

平成21年6月10日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19592066
研究課題名 (和文) 一酸化窒素の産生誘導を指標とした小腸移植における腸管適応促進剤のスクリーニング
研究課題名 (英文) Detection of intestinal adaptation enhancing agents by induction of nitric oxide in small bowel transplantation
研究代表者 浜田吉則 (HAMADA YOSHINORI)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00172982

研究成果の概要：

1) In vitro系 (ラット小腸上皮細胞、IEC-6) を用いて、スタチンの誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 誘導への効果を検討した。その結果、IEC-6にIL-1 β あるいはpitavastatinを単独で添加しても一酸化窒素(NO)産生は認められないが、両者を同時投与することによりNO産生が増強された。また同時投与によりiNOS proteinおよびmRNAレベルも同様に増加を示した。pitavastatinはさらにIL-1 β と上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)の相乗効果によるNO産生に対しても強い増強効果を示した。この効果はメバロン酸によりブロックされた。さらに、pitavastatinはin vitro系 (ラット初代培養肝細胞) を用いたiNOS誘導への効果においても、IEC-6と同様にIL-1 β のiNOS誘導を転写レベルと転写後調節の両段階を介して促進した。特に後者の転写後調節ではiNOS mRNAの安定化に関与するiNOS遺伝子のアンチセンス転写物の発現を増加させた。また同様の効果が抗潰瘍剤rebamipideでも認められた。

2) 小腸移植後の腸管機能の回復とiNOSとの関係を明確にするために、ラット小腸の虚血・再灌流 (ischemia-reperfusion, IR) モデルを用いて、組織障害の回復過程におけるiNOSの発現誘導を解析した。IRモデルはラット (雄性、Sprague-Dawley, 8週齢; 250-300g) の小腸虚血 (上腸間膜動脈45分clamp) を作製し、再灌流後経時的 (1-6時間) に回腸を摘出した。虚血直後は絨毛先端の粘膜上皮細胞の剥脱が顕著であったが、再灌流1時間で剥脱部位への上皮細胞の移動が認められた。再灌流3-6時間では絨毛先端の回復を示した。

回腸の粘膜部分を採集し、RT-PCR法に従ってRNA抽出を行いiNOS mRNAを測定し、equal loadingの指標としてelongation factor 1 α を解析した。虚血45分のラットではiNOS mRNAレベルの増加傾向がみとめられたが、sham control (開腹してclampなし) のiNOS mRNA basalレベルはラットの個体ごとに大きく変動した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：小児外科学

キーワード：小腸移植、上皮成長因子、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

小腸移植は最近臨床応用が進んできたが、肝移植などと比べていまだに治療成績は不良であり、その最大の理由は移植臓器の特殊性に起因する強い拒絶反応にある。最小限の腸管を移植しその移植片の腸管適応を促進させることができれば、拒絶を最小限に抑えられるうえに、より多くの栄養素を吸収できる点で臨床的に有意義であると考えられる。

我々はその観点にたち、ラットの小腸移植モデルにおいてEGFによって移植腸管の腸管適応を促進させ、移植腸管における吸収能がいかに促進されるかを研究してきた。その結果、移植腸管においてEGFはナトリウム-グルコース共輸送体蛋白(SGLT1)を誘導することによって糖吸収を促進させること(Kato Y, Hamada Y, et al. J Surg Res, 1998, Kato Y, Hamada Y, et al. Life Sciences, 2002)、ペプチド吸収能の増加をもたらすこと(Nakai K, Hamada Y, et al. Life Sciences, 2004)、を報告してきた。

しかし実際の小腸移植においては、移植直後の腸管粘膜は炎症性サイトカインや虚血再灌流障害に曝露されている。そこで炎症性サイトカイン IL-1 β の存在下で、NOの産生

に関するEGFの効果についてラット小腸培養細胞 IEC6 を用いて検討したところ、その産生が著明に促進され、このNO産生にNF- κ Bの活性化が関与していることを見出した(Kitagawa K, Hamada Y, et al. Am J Physiol-Gastr L, 2004)。一方、最近ラット小腸移植モデルでNOが小腸移植後のbacterial translocationを抑制し細胞保護作用を示すデータが報告された。以上よりラット小腸移植モデルにおいてEGFがNO産生に関与していること、NOが移植後のグラフト保護因子として関わっている可能性があることから、これらについてin vivo及びin vitroでわれわれの実験系でさらに解析を進める必要がある。

2. 研究の目的

臨床応用が進んできた小腸移植において、その治療成績の不良の最大の原因は強い拒絶反応である。過去に、EGF, HGF, IGF-1などの増殖因子に腸管適応促進効果が報告されている。しかし、その腸適応の指標となるものが各実験モデルにおいて著しく異なっており、効果の強さやin vivoでの有無を簡単に比較することが難しいのが現状である。

小腸移植時の NO の役割に関しては動物モデルや *in vitro* 実験系を用いた様々な報告がなされている。NO を産生する酵素は常在性の 2 つの一酸化窒素合成酵素（神経型 neuronal NOS, 内皮型 endothelial NOS）と誘導型 inducible NOS が存在する。正常時の小腸では eNOS 由来の NO が小腸粘膜の微小循環や機能の保全に働いている。病態時（感染、炎症、虚血・再灌流、移植など）には後者の iNOS が誘導され、eNOS に比べて多量の NO 産生が起こる。iNOS 由来の NO は *in vitro* の実験系では腸における bacterial translocation の亢進に関与する一方で、小腸移植モデルではその保護作用に効果を示す相反する報告がある。我々はラット小腸移植モデルの実験（EGF が腸管適応を促進）と小腸上皮細胞（IEC-6）を用いた *in vitro* の実験（EGF が炎症時の iNOS 誘導を促進）より、炎症時に EGF により発現誘導された iNOS 由来の NO が、移植後の重大な合併症である bacterial translocation および apoptosis を抑制し、腸管保護を促進している可能性を考えている。

小腸移植後の腸管機能の回復をめざして、様々な治療薬の開発が進められている。申請者は過去の *in vitro* および動物モデルの実験より、iNOS 由来の NO が bacterial translocationなどを抑制することにより腸管適応を促進し、拒絶反応を緩和している可能性を示した。この iNOS/NO 産生の誘導活性を、腸管適応促進剤の開発の指標として用いることができるという仮説を提唱し、本研究においてその正当性を明らかにしたいと考えている。

過去に様々な生理活性物質の腸管適応促進剤としての可能性が報告されているが、それらの効果の指標は用いられた動物モデルの条件が異なるために、それらの腸管適応促

進効果を一律に比較することは不可能である。本研究では iNOS 遺伝子の発現と NO の産生誘導という生化学的尺度を用いてその効果を測定するため、より明確にかつ迅速に適応促進剤のスクリーニングが可能となる。腸管保護作用の良く知られている物質（EGF, IGF-1, statins, glucagon など）を positive control として、iNOS/NO 産生の誘導活性との関係を解析する。これらの物質の腸管保護と iNOS 誘導との間に密接な関係が示唆される。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 系でラット小腸上皮細胞、IEC-6 を用いて、スタチンの誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 誘導への効果を検討した。炎症性サイトカイン IL-1 β の存在下に EGF を添加し、iNOS 誘導体 (I κ B/ NF- κ B, iNOS mRNA, iNOS protein, NO) との関係を解析した。EGF 以外に最近細胞保護作用が報告されている statins や抗潰瘍剤 rebamipide などの小腸粘膜細胞への活性と iNOS/NO 産生の誘導との関係を上述した方法に従って解析した。さらにラット初代培養肝細胞を用いた iNOS 誘導への効果においても検討した。

(2) 小腸移植後の腸管機能の回復と iNOS との関係を明確にするために、ラット小腸の虚血・再灌流 (ischemia-reperfusion, IR) モデルを用いて、組織障害の回復過程における iNOS の発現誘導を解析した。

① IR モデルの作製 ラット（雄性、Sprague-Dawley, 8 週齢 ; 250-300g）の小腸虚血（上腸間膜動脈 45 分 clamp）を作製し、再灌流後経時的に回腸を摘出し、以下の項目を検討した。

② 組織の損傷と回復 HE 染色にて、粘膜上皮細胞の剥脱とその回復を経時的（1-6 時間）に検討した。

③iNOS mRNA の発現 回腸の粘膜部分を採集し、RT-PCR法に従ってRNA抽出を行った。iNOS mRNA と equal loading の指標として elongation factor 1 α を解析した。

4. 研究成果

(1) IEC-6にIL-1 β あるいはpitavastatinを単独で添加してもNO産生は認められないが、両者を同時投与することによりNO産生が増強された。また同時投与によりiNOS proteinおよびmRNAレベルも同様に増加を示した。しかしpitavastatinはIL-1 β のNF- κ Bの活性化には影響を与えなかった。pitavastatinはさらにIL-1 β とEGFの相乗効果によるNO産生に対しても強い増強効果を示した。この効果はメバロン酸によりブロックされた。pitavastatinの作用メカニズムがEGFと同じか否かは不明であるが、IL-1 β との共存下でiNOS誘導を転写レベルで制御していると考えられる。動物モデルにおいてpitavastatinのEGFと同様な腸管保護効果が期待できる。

さらに、pitavastatinはin vitro系でラット初代培養肝細胞を用いたiNOS誘導への効果においても、IEC-6と同様にIL-1 β のiNOS誘導を転写レベルと転写後調節の両段階を介して促進した。特に後者の転写後調節ではiNOS mRNAの安定化に関与するiNOS遺伝子のアンチセンス転写物の発現を増加させた。また同様の効果が抗潰瘍剤rebamipideにおいても認められた。以上の結果はNO産生促進効果を持つ様々な薬剤がiNOS/NO産生の誘導を介して、小腸保護に関与する可能性を示唆する。

(2) 虚血直後は絨毛先端の粘膜上皮細胞の剥脱が顕著であったが、再灌流1時間で剥脱部位への上皮細胞の移動が認められた。再灌流3-6時間では絨毛先端の回復を示した。虚

血45分のラットではiNOS mRNAレベルの増加傾向がみとめられたが、sham control (開腹してclampなし)のiNOS mRNA basalレベルはラットの個体ごとに大きく変動した。

虚血・再灌流による血中の一酸化窒素や炎症性サイトカインの上昇も確認しているが、sham controlでのiNOS mRNAレベルの増減が単に開腹刺激によるか否かは不明であるが、ラットを“クリーンレベル”で飼育していたため外部からの非特異的な感染刺激がラットの正常値に影響を与えていた可能性は否定できない。

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 2件)

① Pitavastatin up-regulates the induction of iNOS through enhanced stabilization of its mRNA in pro-inflammatory cytokine-stimulated hepatocytes.

Habara K, Hamada Y, Yamada M, Tokuhara K, Tanaka H, Kaibori M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Ito S, Okumura T.
Nitric Oxide 18(1):19-27, 2008

② Rebamipide, anti-gastric ulcer drug, up-regulates the induction of iNOS in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes.

Tokuhara K, Hamada Y, Tanaka H, Yamada M, Ozaki T, Matsui K, Kamiyama Y, Nishizawa M, Ito S, Okumura T.
Nitric Oxide 18(1):28-36, 2008

[学会発表] (計 1件)

① The up-regulation of iNOS induction by

pitavastatin in inflammatory
cytokine-stimulated IEC-6.

K. Habara, K. Nakai, K. Kitagawa, Y.
Hamada, Y. Kamiyama, M. Nishizawa, T.
Okumura.

Xth International Small Bowel
Transplant Symposium, 2007.9.4 Santa
Monica, USA

〔図書〕（計0件）

〔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

浜田吉則 (HAMADA YOSHINORI)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00172982

(2) 研究分担者

奥村忠芳 (OKUMURA TADAYOSHI) 2007年度
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80113140

(3) 連携研究者

なし