

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791887

研究課題名(和文)二光子レーザー顕微鏡リアルタイムイメージングによるクローン病への薬剤効果判定

研究課題名(英文) In vivo real-time visualization of therapeutic pharmacodynamics in Crohn's disease model mice using two photon laser scanning microscopy

研究代表者

井上 幹大 (Inoue, Mikihiro)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30422835

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)：マウスIBDモデルを用い治療薬の一つである抗TNF 抗体の治療効果を、二光子励起顕微鏡を用い生体内リアルタイムイメージングし形態学的に解析した。

二光子励起顕微鏡下生体内観察では、漿膜から筋層にかけて浸潤した炎症細胞数(day14)は、IFX群ではnon-IFX群より少なかった。陰窩の長さはIFX投与群ではnon-IFX群より長かった。IFXは炎症細胞浸潤の消褪を促進するだけでなく、陰窩上皮細胞の再生を促進し陰窩の回復を促進していると考えられた。蛍光標識抗TNF- $\alpha$ 抗体は粘膜固有層、粘膜下層への集積や後毛細管細静脈内皮に接着している白血球や陰窩内浸潤白血球表面への結合が可視化できた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to visualize and analyze in vivo therapeutic response of infliximab (IFX) in the murine IBD model using two photon laser scanning microscopy (TPLSM).

The number of leukocytes infiltrating to subserosa and muscular layer was reduced in IFX-treated mice, compared with non-IFX, control mice. The length of colonic crypt was increased in IFX-treated mice, compared with non-IFX, control mice. Serial change in regenerative epithelial cells was not observed, which regenerated from the bottom of the crypt toward the top of the crypt (the luminal side). The fluorescence labeled anti-TNF- $\alpha$  antibody was observed in the mucosal stroma, suggesting the binding of labeled antibodies with free TNF- $\alpha$  in the colonic tissue. It was also observed in the surface of leukocytes within the postcapillary venules or those infiltrating into the damaged crypt, suggesting the binding of labeled antibodies with the membrane binding TNF- $\alpha$  of the surface TNF- $\alpha$  producing cells.

研究分野：消化器外科

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：二光子レーザー顕微鏡 クローン病 生体内イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

クローン病(Crohn's Disease: CD)は潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis: UC)と並ぶ炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)の一つである。近年、世界的に発症年齢の低年齢化が進み、小児発症数が増加している。この慢性難治性腸疾患の原因は今尚不明であるが、精力的な研究によりその複雑な病態が分子レベルで解明されつつある。現在、CDは遺伝的異常による疾患感受性の亢進、腸内細菌の変化、自然免疫の異常、獲得免疫の異常、免疫恒常性の破綻などが複雑に絡み合って発症する多因子疾患と考えられている。しかし、さらなるCDの病態解明には、従来の分子生物学的手法、病理組織学的手法を中心とした研究に加え、生きた生命現象としてのCD発症機序及びその病態を実体的かつ統合的に捉えることが必要である。

二光子レーザー顕微鏡(Two-Photon Laser Scanning Microscopy; TPLSM)は物質励起に二光子過程を利用した顕微鏡である。長波長の励起光を用いるため、共焦点顕微鏡より退色・光毒性が低く、生きたままの組織や細胞の観察が可能であるだけでなく、組織表面から数百マイクロメートルといった深部観察(我々の腹腔内臓器の生体内イメージングでは約400 $\mu$ mまで)も可能である。また、蛍光波長の異なる二つの蛍光色素(Green Fluorescent Protein; GFPとRed Fluorescent Protein; RFPなど)を1波長で同時励起する多重同時染色も可能である。

近年、マウスIBDモデルにおける抗TNF $\alpha$ 抗体; infliximab (IFX)の抗炎症効果の報告が散見され、我々も独自に開発したTPLSMを用いた生体内三次元消化管全層観察法(serosal approaching technique)によりIFXの治療効果を可視化し形態学的に解析する。

## 2. 研究の目的

クローン病治療薬の一つである抗TNF $\alpha$ 抗体の治療効果を、二光子レーザー顕微鏡を用いた生体内リアルタイムイメージングで形態学的に解析する。

## 3. 研究の方法

<2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸誘発性大腸炎: TNBS colitis model>

100mg/kg TNBSを経肛門的投与しTNBS colitis modelを作成し評価を行った。

<デキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎: DSS colitis model>

2% DSSを6日間自由飲水させDSS colitis modelを作成し評価を行った。

<クローン病治療薬>

DSS colitis modelにおけるinfliximab (IFX, Mitsubishi Tanabe Pharma, Japan)の効果を

臨床的及び形態学的に評価した。

<二光子レーザー顕微鏡 (Two photon laser scanning microscopy: TPLSM)>

大腸の創外脱転による固定(patent number: 5268282)と大腸切開することなく漿膜側から粘膜側まで大腸全層を断層像で観察できる serosal-approaching methodにより、大腸をTPLSMで生体内リアルタイムイメージングした。

<蛍光標識抗TNF抗体の生体内可視化>

Zenon Alexa Fluor 標識キット (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用い、抗TNF抗体 (Rabbit polyclonal, abcam, MA, USA)をAlexa Fluor 594で蛍光標識後、経静脈的に投与。その結合部位を生体内リアルタイムイメージングした。

## 4. 研究成果

### TNBS colitis model

TNBSの経肛門的注入によるTNBS colitisをTNBS濃度と投与回数などの条件を変えながら大腸炎の程度及び範囲を評価した。大腸の炎症の主座は主に遠位側大腸であり、TPLSMを用いた大腸の生体内リアルタイムイメージングに必要な大腸の創外脱転と固定がやや困難な位置である。遠位側大腸の創外脱転と固定を工夫したが、手技的安定性が低く、再現性のある炎部位の生体内イメージングが得られにくかった。

よって、二光子レーザー顕微鏡リアルタイムイメージングによる抗TNF抗体の治療効果解析にデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎(DSS colitis)をIBDモデルとして用いることにした。

### DSS colitisにおけるIFXの臨床的治療効果

体重減少率の経時的変化は、day7にIFX 10mg/kg投与するIFX群(n=10)ではday8に-4.29g、day14に-0.59gであった。一方non-IFX群(n=10)ではday8:-6.71g、day14:-3.57gであり、IFXが大腸炎による体重減少を抑制していると考えられた(Figure 1)。全大腸の長さはIFX群(n=10)では7.7cm(day14)、9.62cm(day21)。一方non-IFX群(n=10)では7.09cm(day14)、9.52cm(day21)であり、IFXが大腸炎による大腸短縮を抑制していると考えられた(Figure 2-A)。臨床的スコアは、IFX群(n=10)では9点(day9)、4点(day14)、0点(day21)であり、non-IFX群より低値であり、IFXはマウスDSS colitisに対して臨床的治療効果を認めた(Figure 2-B)。

Figure 1. 体重と体重減少

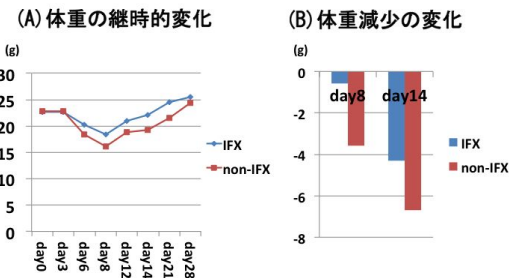
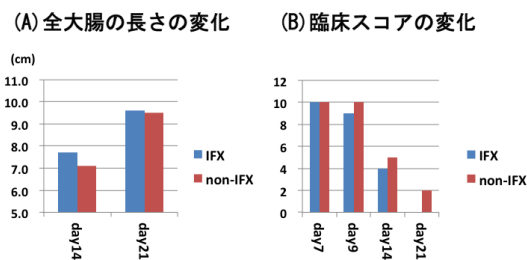


Figure 2. 大腸の長さ及び臨床スコア

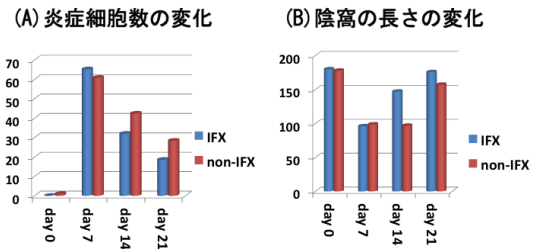


### TPLSM を用いた生体内リアルタイムイメージングによる IFX の組織学的治療効果

DSS colitis に対する IFX の組織学的治療効果を、TPLSM を用いた生体内リアルタイムイメージングで評価した。

TPLSM を用いた盲腸の生体内リアルタイムイメージングでは、漿膜から管腔側粘膜までの断層像が任意の倍率で画像解析できる。細胞レベルの解析には、水浸 600 倍で  $200 \times 200$  マイクロメートルの視野(単位面積としての field of view: FOV) で平均 10 の陰窩が観察できる。漿膜から筋層にかけて浸潤した炎症細胞数 (day14) は、IFX 群では 32 個/FOV, non-IFX 群では 42.4 個/FOV であり、IFX が炎症消退を促進していることが示唆された (Figure 3-A)。陰窩底部から頂部(管腔側)までの断層像解析から陰窩の長さを測定すると、正常では約 180 マイクロメートルで、DSS 7day では約 90 マイクロメートルに減少する。IFX 群 (day14; IFX 投与後 7 日目) では陰窩の長さは 147.1 マイクロメートル、non-IFX 群では 96.9 マイクロメートルであり、陰窩上皮細胞の再生を促している可能性が示唆された (Figure 3-B)。

Figure 3. 炎症細胞及び陰窩の長さ



### TPLSM を用いた生体内リアルタイムイメージングによる抗 TNF 抗体の生体内動態

IFX の生体内動態を解析するため、DSS colitis の極期(DSS 投与後 7-10 日目)に蛍光標識抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与した。抗体は粘膜固有層、粘膜下層に集積し遊離型 TNF と結合し中和していると考えられた (Figure 4)。また後毛細管細静脈内皮に接着している白血球や陰窩内浸潤白血球表面への結合が観察され、TNF 産生細胞の膜結合型 TNF と結合しその産生を阻害していると考えられた (Figure 5)。IFX には TNF- $\alpha$  標的細胞上に発現する TNF- $\alpha$  受容体に結合した TNF- $\alpha$  に結合し、標的細胞から TNF- $\alpha$  を解離する機序も報告されているが、我々の実験系では生体内可視化できなかった。

Figure 4. 蛍光標識抗TNF- $\alpha$ 抗体

(A) 粘膜固有層に集積 (B) 白血球表面に集積 (後毛細管細静脈内皮)

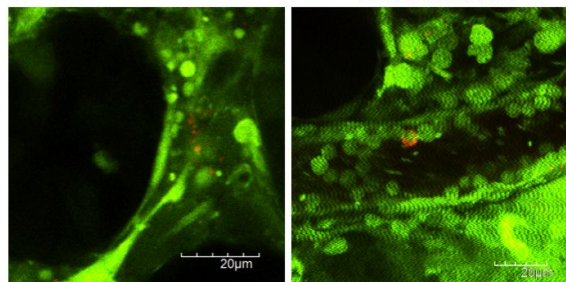
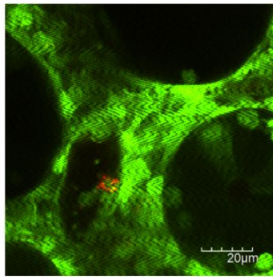


Figure 5. 蛍光標識抗TNF-α抗体

(B) 白血球表面に集積  
(陰窩内浸潤白血球)



## 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 15 件)

1. Araki T, Uchida K, Okita Y, Fujikawa H, Inoue M, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. The impact of postoperative infliximab maintenance therapy on preventing the surgical recurrence of Crohn's disease: a single-center paired case-control study. Surg Today. 2014 Feb;44(2):291-296. (査読有り)
2. Koike Y, Uchida K, Inoue M, Ide S, Hashimoto K, Matsushita K, Otake K, Okita Y, Araki T, Kobayashi M, Mohri Y, Kusunoki M. Infantile Crohn's disease is one of the risk factors of Catheter-related Blood Stream Infection. Pediatr Int. 2014 Feb 12. (査読有り)
3. Yoshida K, Araki T, Uchida K, Okita Y, Fujikawa H, Inoue M, Tanaka K, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. Sexual activity after ileal pouch-anal anastomosis in Japanese patients with ulcerative colitis. Surg Today. 2014 Jan;44(1):73-79. (査読有り)
4. Koike Y, Uchida K, Nakazawa M, Inoue M, Kusunoki M, Tsukamoto Y. Predictive factors of negative outcome in initial atropine therapy for infantile hypertrophic pyloric stenosis. Pediatr Int. 2013 Oct;55(5):619-623. (査読有り)
5. Okita Y, Araki T, Tanaka K, Hashimoto K, Kondo S, Kawamura M, Koike Y, Otake K, Fujikawa H, Inoue M, Ohi M, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Predictive Factors for Development of Chronic Pouchitis after Ileal Pouch-Anal Anastomosis in Ulcerative Colitis. Digestion. 2013 Aug 15;88(2):101-109. (査読有り)
6. Inoue M, Uchida K, Otake K, Nagano Y, Ide S, Hashimoto K, Matsushita K, Koike Y, Mohri Y, Kusunoki M. Efficacy of Seprafilm for preventing adhesive bowel obstruction and cost-benefit analysis in pediatric patients undergoing laparotomy. J Pediatr Surg. 2013 Jul;48(7):1528-1534. (査読有り)
7. Koike Y, Uchida K, Hashimoto K, Matsushita K, Otake K, Inoue M, Kusunoki M. Primary liver transplantation for biliary atresia after percutaneous transhepatic cholangio-drainage. Journal of Pediatric Surgery Case Reports July 2013(Vol. 1, Issue 7,Pages 183-185) (査読有り)
8. Koike Y, Uchida K, Inoue M, Ohtsu K, Tanaka T, Otake K, Tanaka K, Kusunoki M. Hairy polyp can be lethal even when small in size. Pediatr Int. 2013 Jun;55(3):373-376. (査読有り)
9. Kitajima T, Inoue M, Uchida K, Otake K, Kusunoki M. Scar endometriosis in a patient with bladder exstrophy. Int Surg. 2013 Apr-Jun;98(2):145-148. (査読有り)
10. Okita Y, Araki T, Tanaka K, Shimura T, Kawamura M, Fujikawa H, Inoue M, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Characteristics of extremely early-onset pouchitis after proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis. J Gastrointest Surg. 2013 Mar;17(3):533-539. (査読有り)
11. Uchida K, Kawamata A, Hashimoto K, Inoue M, Otake K, Koike Y, Matsushita K, Fujikawa H, Okita Y, Araki T, Tanaka K, Kusunoki M. Self-reported assessment of health-related quality of life in children who underwent restorative proctocolectomy with ileal J-pouch anal anastomosis for ulcerative colitis. Pediatr Surg Int. 2013 Mar;29(3):287-291. (査読有り)
12. Inoue M, Uchida K, Otake K, Okigami M, Okita Y, Hiro J, Araki T, Kusunoki M. Transumbilical single-incision laparoscopic ileocecal resection for Crohn's disease in a child. Asian J Endosc Surg. 2013 Feb;6(1):48-51. (査読有り)
13. Uchida K, Yoshiyama S, Inoue M, Koike

Y, Yasuda H, Fujikawa H, Okita Y, Araki T, Tanaka K, Kusunoki M. Double balloon enteroscopy for pediatric inflammatory bowel disease. *Pediatr Surg Int.* 2012 Dec;54(6):806-809. (査読有り)

14. Uchida K, Otake K, **Inoue M**, Koike Y, Matsushita K, Hashimoto K, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M. Unique capsule endoscopic appearance of segmental intestinal dilatation in a child. *Pediatr Int.* 2012 Oct;54(5):727-729. (査読有り)
15. **Inoue M**, Uchida K, Otake K, Ishino Y, Koike Y, Kusunoki M. Use of Endoscopic Surgical Spacer to Improve Safety During Thoracoscopic Repair of Congenital Diaphragmatic Hernia. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2012 Apr;22(3):304-306. (査読有り)

[学会発表](計8件)

1. **第26回日本内視鏡外科学会総会**、平成25年11月28~30日、福岡国際会議場  
小児炎症性腸疾患に対する単孔式内視鏡手術と Reduced Port Surgery、**井上 幹大**、内田 恵一、廣 純一郎、森 浩一郎、井出 正造、小池 勇樹、藤川 裕之、大竹 耕平、大北 喜基、荒木 俊光、楠 正人
2. **第26回日本内視鏡外科学会総会**、平成25年11月28~30日、福岡国際会議場  
大腸手術における Reduced Port Surgery の意義と定義 大腸全摘出・J型回腸囊肛門吻合術に対する Reduced Port Surgery の意義、廣 純一郎、荒木 俊光、井上 靖浩、大北 喜基、藤川 裕之、川本 文、**井上 幹大**、問山 裕二、田中 光司、毛利 靖彦、楠 正人
3. **第26回日本外科感染症学会総会**、平成25年11月25~26日、神戸国際会議場  
二光子励起顕微鏡を用いたマウス敗血症モデルにおける Neutrophil Extracellular Traps の生体内可視化、田中 光司、小池 勇樹、志村 匡信、井出 正造、今岡 裕基、近藤 哲、北嶋 貴仁、問山 裕二、小林 美奈子、**井上 幹大**、井上 靖浩、荒木 俊光、内田 恵一、毛利 靖彦、楠 正人
4. **第75回日本臨床外科学会総会**、平成25年11月21~23日、名古屋国際会議場  
二光子励起顕微鏡を用いたマウス敗血症モデルにおける組織末梢循環不全と Antithrombin III 製剤効果の生体内可視化、田中 光司、志村 匡信、井出 正造、今岡 裕基、近藤 哲、北嶋 貴仁、問山 裕二、奥川 喜永、小林 美奈子、**井上 幹大**、井上 靖浩、荒木 俊光、内田 恵一、

毛利 靖彦、楠 正人

5. **第68回日本大腸肛門病学会学術集会**、平成25年11月15~16日、京王プラザホテル  
クローン病の肛門病変の治療と成績 新生児・乳児期発症クローン病の肛門病変と治療、内田 恵一、**井上 幹大**、大竹 耕平、小池 勇樹、藤川 裕之、大北 喜基、荒木 俊光、廣 純一郎、大井 正貴、問山 裕二、三枝 晋、田中 光司、井上 靖浩、毛利 靖彦、楠 正人
6. **第40回日本小児内視鏡研究会**、平成25年7月6日、聖マリアンナ医科大学  
小児における小腸ダブルバルーン内視鏡施行時の放射線被曝、**井上 幹大**、内田 恵一、井出 正造、今岡 裕基、小池 勇樹、大竹 耕平、楠 正人
7. **第50回日本小児外科学会学術集会**、平成25年5月30日~6月1日、京王プラザホテル  
回盲部切除後の寛解維持療法としてインフリキシマブ投与を行った小児クローン病症例の検討、**井上 幹大**、内田 恵一、井出 正造、橋本 清、小池 勇樹、藤川 裕之、大北 喜基、大竹 耕平、荒木 俊光、楠 正人
8. **第50回日本小児外科学会学術集会**、平成25年5月30日~6月1日、京王プラザホテル  
小児内視鏡手術の展望 小児に対する Reduced Port Surgery による腹腔鏡下大腸全摘回腸囊肛門吻合術、**井上 幹大**、廣 純一郎、井出 正造、橋本 清、小池 勇樹、藤川 裕之、大竹 耕平、大北 喜基、荒木 俊光、内田 恵一、楠 正人

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 幹大 (Inoue Mikihiro)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30422835

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：