

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591968

研究課題名(和文)小腸虚血再灌流障害に対するRhoキナーゼ阻害薬の効果とメカニズムの解明

研究課題名(英文)The effect and mechanism of Rho kinase inhibitors on small bowel reperfusion injury

研究代表者

竹吉 泉 (TAKEYOSHI, IZUMI)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60272233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Rhoキナーゼ阻害剤による小腸虚血再灌流障害の軽減の効果を検討した結果、再灌流12時間後に生食投与群に対しRhoキナーゼ阻害剤投与群はSMA血流量と小腸粘膜血流量の有意な改善と、組織学的小腸粘膜障害の軽減を認め、小腸虚血再灌流障害を軽減した。そのメカニズムを調べるためeNOSの発現をWestern blotsで検討したが、ポジティブな結果は得られなかった。Rhoキナーゼの活性化は単球走化性因子-1(MCP-1)の遺伝子発現を促進的に制御し、eNOSの遺伝子発現を抑制的に制御するとの報告があるため、eNOSやMCP-1等の免疫染色やPCRやELISAをおこなって現在検討中である。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the effect of Rho kinase inhibitors on small bowel reperfusion injury. Administration of Rho kinase inhibitor significantly increased blood flow of the SMA and the mucous membrane of the small bowel at 12 hours after reperfusion, when compared to administration of normal saline. This effect was also confirmed by histology. Rho kinase is known to down-regulate the expression of eNOS and to up-regulate the expression of MCP-1. To investigate the underlying mechanism of Rho kinase inhibitor on reduction of reperfusion injury, we examined the levels of eNOS expression by western blot analysis, however this did not show positive results. We are further examining eNOS and MCP-1 expression by immunohistochemical and PCR analysis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：虚血再灌流障害 小腸 Rhoキナーゼ nitric oxide

1. 研究開始当初の背景

小腸の虚血再灌流障害は小腸移植のみでなく、小腸の軸捻転症などでも生じてくる病態で、小腸障害のみでなく、同時に全身の炎症性反応をきたし、肺、肝、腎、等、遠隔臓器障害をきたす。小腸は内腔が外界と連続し、管腔内に多数の腸内細菌叢が存在し、虚血再灌流障害による粘膜障害がおこり、粘膜のバリア機構が破たんすると、いわゆるバクテリアルトランスロケーションを引き起こし、遠隔臓器障害、敗血症、多臓器不全等の全身的影響を及ぼす。小腸虚血再灌流障害の発生機序としては様々な要因が存在する。TNF α 、IL-1等の炎症性サイトカインの産生、フリーラジカルの産生、PGI $_2$ 、TXA $_2$ 、LT等のアラキドン酸代謝産物の産生、さらには血管作動性物質の産生、白血球の遊走と集積、微小循環の破綻等から低酸素血症、細胞障害の発生に至る。現在でも、虚血再灌流障害に関与する多くのメディエーターとその機序、さらには障害抑制のための研究がなされ報告されている。

Rho キナーゼ阻害剤はくも膜下出血術後の脳血管攣縮およびこれに伴う脳虚血症状の改善として臨床で使用されているが、これは Rho キナーゼの主な作用である平滑筋細胞の収縮を抑えることによる。これまでの研究により Rho キナーゼは平滑筋の収縮のみならず、各種細胞の形態制御、遊走、遺伝子発現制御などの生理機能に関与していることが明らかとなっており、虚血再灌流障害臓器の血管内皮細胞における Rho キナーゼの増加も報告されている。Rho キナーゼの遺伝子発現制御においては、多くの報告があるが、虚血再灌流障害に深く関わるものとしては、内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase: eNOS) が挙げられる。NO は内皮に由来する血管弛緩性因子として知られている。肺の虚血再灌流障害において外因性に NO を吸入すると血管拡張をきたし、再灌流後の臓器血流を維持、改善することにより組織障害を軽減するとされる。小腸の虚血再灌流においても NO は保護的に働くとする報告が多い。NO 産生抑制薬 (L-NAME) の投与による再灌流障害の増強、NO donor 投与による再灌流障害の軽減が報告されている。Rho キナーゼの活性化は eNOS を抑制的に制御することが知られている。

近年イヌの冠動脈虚血再灌流モデルで Rho キナーゼ阻害剤の前投与により再灌流後の心筋梗塞の発生が抑制されることが報告されている。これは Rho キナーゼ阻害剤の投与により冠動脈における Rho キナーゼの活性化が阻害され、セロトニンに対する過収縮及びアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応の低下が起こることを防ぎ、かつ eNOS の発現を維持することにより心筋梗塞の発症が抑えられたといわれている。なお、Rho キナーゼには、好中球における遊走や活性酸素産生にも関与していることが報告されてお

り、また、Rho キナーゼがアラキドン酸によっても活性化されることが報告され、これらの作用を介した Rho キナーゼの病態への関与も考えられる。Rho キナーゼは線虫やショウジョウバエなどの下等動物からげっ歯類、ヒトまで広く保存されており、体内に広く発現している遺伝子であり、Rho キナーゼ阻害剤の虚血前投与は小腸の虚血再灌流障害の軽減も大いに予想される。

2. 研究の目的

Rho キナーゼ阻害剤の心血管病への効果に関する報告は多いが、小腸への効果に関する報告はほとんどない。今回、Rho キナーゼ阻害剤投与による小腸虚血再灌流障害の軽減の効果につき検討し、NO やアラキドン酸、サイトカイン、好中球遊走能などの関与について検討したい。

3. 研究の方法

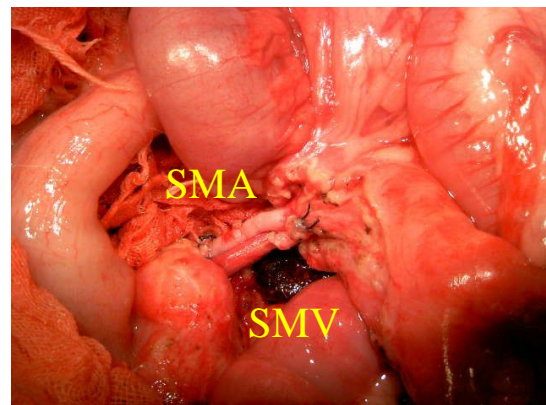
【対象と方法】

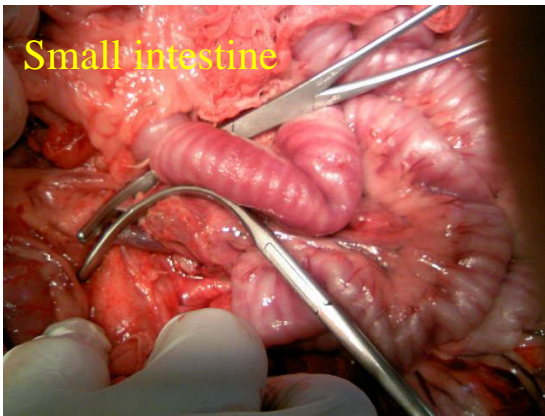
(1) 体重 10 kg 前後のビーグル犬を用いる。24 時間絶食後に ketamine hydrochloride (2mg/kg) を筋注後、pentobarbital sodium (15mg/kg) 静注、挿管し、レスピレーターを装着する。Isoflurane 1~2% で維持する。筋弛緩として pancuronium bromide (0.1mg/kg) を用いる。1 回換気量は 20ml/kg、換気回数は 10 回とする。

(2) 右大腿動脈より動脈圧モニター用のカテーテルを挿入し、腹部大動脈に先端を位置する。輸液ラインは右大腿静脈より挿入し、下大静脈に先端を位置する。輸液量は再灌流後 6 時間までは 30ml/kg/hr、以降 15ml/kg/hr とする。

(3) 腹部正中切開で開腹する。上腸間膜動静脈をスケルトニングし、空腸口側、回腸肛門側を離断する。上腸間膜動静脈をクランプし、2 時間の虚血を行う。再灌流を行い、1 時間後に口側断端を端々吻合する。肛門側断端は組織採取目的のためストーマとする。再灌流 6 時間後に閉腹し、麻酔を覚ます。12 時間後まで観察を行う。カテコールアミンは使用しない。

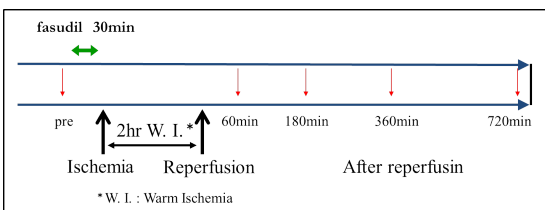
尚本実験モデルは以前より教室の研究で使われてきた確立されたモデルである。¹⁾⁻⁸⁾





【実験群】

- ・ Control 群 (Rho キナーゼ阻害剤を投与しない群)
- ・ Rho キナーゼ阻害剤投与群



【測定項目・測定時間】

- 1) 血液ガス測定
血流遮断前, 虚血 1 時間後, 再灌流直前, 再灌流 15 分後, 1 時間後, 3 時間後, 6 時間後, 12 時間後
- 2) 尿量 (血流遮断 30 分前から測定し, 時間尿量で計算)
血流遮断前, 再灌流直前, 再灌流 1 時間後, 3 時間後, 6 時間後, 12 時間後
- 3) SMA blood flow
血流遮断前, 再灌流 1 時間後, 3 時間後, 6 時間後, 12 時間後
- 4) 小腸病理組織学的検討 (HE 染色による組織障害の検討, 免疫染色による eNOS の発現)
血流遮断前, 再灌流直前, 再灌流 1 時間後, 3 時間後, 6 時間後, 12 時間後
- 5) 肺病理組織学的検討 (HE 染色による組織障害の検討, 免疫染色による eNOS の発現)
12 時間後
- 6) 動脈血圧
最後までモニタリング
- 7) Tissue blood flow
血流遮断前, 再灌流 1 時間後, 3 時間後, 6 時間後, 12 時間後

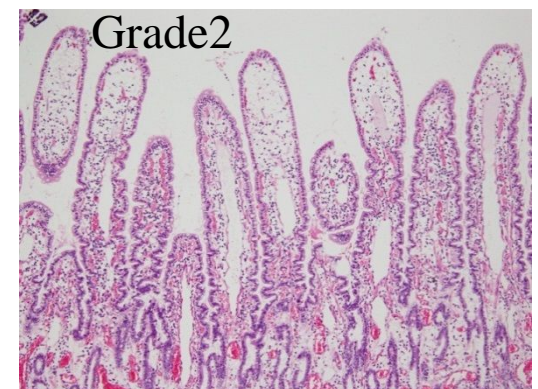
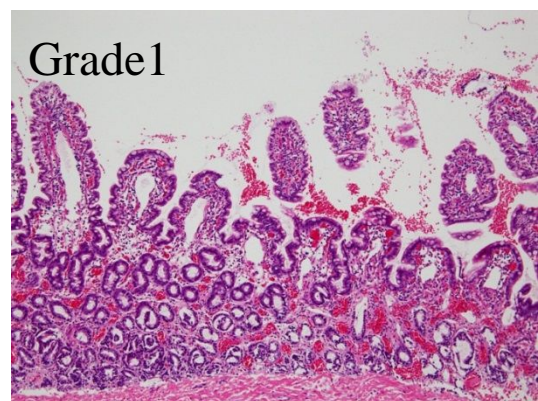
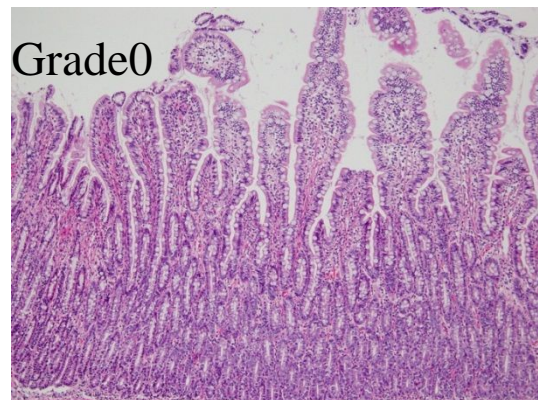
実験で採取した検体をもとに血中および小腸組織、遠隔臓器の障害の指標となる肺組織のサイトカイン濃度, 小腸および肺組織 eNOS の発現 (Western blots), eNOS の mRNA の発現 (PCR), アラキドン酸, MCP-1 などについても検討する。また, Rho キナーゼの発現をみるため ELISA 法によって Rho キナーゼファミリーの活性化を測定し, さらに Rho キナー

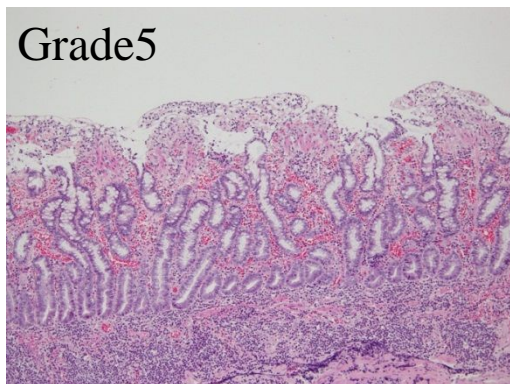
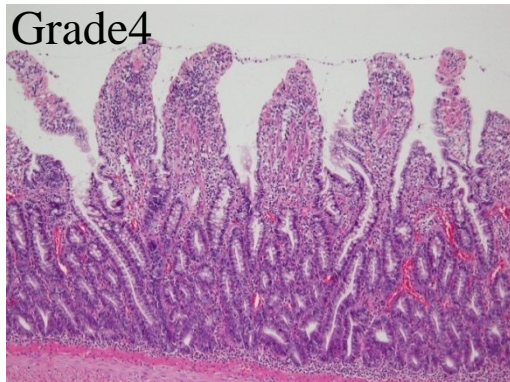
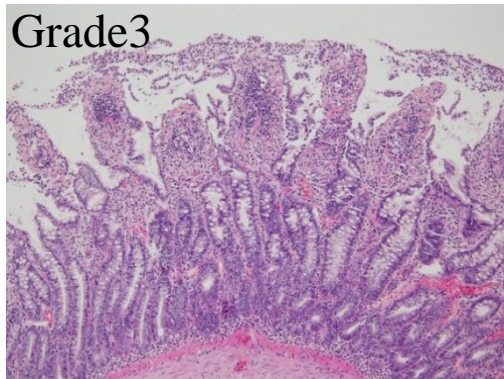
ゼ mRNA の発現を調べる。

Chiu の分類
組織学的障害度を chiu の分類を使って比較した。⁹⁾

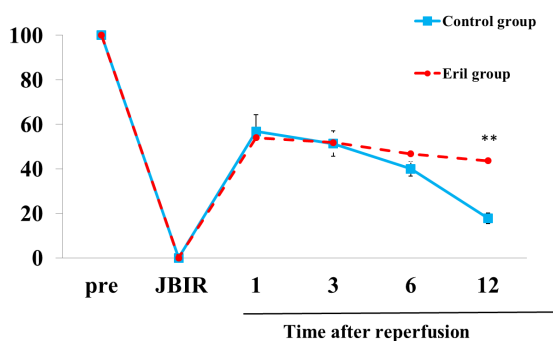
**Microscopic Criteria
for Grading Intestinal Mucosal Injury**

Grade	Description
0	Normal mucosal villi
1	Slight elevation of epithelium from lamina propria at apex of villus
2	Moderate elevation of epithelial layer from lamina propria
3	Massive epithelial elevation extending down sides of villi
4	Denuded villi with lamina propria exposed and dilated capillaries
5	Disintegration of lamina propria; hemorrhage and ulceration



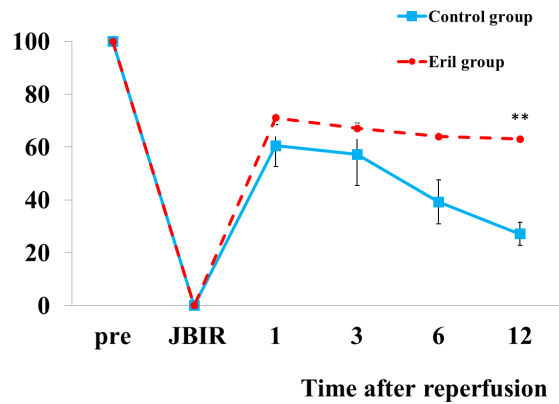


4. 研究成果 SMA 血流回復率



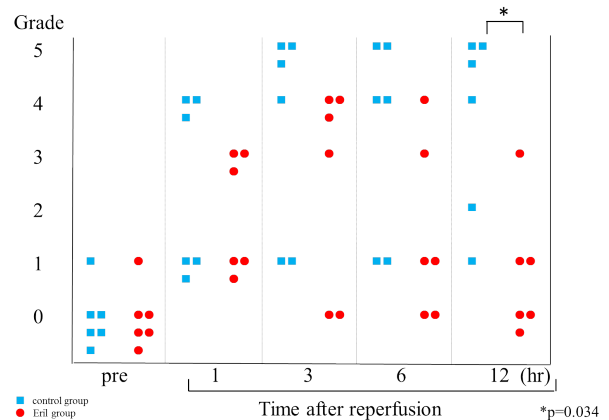
SMA の血流は再灌流後 control 群が時間の経過とともに徐々に悪化するのに対し、Rho キナーゼ阻害剤投与群は比較的保持され再灌流 12 時間後は Rho キナーゼ阻害剤投与群が有意に良好な値をとった。

小腸粘膜血流回復率



小腸粘膜組織の血流回復率は control 群が時間の経過とともに徐々に悪化するのに対し、Rho キナーゼ阻害剤投与群は比較的保持され再灌流 1 時間後からやや良好な値であったが、再灌流 12 時間後は Rho キナーゼ阻害剤投与群が有意に良好な値をとった。

組織学的障害度



再灌流 12 時間後の組織学的障害は Rho キナーゼ阻害剤投与群が有意に軽度であった。

動脈血圧、血液ガス(酸素化と PH)、尿量においては有意差はなかった。肺組織と小腸組織の eNOS の western blot を行ったが、いずれもバンドが描出できなかった。eNOS や MCP-1 等の免疫染色や PCR や ELISA をおこなってメカニズムについて現在検討中である。この結果が出次第、研究分担者の高橋憲史が論文として英文で提出する予定である。

<引用文献>

- 1) Suto Y, Oshima K, Arakawa K, Sato H, Yamazaki H, Matsumoto K, Takeyoshi I. The effect of nicorandil on small intestinal ischemia-reperfusion injury in a canine model. Dig Dis Sci. Aug;56(8):2276-82, 2011
- 2) Sato H, Oshima K, Arakawa K, Kobayashi K, Yamazaki H, Suto Y, Takeyoshi I. Direct

hemoperfusion with a polymyxin B-immobilized cartridge in intestinal warm ischemia reperfusion. World J Gastroenterol. 21;14(35):5436-41, 2008

- 3) Arakawa K, Takeyoshi I, Akao T, Totsuka O, Matsumoto K, Morishita Y. Bradykinin B2 receptor antagonist FR173657 ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. Dig Dis Sci. 50:27-36, 2005.
- 4) Arakawa K, Takeyoshi I, Muraoka M, Matsumoto K, Morishita Y. Measuring platelet aggregation to estimate small intestinal ischemia-reperfusion injury. J Surg Res. 122:195-200, 2004.
- 5) Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Tsutsumi H, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. The effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on small bowel ischemia-reperfusion injury. Hepatogastroenterology. 50:1970-1974, 2003.
- 6) Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. A spontaneous nitric oxide donor ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. Dig Dis Sci. 46:1748-1756, 2001.
- 7) Takeyoshi I, Iwanami K, Ohwada S, Kawashima Y, Kawata K, Aiba M, Kobayashi J, Koyama T, Matsumoto K, Satoh S, Morishita Y. Effect of FR167653 on small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. Dig Dis Sci. 44:2334-2343, 1999.
- 8) Iwanami K, Takeyoshi I, Ohwada S, Kobayashi J, Kawata K, Matsumoto K, Morishita Y. Intramucosal pH and intestinal mucosal damage in ischemia-reperfusion injury. Transpl Int. 11:401-407, 1998.
- 9) Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN: Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. Arch Surg 101: 478-483, 1970

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

第 113 回日本外科学会定期学術集会(2013 年 4 月 11 日～13 日, 福岡)

小腸虚血再灌流に対する塩酸ファスジルの効果について

The effect of fasudil hydrochloride on small intestinal ischemia-reperfusion injury

高橋憲史, 大嶋清宏, 佐藤弘晃, 山崎穂高, 須藤雄仁, 田中和美, 松本光司, 竹吉泉

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹吉 泉 (TAKEYOSHI, Izumi)

群馬大学・医学系研究科・教授

研究者番号 : 60272233

(2)研究分担者

高橋 憲史 (TAKAHASHI, Norifumi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 10599541

須納瀬 豊 (SUNOSE, Yutaka)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 90375543

(平成 26 年 12 月 31 日 分担者削除)