

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462777

研究課題名(和文)短腸症候群におけるGhrelin、GLP-2を用いた残存腸管順応誘導の開発

研究課題名(英文)Development of new management for short bowel syndrome : GLP-2 and Ghrelin induce intestinal adaptation.

研究代表者

向井 基 (MUKAI, Motoi)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80468024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：80%小腸切除ラットモデルにおいて、1.術後4日目を以降で残存小腸の絨毛増高が顕著となり吸収粘膜表面積の増大が進行した。2.Ghrelinは短小腸群でも正常腸管群でも早期に上昇し、以降は正常腸管環境と同等の血漿レベルが保持された。3.大量に小腸切除を受けると、GLP-2はGhrelin上昇と同期して4日目にピークに達し、以降は正常腸管環境に比し有意に高い血漿レベルが維持された。また完全静脈栄養+絶食ラットモデルにおいて1.6日間の絶食・経静脈栄養管理により、腸管上皮は萎縮する。2.Ghrelin投与が空腸粘膜の萎縮を予防する。3.体重や腸管重量には影響を与えなかった。

研究成果の概要(英文)：At first, we investigated Ghrelin and GLP-2 level in 80% small bowel resection (80% SBR) rat model. The major findings of this study are as follows (1) Acyl ghrelin and des-acyl ghrelin levels increased immediately, equivalently in both operation groups. (2) In 80% SBR animals, ghrelin peaked on day 4. GLP-2 secretion was obvious in 80% SBR animals, which increased immediately and peaked on day 4. (3) Morphological adaptations were evident after day 4. Then, we investigated the effect of ghrelin administration for intestinal mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition (TPN) using rat model. The major findings of this study are as follows (1) TPN for 6 days induced mucosal atrophy was recognized in jejunum greater more severe than in ileum. (2) Administration of ghrelin improved mucosal atrophy in TPN rat model. (3) There were no significant changes in body weight or small bowel weight.

研究分野：小児外科

 キーワード：大量小腸切除 短腸症候群 腸管不全 Glucagon-like peptide-2 Acyl ghrelin Des-acyl ghrelin
腸管順応 新生児

1. 研究開始当初の背景

壊死性腸炎・小腸閉鎖・中腸軸捻転・腹壁破裂・小腸広域におよぶ腸管無神経節症・胎便閉塞性疾患などにより、小児期に大量の小腸を喪失し短腸となった患児らの予後は、完全経静脈栄養療法の発展により大きく向上した。しかしながら、長期にわたる中心静脈栄養管理は残存小腸粘膜の高度な萎縮を惹起するのみならず、患児のQOLを制限し、カテーテル関連敗血症、経静脈栄養関連肝障害などの生命を脅かす重篤な合併をもたらす危険性を含んでいる。我々は在宅経静脈栄養管理中の短腸患児らをこのような合併症で数多く失っている。術後管理を工夫することで、このような短腸患児の長期生存をはかる努力が必要であり、残存腸管の代償能獲得を効果的にサポートすることが目下重要な臨床課題であると考える。腸管不全からの早期回復と経静脈栄養依存からの早期脱却が可能となれば、さらなる予後の改善を見込む事が出来る。残存腸管順応を促進するための研究はこれまで数多く行われてきた。摂取内容(nutrients)、Growth hormone など種々のホルモン、Epidermal growth factor や insulin-like growth factor などの成長因子ペプチド等の残存腸管粘膜修復効果が明らかとなった。しかし、小児ではいずれも臨床応用には至っていない。

近年は、大量小腸切除後の残存腸管から分泌される消化管ホルモンと残存腸管順応の関係が注目されている。共同研究者の加治は、遠位回腸-近位結腸に分布するL細胞から分泌されるGLP-2について、陰窩細胞増殖促進効果と糖吸収効率改善効果を明らかにした。

本研究では、さらに胃X/A様細胞から分泌されるGhrelinの及ぼす効果に着目する。生理活性の高いAchyI ghrelinと生理活性の低

いDes-acyl ghrelinの2分画が存在する。

Ghrelin (AchyI ghrelin) は、組織の修復・生体の成長・バランス保持に関する様々な生理作用を発揮している。これまで大量小腸切除後の残存腸管順応に関してGhrelinとGLP-2の関係を検討した報告はなく、新たな知見が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、大量小腸切除後の術後管理において、Ghrelin、GLP-2をコントロールすることで従来よりも効果的な残存腸管順応の誘導管理法を見い出したいと考える。

以下を達成目標とする。

- ・臨床で遭遇する2種類の大量小腸喪失形態(小腸のみを大量喪失する場合、回盲部-結腸を含めた中腸領域を喪失する場合)を動物モデルで再現し、GhrelinおよびGLP-2を経時的に追跡し、これらの体内動向を明らかにする。次いで両者のinteractionを明らかにし、

- ・次に同モデルにおいて、Ghrelin、GLP-2補充療法について至適量、至適時期を検討し、新たな術後管理法の開発に着手する。

3. 研究の方法

本研究は、大量小腸切除モデルについて、Ghrelin、GLP-2の効果的な補充療法を検討し残存腸管順応を誘導する新たな術後管理方法を開発することを目的とする。

モデルは、小腸閉鎖・胎便閉塞性疾患・壊死性腸炎等による大量小腸喪失モデルとして、①80%小腸切除(80%SBR) Sprague-Dawley (SD) rat, ②TPN+絶食モデルを用いてGhrelin、GLP-2とのinteractionを明らかにする。

4. 研究成果

まず80%小腸切除ラットモデルにおいて、以下の2つの消化管ホルモンの体内動向を追跡し、相互作用についての検討を行った。

摂取した未消化食物残渣による刺激をうけて回腸・結腸領域の L 細胞から分泌され、高度な絨毛増高作用と陰窩細胞増殖促進作用により粘膜修復をもたらす Glucagon-like peptide-2 (GLP-2)。胃・十二指腸領域の X/A 様細胞から分泌され、摂食調節および成長に関与する Ghrelin。これらをターゲットホルモンと位置付けた。

以下の知見が明らかとなった。1. 80%小腸切除後 4 日目以降で残存小腸の絨毛増高が顕著となり吸収粘膜表面積の増大が進行した。2. Ghrelin は短小腸群でも正常腸管群でも早期に上昇し、以降は短腸環境では正常腸管環境と同等の血漿レベルが保持された。3. 大量に小腸切除を受けると、GLP-2 は Ghrelin の上昇と同期して 4 日目にピークに達し、以降は正常腸管環境に比し短腸環境において有意に高い血漿レベルが維持された。

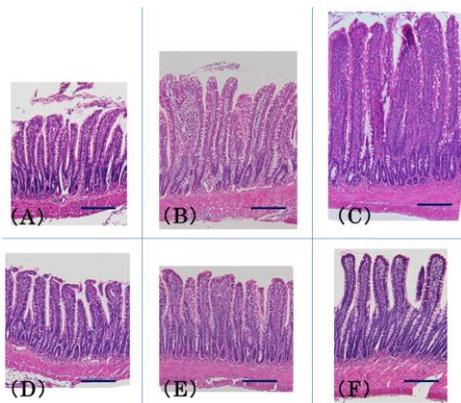


Fig. 3. Changes in intestinal morphology in the proximal ileum. Morphological changes were evident after day 4 in the 80% SBR animals but not in sham-operated animals. This tendency was seen in both the remaining jejunum and ileum. The changes in microscopic morphology in the proximal ileum (12.5cm above the ileocecal valve) are shown. (A) Post 80% SBR on day 1; (B) post 80% SBR on day 4; (C) post 80% SBR on day 15; (D) post sham operation on day 1; (E) post sham operation on day 4; (F) post sham operation on day 15. Bar, 200µm. 80% SBR, 80% small bowel resection.

大量小腸切除後、Ghrelin が摂食を保っていることが、GLP-2 を高いレベルで維持するきっかけとなり、吸収粘膜増大を引き出しているのではないかと推察された。GLP-2 により絨毛増高促進をはかり、Ghrelin により摂食を担保することで、効果的な残存小腸の粘膜発育促進が期待できると展望された。

次に絶食・経静脈栄養モデルラットを用いての実験をおこなった。絶食・経静脈栄養管理下において Ghrelin を投与することにより、

Table 1
Changes in gross intestinal morphology.

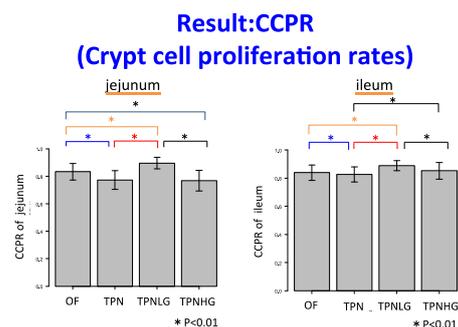
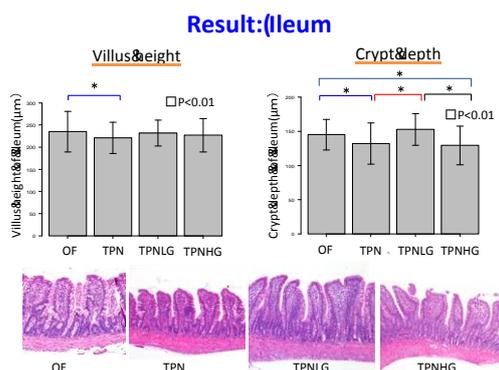
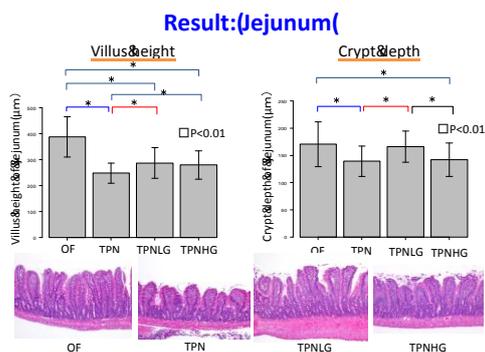
	n	Jejunum				Ileum			
		Bowel length (cm)	Bowel width (cm)	Bowel weight (mg/cm)	Mucosal weight (mg/cm)	Bowel length (cm)	Bowel width (cm)	Bowel weight (mg/cm)	Mucosal weight (mg/cm)
Control	3	5.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	101.3 ± 6.4	38.5 ± 4.3	15.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	105.6 ± 7.2	44.5 ± 4.1
80% SBR									
Day 1	6	5.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	95.8 ± 2.3	41.5 ± 4.0	15.2 ± 0.4	1.2 ± 0.1	104.9 ± 6.3	43.7 ± 2.7 [†]
Day 4	6	5.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	142.9 ± 10.9 ^{††}	60.1 ± 6.0 ^{††}	15.8 ± 0.5	1.4 ± 0.0 ^{††}	131.5 ± 2.7 ^{††}	57.5 ± 2.7 ^{††}
Day 7	6	5.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1 ^{†††}	166.0 ± 13.8 ^{†††}	58.4 ± 4.2 ^{†††}	16.6 ± 0.8	1.5 ± 0.1 ^{†††}	177.5 ± 9.4 ^{†††}	73.7 ± 4.0 ^{†††}
Day 11	6	5.1 ± 0.2	1.6 ± 0.0 ^{†††}	261.5 ± 25.4 ^{†††}	98.9 ± 12.1 ^{†††}	16.4 ± 0.2	1.8 ± 0.0 ^{†††}	208.0 ± 10.8 ^{†††}	78.9 ± 4.8 ^{†††}
Day 15	6	5.3 ± 0.3	1.7 ± 0.1 ^{†††}	267.3 ± 21.2 ^{†††}	93.2 ± 11.3 ^{†††}	15.7 ± 0.3	1.7 ± 0.0 ^{†††}	223.9 ± 8.9 ^{†††}	89.2 ± 4.8 ^{†††}
Sham									
Day 1	6	5.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	86.0 ± 10.1	30.4 ± 5.2	14.9 ± 0.1	1.1 ± 0.0	90.3 ± 3.1	34.2 ± 2.5
Day 4	6	5.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0	87.0 ± 3.4	32.5 ± 2.0	15.3 ± 0.5	1.1 ± 0.0	90.5 ± 3.6	36.4 ± 3.2
Day 7	6	5.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	93.4 ± 3.6	34.9 ± 1.8	16.3 ± 0.5	1.1 ± 0.0	110.2 ± 7.5	40.5 ± 4.3
Day 11	6	5.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	100.3 ± 3.7	37.4 ± 1.8	15.7 ± 0.2	1.1 ± 0.0	133.7 ± 7.8	46.3 ± 3.4
Day 15	6	5.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	106.3 ± 5.0	40.8 ± 3.2	15.7 ± 0.4	1.2 ± 0.1	133.4 ± 8.2	43.2 ± 2.6

Data are expressed as the means ± SE. Comparisons with controls were performed by Dunnett's test. Comparisons among the groups at similar time points were analyzed by Student's t-test.
* P<0.05 versus controls.
† P<0.01 versus controls.
†† P<0.05 versus the sham operation subjects.
††† P<0.01 versus the sham operation subjects.
80% SBR, 80% small bowel resection.

腸管粘膜の萎縮を予防することができるかと考えた。

以下の知見が明らかとなった。1. 6 日間の絶食・経静脈栄養管理により、ラットの腸管上皮は萎縮がおこる。2. Ghrelin 投与が空腸粘膜の萎縮を予防する。3. 体重や腸管重量などのデータには大きな影響を与えなかった。

Ghrelin 投与が絶食下における腸管粘膜の萎縮の予防に大きな働きを与えることがわかった。摂食を担保するホルモンである Ghrelin が、短腸症候群の新たな術後管理の一翼を担うことが期待できる結果である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5件)

- ① Nakame K, Kaji T, Mukai M, Shinyama S, Matsufuji H. The protective and anti-inflammatory effects of glucagon-like peptide-2 in an experimental rat model of necrotizing enterocolitis. *Peptides*, 1-7 2016.1
doi: 10.1016/j.peptides.2015.07.025. Epub 2015 Nov 10.
- ② 山田和歌, 向井 基, 矢野圭輔, 大西 峻, 山田耕嗣, 川野孝文, 中目和彦, 加治 建, 家入里志: 特集:素朴な疑問: 私ならこう考

える: 9.症状の無い腸回転異常症、手術は必要か、小児外科、査読無し、47 巻、2015、1031-1033

③ 川野孝文, 向井 基, 中目和彦, 武藤 充, 加治 建, 松藤 凡: 腫瘍形成性虫垂炎に対する待機的虫垂切除 第 41 回九州小児外科研究会アンケート調査より、日本小児外科学会雑誌、査読無し、51 巻、2015、793-779

④ 加治 建, 向井 基, 武藤 充, Sigalet David L.: 【小児短腸症候群】 短腸症候群と Glucagon-like peptide 2、外科と代謝・栄養、査読無し、48 巻、2014、241-245

⑤ Muto M., Kaji T., Mukai M., et al: Ghrelin and glucagon-like peptide-2 increase immediately following massive small bowel resection. *Peptides*, 43:160-6. 2013.

doi:10.1016/j.peptides.2013.03.006. Epub 2013 Mar 18.

[学会発表] (計 9件)

① Yamada W., Kaji T., Mukai M., et al: Ghrelin Improves Intestinal Mucosal Atrophy During Parenteral Nutrition: An Experimental Study.

The 49th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, April 24-28, 2016, HAWAII Kaua'i

② 加治 建, 短腸症候群の臨床と研究 — GLP-2 の臨床使用にむけて —, シヤイア-ジャパン 学術講演会、2016. 2. 5、新宿フロントタワー (東京都新宿区)

③ 加治 建, 小児の栄養管理、大塚製薬工場学術講演会、2015. 12. 7、大塚瀬谷区工場鹿児島出張所会議室 (鹿児島市)

④ 山田和歌, 総排泄遺残症の 4 例、日本直腸肛門奇形研究会、2015. 10. 31、くまもと県民交流館 (熊本市)

⑤ 加治 建, 向井 基, 鳥飼 源史, 川野 孝文, 山田 和歌, 山田 耕嗣, 大西 峻, 野村美緒子, 春松 敏夫: 短腸症候群症例における在宅栄養管理の検討、第 52 回 日本小児

外科学会学術集会、2015.5/28～5/30、神戸国際会議場（神戸市）

⑥山田和歌、向井基、大西峻、野村美緒子、春松敏夫、山田耕嗣、川野孝文、鳥飼源史、加治建：先天性門脈欠損症の1例、日本小児外科学会学術集会、2015.5/28～5/30、神戸国際会議場（神戸市）

⑦武藤充：大量小腸切除後のGlucagon-like peptide-2 および Ghrelin に関する検討：残存腸管活用に向けた基礎研究の報告、第26回日本小腸移植研究会、2014.3.15、自治医科大学地域医療研修センター（栃木県下野市）

⑧武藤充、加治建、向井基、松藤凡、大量小腸切除モデルラットにおける血漿 Ghrelin、Glucagon-like peptide-2 の推移と臨床応用への展望、第50回日本外科代謝栄養学会、2013.7/4～7/5、学術総合センター（東京都千代田区）

⑨武藤充、加治建、向井基、中目和彦、松藤凡、大量小腸喪失後の血漿 Ghrelin と Glucagon-like peptide-2 の推移について、第50回日本小児外科学会、2013.5/30～6/1、慶應プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕（計 1 件）

①Ieiri S, Kaji T, Taguchi T: Chapter 43 Anorectal Prolapse Operative General Surgery in Neonates and Infants, Springer, Tokyo, 2016, 402

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井基 (MUKAI, Motoi)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80468024

(2) 研究分担者

加治建 (KAJI, Tatsuru)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：50315420

林田良啓 (HAYASHIDA, Yoshihiro)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80305135

武藤充 (MUTO, Mitsuru)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：70404522

山田和歌 (YAMADA, Waka)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：20457659