

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390342

研究課題名（和文） 消化管癒着・線維形成過程の分子機構解析・制御法開発と腸管星細胞探索の試み

研究課題名（英文） Establishment of experimental surgical adhesion model and analysis of immunological mechanism underlying organ adhesion

研究代表者 藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

研究成果の概要（和文）：腹部術後の95%に形成される腹腔内癒着は、腹痛・腸閉塞・不妊などの合併症を引き起こすがそのメカニズムは不明のままである。我々はマウスおよびラットを用いて、腸管癒着モデルを確立し、癒着形成には炎症性サイトカインであるIFN- γ 及び線溶系因子であるPAI-1が主な癒着形成に関与していることを解明した。さらに肝細胞増殖因子(HGF)を投与することでこれらの因子の発現を抑制し癒着を軽減することができ、術後癒着防止への新たな治療法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Abdominal adhesion formation is constituted after abdominal surgery, and it may cause abdominal pain, bowel obstruction and infertile. Since the mechanism has been still unclear, we established a unique experimental model of adhesion, and elucidated the related molecules which are inflammatory cytokine, interferon- γ , and fibrolytic factor, plasminogen activator inhibitor-1. Furthermore, we could reduce the adhesion to inhibit these molecules using recombinant hepatocyte growth factor, providing a new way to prevent postoperative adhesions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：消化管癒着、線維化、HGF

1. 研究開始当初の背景

近年外科手術手技は大きく前進し、症例、状況に応じて拡大手術から内視鏡下手術を含む低侵襲手術までさまざまな術式の選択が可能

になった。しかし、手術や炎症に伴う癒着・線維の形成はしばしば治療を難渋にする未解決の重要な課題であり、その詳細なメカニズムの解明とその制御は未だなされていない。

これまでに研究代表者たちは肝硬変における線維形成とHGF (hepatocyte growth factor: 肝細胞増殖因子) による線維溶解、正常肝への回復機構を報告した (Nature Med, 1999)。また、腎臓においても同様にHGFが抗線維作用を示すことをみだし (Kidney International, 2002)、さらに消化管においてもHGFによる骨髄移植・GVHD (移植片対宿主病) による障害腸管の修復機構 (J Clin Invest, 2001)、炎症性腸疾患モデルにおける抗線維作用・上皮再生作用 (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005) などを報告した。これらの研究成果を踏まえて、以下を検討課題と考えた。

消化器外科手術のあとにしばしば認められる腸管-腸管、腸管-腹膜などの癒着のメカニズムは現在でも明らかにされていない。肝臓においては肝細胞死にともない主としてマクロファージ (クッパー細胞) より産生されるTGF- β 1により肝星細胞が活性化され筋原細胞となり線維を産生する機構が明らかにされている。外科手術後の腸管の癒着は漿膜面で形成されるが、(1) 癒着・線維化という現象の詳細な形態学的検討、(2) 癒着・線維化を促進する重要なシグナル (因子・分子) は何か、(3) そのシグナルを発信する細胞は何か、(4) そのシグナルを受け取り実際に線維を形成する細胞は何か、(5) その制御は可能か、の解明を着想するにいたった。

2. 研究の目的

腹腔内及び骨盤内手術後の腸管癒着形成に伴う腸閉塞、疼痛及び女性患者における不妊などは頻度の高い術後合併症であるがそのメカニズムは未だ解明されていない。また、癒着予防法も未だ確率されたものは存在しない。我々は定量的に癒着形成可能な腹腔内癒着形成動物モデルを新規に作製の上、腹腔

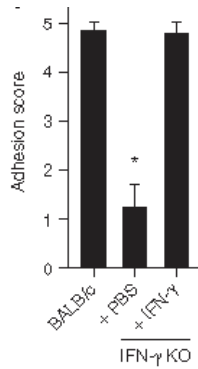
内癒着形成メカニズムを解析し、その制御による癒着予防法を考案した。

3. 研究の方法

新規開発した腸管癒着モデルマウスを用いて癒着形成に関わる要因を検討した。手術侵襲として、各種マウスに5mmの切開を加え、盲腸にバイポーラ電気メスを用いて1秒焼灼後、閉創した。術後1週間で癒着は形成され、癒着度合いはadhesion scoreを用いて0-5点で評価した。また、術後経時的に開腹して組織学的に検討するとともに、腸管mRNAを抽出して各種mRNA発現を解析した。さらに癒着制御を目的にHGFを投与してそのメカニズムを解析するとともに、臨床応用に向けたステップとしてラット癒着モデルを作製して同様の解析を行った。

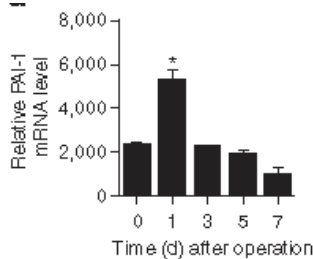
4. 研究成果

- (1) 術後1週間で野生型マウスの盲腸は著明な癒着が形成されるがCD4+T細胞を除去したマウスでは癒着は極軽度であった。
- (2) CD4+T細胞の中でもNKT細胞を欠損するNKT KOマウスでは癒着は極軽度であったがNKT KOマウスにNKT細胞を移入すると著明な癒着を形成した。また、術後3時間から盲腸の粘膜下層及び漿膜下層にNKT細胞が浸潤し、術後24時間で著明に増加した。
- (3) 盲腸組織において術後3時間をピークとしてIFN- γ mRNAの発現を認めた。IFN- γ KOマウスでは癒着は極軽度であったがIFN- γ KOマウスにIFN- γ を投与すると著明な癒着を形成した (図1)。



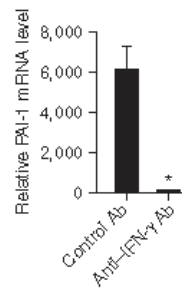
(図 1) IFN- γ による癒着抑制

(4) 手術侵襲を加えた野生型マウスの腸管 PAI mRNA 発現は術後 1 日目をピークに増減するのに対し、tPA mRNA 発現は術後 1 日目著明に低下し、術後 5 日目まで低値を持続した(図 2)。



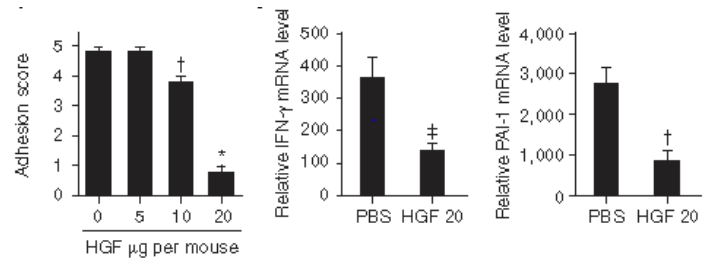
(図 2) 術後 tPA mRNA 発現

- (5) IFN- γ Ko マウスでは、術後 1 日目の PAI mRNA の発現増強は認められなかった。
- (6) IFN- γ 抗体を投与したマウスに手術侵襲を加えると癒着形成は抑制傾向であった。
- (7) 腸管漿膜障害により障害局所において神経伝達物質の substance P (SP) 発現が増強し、SP が NKT 細胞に直接作用して IFN- γ 発現を増強させる。
- (8) NKT 細胞から産生された IFN- γ は STAT 1 を介して、凝固系因子である PAI-1 発現を増強させ癒着形成を促進させる。
- (9) 術前に抗 IFN- γ 抗体を投与する事で PAI-1 発現を抑制し、癒着形成を減弱させた(図 3)。



(図 3) PAI-1 発現抑制による癒着抑制

(10) IFN- γ 抑制作用のある Hepatocyte Growth Factor (HGF) 蛋白を投与する事により、IFN- γ 発現及び PAI-1 発現を抑制し、癒着形成を著明に抑制しえた。その際、治癒過程に影響は認められなかった(図 4)。



(図 4) HGF による癒着制御

- (11) HGF 投与は術直後が最も癒着抑制効果が高く、術後 24 時間以降に投与しても癒着抑制効果は認められなかった
- (12) 臨床応用に向けたステップとして、ラットにおける癒着形成メカニズムの検討と HGF 投与による癒着抑制効果を検討した。ラットの盲腸をバイポーラ電気メスを用いて 1 秒焼灼後、閉創した。術後経時的に開腹して腸管 mRNA を抽出し、tPA 及び PAI-1 mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した。また、HGF を術直後に SC して tPA 及び PAI-1 発現を検出し、術後 1 週間での癒着形成状況を癒着スコアリングシステムを用いて評価した。術後 1 週間でラットの盲腸は著明な癒着を形成した。

(13) 手術侵襲を加えたラットの腸管 PAI-1 mRNA 発現は術後 1 日目をピークに増減するのに対し、tPAmRNA 発現は術後 1 日目著明に低下した。

(14) HGF 投与群は術後 1 日目の PAI-1 発現が低下し、術後 1 週間での癒着抑制効果を認められた。以上よりラットにおいてもマウスと同様に癒着形成メカニズムを制御する事で癒着抑制効果を発揮しえた事から、癒着形成メカニズムは他動物と共通するメカニズムである可能性が示された。

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 1 件)

①Kosaka H, Fujimoto J et al. Interferon- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation *Nature Medicine* 2008 14:437-441. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ①小坂久, 藤元治朗. 腹腔内癒着形成ラットモデルの開発と解析. 第 95 回日本消化器病学会総会 2009 年 5 月 8 日 札幌
- ②小坂久, 藤元治朗. HGF を用いた術後癒着予防法の展開. 第 109 回日本外科学会定期学術集会 2009 年 4 月 3 日 福岡
- ③Kosaka H, Fujimoto J. Brand-new prevention method of postoperative adhesion formation used by HGF. 4th annual academic surgical congress 2009 年 2 月 4 日 Fort Myers
- ④Kosaka H, Fujimoto J. Role of NKT cell-driven IFN-g in postoperative adhesion formation. DDW(AGA) 2008 年 5 月 21 日 San Diego

⑤小坂久, 藤元治朗. 術後癒着形成は IFN-g/ STAT1 依存性の PAI 亢進による. 第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008 年 5 月 17 日 長崎

⑥Kosaka H, Fujimoto J. NKT cell-driven IFN- γ plays an important role in postoperative adhesion formation. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月 20 日 東京

⑦Kosaka H, Fujimoto J. Establishment of experimental surgical adhesion model and analysis of immunological mechanism underlying organ adhesion. 42nd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR) 2007 年 5 月 23 日 Rotterdam

⑧小坂久, 藤元治朗. 新しいマウス腹腔内癒着モデルの確立と癒着形成に関わる免疫学的要因の解析. 第 107 回日本外科学会定期学術集会 2007 年 4 月 11 日 大阪

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①名称: 実験動物の腸管癒着を形成する方法、腸管癒着実験動物の製造方法、腸管癒着抑制剤のスクリーニング方法および腸管癒着抑制剤

発明者: 善本知弘, 藤元治朗, 中西憲司

権利者: JST

種類: 特許

番号: 国際 PCT/JP2008/052299

出願年月日: 2008年2月13日

国内外の別: 国外

②名称: 実験動物の腸管癒着を形成する方法、腸管癒着実験動物の製造方法、腸管癒着抑制剤のスクリーニング方法および腸管癒着抑制剤

発明者：善本知弘，藤元治朗，中西憲司

権利者：JST

種類：特許

番号：特願2007-033904

出願年月日：2007年2月14日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

(2) 研究分担者

飯室 勇二 (IIMURO YUJI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30252018

平野 公通 (HIRANO TADAMICHI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：90340968

王 孔志 (OH KOSHI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：80340967

宇山 直樹 (UYAMA NAOKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70402873

中西 憲司 (NAKANISHI KENJI)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60172350