫症 (Familial adenomatous polyposis; 以下、FAP) に対する現在の標準的根治術式であり、当科においても年間約 20 例に対して同手術を施行している。UC、FAP と原則として回腸に病変は認めない。しかし近年、IPAA 術後にももとの病変に類似した病変 (すなわち UC の場合は粘膜炎症 = 回腸囊炎、FAP においては多発性ポリープ = 回腸囊腺腫症) が回腸囊粘膜に出現することが明らかになりつつある。これらの事実から、IPAA は本当に UC、FAP の根治術式と言えるのか、という疑問が本研究を着想した経緯である。

回腸囊炎は UC に対する IPAA 術後の最も多い長期合併症であり、術後数年以内に発症することの多い、UC に酷似した粘膜炎症である。さらに家族性大腸腺腫症に対する同手術後には回腸囊炎は極めて稀であることなどから、「回腸囊炎は回腸囊における腸内環境の変化が粘膜の変化 (大腸化) を促し、これに伴い UC と同様の発症機序により慢性粘膜炎症が顕在化した病態、すなわち回腸囊における UC の再発ではないか」と考えられる。

一方 FAP に対する IPAA 術後患者が増加するにつれて、長期経過例のなかで回腸囊に多発性ポリープが発症する例が知られており、当院でも数名の症例を経過している。すなわち回腸囊炎と同じく、術後の回腸囊の大腸化が回腸囊腺腫症の背景にあるのではないかと考えられる。

< IPAA 術後の回腸囊粘膜変化に関するこれまでの研究と本研究計画の位置づけ >

近年の研究により、炎症性腸疾患の発症 / 増悪における腸内細菌叢やその産物、また種々のサイトカインやケモカインなどの関与が数多く報告され、炎症のプロセスは次第に明らかになりつつある。しかしその根本的な原因はなお不明であり、例えば「潰瘍性大腸炎はなぜ大腸に起こり小腸に起こらないのか」を説明できる理論は未だ存在しない。一方で現在 UC に対する IPAA 術後 20~50% に回腸囊炎が起こることが知られている。回腸囊炎は、血管透過性消失、びらん、出血、顆粒状粘膜など、UC と酷似した内視鏡所見を呈し、分子レベルでも IL-1 β 、-6、-8、ICAM-1、PAF、MMP 等の過剰発現といった UC 同様の異常を呈するが、その原因は UC 同様不明であり、また術後の回腸囊粘膜が形態的・機能的・分子レベルでどのように変化するのか明らかでない。また FAP 術後の回腸囊腺腫症は近年報告例が散見されるのみであり、その発症メカニズムに関する研究は殆ど行われていない。

本研究は IPAA 術後の回腸囊粘膜の変化、また動物モデルを用いて腸内環境の変化が回腸囊粘膜に与える変化を経時的に分子レベルで解明することにより回腸囊炎および回腸囊腺腫症の発症経過と機序を明らかにし、さらには潰瘍性大腸炎の病因解明の突破口を見つけようとするものである。

我々は過去 10 年間、炎症性腸疾患の病因 / 病態を明らかにすべく・無菌動物に常在腸内細菌叢を定着させる動物モデルを用いた研究、臨床検体から分離した培養細胞を用いた研究、IPAA 術後の腸内細菌叢の経時的变化の研究、等を行ってきた。その結果、腸内細菌やその産物が粘膜に与える形態と遺伝子発現 (HIP/PAP, SAA, RELM など) の変化、およびそれらと炎症性腸疾患との関連を明らかにし、また最近では IPAA 術後に回腸囊内の腸内細菌叢が経時的に大腸化することを報告し、内外から高い評価を得てきた。本研究計画はこれまでの研究をもとに、IPAA 術後の腸内環境の変化が粘膜の形態と機能に与える変化を明らかにするものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 潰瘍性大腸炎および家族性大腸腺腫症に対する大腸全摘・回腸囊肛門吻合術後患者の回腸囊粘膜の経時的变化を、臨床検体および動物モデルを用いて明らかにすること、さらに (2) 「回腸囊炎は、術後の回腸囊に起こる潰瘍性大腸炎の再燃である」とする仮説に基づき、潰瘍性大腸炎の病因解明につなげることである。

従来の炎症性腸疾患の研究では、既に炎症が進展し症状が出現した時点以降の状態を観察し用いることしかできなかった。回腸囊炎は IPAA 術後 20~50% に発症する病態であり、術後ある程度の発症が見込まれる。従って本研究では粘膜炎症の発症経過を臨床的な発症以前から調べることが可能であり、これにより従来の研究では捉えることのできなかった粘膜炎症のごく初期段階の過程を解明できる。この研究結果は回腸囊炎のみならず潰瘍性大腸炎の病因解明にも大きく寄与するであろう。また同時に、現時点では不明とされている FAP 術後の回腸囊腺腫症の発症機序解明の端緒となる結果が得られると予想される。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体を用いた検討:

(1)-1: 小腸と大腸の遺伝子発現プロファイル比較

標本の採取: 当科で施行される大腸癌に対する回盲部切除術 (あるいは右半結腸切除術) の標本より、同一人の正常回腸・結腸粘膜を採取する。

RNA 抽出: 上記検体の粘膜より、total RNA を抽出する。

Microarray 法による遺伝子発現の比較: 現在数社よりマイクロアレイ法による遺伝子発現解析が可能であり、これらにより回腸と結腸の遺伝子発現プロファイルを比較する。

(1)- : UC, FAP に対する IPAA 術後の回腸囊粘膜の経時的变化の検討

当科で施行している IPAA は全例に回腸瘻 (diverting loop ileostomy) を造設しており、術後 3~4 か月後に回腸瘻閉鎖術を行っている。回腸瘻閉鎖術直前、1 か月後、以後 3 か月毎に 2 年以内視鏡検査を行い、PDAI (Pouchitis disease activity index) による回腸囊炎の有無を評価する。同時に 6~8 カ所の粘膜を生検する。うち 1~2 個は H-E 染色および免疫染色による形態 / 蛋白発現の検討に用い、残りから RNA を抽出し後述の研究のサンプルとする。UC、家族性大腸腺腫症患者に対する大腸全摘・回腸囊肛門吻合術後の回腸囊粘膜を経時的に生検採取し、回腸囊炎・回腸囊腺腫症を発症した症例に対して、回腸囊粘膜の形態と遺伝子発現の変化を同定する。I- の結果により得られた大腸特異的遺伝子、あるいは小腸特異的遺伝子を各 10 個ずつ抽出する。これらの遺伝子発現のストマ閉鎖直前から 2 年後までの経時的变化を real-time PCR 法により検討する。また同時に得られた生検組織像と臨床症状により、回腸囊炎の有無を同定する。

(2) 動物モデルを用いた研究計画

(2)- : 回腸間置動物モデルの作成

マウスを用いた回腸間置モデルの作成を行う。まず 8~10 週齢の雄性マウスに全身麻酔下に開腹手術を行い、回腸末端約 5cm を結腸後半部に間置する。同じ部位の回腸を一旦切離した後、もとの部分に縫合したモデルを対照群として同時に作成する。このような手術により、「腸内環境が大腸である回腸」モデルを作成する。間置モデルと Sham 群を作成し、術後早期の体重変化を観察する。また、間置した回腸を術後 1, 6, 12 か月後に摘出する。H-E 染色による形態変化、マイクロアレイ法による遺伝子発現の変化、免疫染色法・Western blot 法による遺伝子発現の確認を上述のヒト検体を用いた研究と同様に行い、腸内環境の変化が腸管粘膜に与える変化を明らかにする。マウスを用いて回腸を大腸に空置し、腸内環境の変化が粘膜に与える変化を形態的 / 機能的 / 分子生物学的に明らかにする。

4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた検討:

(1)- : 小腸と大腸の遺伝子発現プロファイル比較

当科で施行される大腸癌に対する回盲部切除術 (あるいは右半結腸切除術) の標本より、同一人の正常回腸・結腸粘膜を採取した。上記検体の粘膜より、total RNA を抽出した

(total RNA 抽出はタカラバイオ株式会社に委託) Microarray 法による遺伝子発現の比較をおこなった (タカラバイオ株式会社に委託) が、得られた RNA の状態が不良のためマイクロアレイ法による遺伝子発現解析が困難であった。手術標本の採集タイミングなどの検討をおこない、再度、total RNA 抽出・マイクロアレイ法による遺伝子発現の解析を予定している。

(1)- : UC, FAP に対する IPAA 術後の回腸囊粘膜の経時的变化の検討

得られた臨床検体は、潰瘍性大腸炎 10 例、家族性大腸腺腫症 2 例と、当初の予測よりも少ない症例数であった。経時変化を追っていたが、回腸囊炎・回腸囊腺腫症を発症した症例を認めなかった。そのため、回腸囊炎・回腸囊腺腫症を発症した症例の臨床検体を得ることが出来なかった。また、実験 I- における、大腸特異的遺伝子、あるいは小腸特異的遺伝子の抽出結果が、total RNA の状態不良のためまだ得られておらず、現時点では、臨床検体の収集を中心に行っており、今後、回腸囊腺腫症を発症した症例に対して、前述の検討を行う予定である。

(2) 動物モデルを用いた研究計画

(2)- : 回腸間置動物モデルの作成

回腸間置マウス (4 頭) と Sham 群 (3 頭) を作成した (図 1)。しかしながら、回腸間置マウスは術後 1 週間以内に全頭死亡しており、当初予定していた検討に至らなかった。両群の術後体重を測定しており、回腸間置マウスの平均体重は、術後 1 日目 26.9g、術後 2 日目 22.6g、術後 3 日目 20.6g と減少しているのに対し、Sham 群の平均体重は、術後 1 日目 25.6g、術後 2 日目 26.4g、術後 3 日目 26.8g と減少は認めなかった。回腸間置の術式が、過大侵襲となっている可能性があり、術式の変更を予定している。

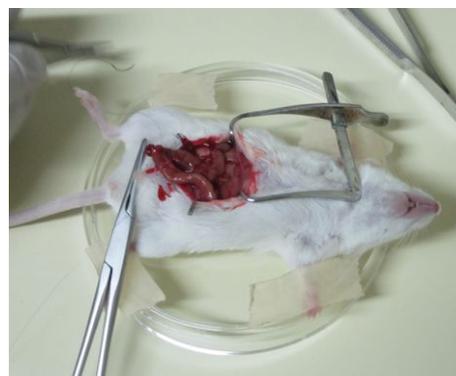


図 1: 回腸間置マウスの作成

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4件)

(1) Watanabe K, Sasaki I, Fukushima K, et al. Long-term Incidence and Characteristics of Intestinal Failure in Crohn's disease: A Multicenter Study. Journal of Gastroenterology, 査読有, Vol.49, No.2, 2014, pp.231-238

(2) 渡辺和宏、長尾宗紀、羽根田祥、他、Crohn病に対する外科治療 切除吻合法(手縫い吻合 vs 器械吻合): 東北大学法、外科、査読無、Vol.76、2014、pp.261-266

(3) 渡辺和宏、周術期における抗菌薬の適正使用. 炎症性腸疾患、外科、査読無、Vol.73、2013、pp.591-595

(4) 渡辺和宏、潰瘍性大腸炎 長期経過観察例の諸問題. 術後長期経過例の推移、臨牀消化器内科、査読無、Vol.26、2013、pp.1145-1151

〔学会発表〕(計7件)

Watanabe K, Sasaki I, Fukushima K, et al. Long-term Incidence and Characteristics of Intestinal Failure in Crohn's disease: A Japanese Multicenter Study. ECCO2014、2014年2月20日、コペンハーゲン、デンマーク

渡辺和宏、高齢者の重症潰瘍性大腸炎に対する外科治療の問題点、第67回日本消化器外科学会総会、2012年7月18日、富山

渡辺和宏、重症潰瘍性大腸炎の手術成績の比較検討～高齢者群 vs. 非高齢者群～、第98回日本消化器病学会総会、2012年4月19日、東京

渡辺和宏、クローン病における腸管不全(短腸症候群)の累積発生率の検討、JDDW2011、2011年10月20日、福岡

Watanabe K, The actuarial incidence of intestinal failure in Crohn's disease: thirty-five year experience. International Surgical Week 2011, 2011年8月28日、Yokohama

渡辺和宏、クローン病の手術症例における腸管不全(短腸症候群)の発生頻度の検討、第111回日本外科学会定期学術集会、2011年5月26日、東京

渡辺和宏、クローン病の術後長期症例における腸管不全(短腸症候群)の発生頻度と特徴、第97回日本消化器病学会総会、2011年5月13日、東京

〔図書〕(計2件)

(1) 渡辺和宏、佐々木巖、海野倫明、腸管不全例への対応、炎症性腸疾患の外科治療、pp.216-218(全254頁)、2013年

(2) 渡辺和宏、佐々木巖、海野倫明、新しい吻合法: Antimesenteric cutback end-to-end anastomosis、炎症性腸疾患の外科治療、pp.146-151(全254頁)、2013年

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 和宏 (WATANABE KAZUHIRO)

東北大学 医学研究科 非常勤講師

研究者番号: 30569588

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 秀幸 (SUZUKI HIDEYUKI)

東北大学大学院 生体調節外科学 大学院

生