

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791293

研究課題名 (和文) バクテリアルトランスロケーションの新たなメカニズムの解明

研究課題名 (英文) The role of the transcellular route and paracellular route in bacterial translocation

研究代表者 吉川幸造 (YOSHIKAWA KOZO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80448331

研究成果の概要 (和文)：

【背景・目的】Bacterial translocation (BT) 発症予防は臨床現場では重要であり、そのメカニズムに関してトランスセルラールートとパラセルラールートの関与が報告されている、特にトランスセルラールートでは細胞内の蛋白質分解系であるオートファジーが注目されており、病原性細菌の細胞内侵入の解析では、細胞にとって有害な異物の除去に働いていることが分かった。本研究ではこの二つのルートに注目し BT 発症の新たなメカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】1) トランスセルラールート：BT モデルを用いて腸管上皮粘膜を TUNEL 染色しアポトーシスを確認した。また腸管内のサイトカインを PCR 法を用いて計測した。腸管粘膜の電位に関しては Ussing chamber 法を用いて検討した。結果ではコントロール群と比較して腸管上皮のアポトーシスが増加していた。腸管内の炎症性サイトカインを測定したところ IFN- γ 、TNF α の上昇が認められた。電気抵抗に関しては大腸で電気抵抗の低下を認めた。

2) パラセルラールート：BT モデルを用いて、腸管 (小腸、大腸) を摘出し、Western blot 法と RT-PCR で Tight junction の変化 (Claudin-1, Occludin-1, ZO-1) を測定した。結果では Tight junction タンパク発現減、Claudin-1, Occludin の低下を認めた。ZO-1 は変化を認めなかった。

3) オートファジー：オートファジーの能力を全身で欠損した Atg ノックアウトマウスに対して CPT-11 を投与し、腸間膜リンパ節を摘出、細菌の有無を培養および PCR で検索し BT の発症を確認する。現在、オートファジーの BT 発症に及ぼす影響を確認中である。

【結論】BT 発症モデルにおいてアポトーシスが上昇しており、その機序にサイトカインを介したトランスセルラールートの関与が示唆され、また Tight junction の傷害を介したパラセルラールートの関与していることが確認された。

研究成果の概要 (英文)：【Background】：This aim of this study was conducted to clarify the possible functional involvement of transcellular and paracellular route in bacterial translocation.

【Methods and Results】：1) Transcellular route: Ten wister rats were divided into two groups: Five were treated with irinotecan and five were not treated with irinotecan, the control group. Irinotecan treated rats were administrated irinotecan 250 mg/kg intraperitoneally on days designated 0 and 1, were then killed at 48 h after treatment, and tissues were collected for analysis. Controls were treated with a saline solution. Apoptosis in the BT group was increased and inflammatory cytokine was also increased. Large intestinal resistance of the rats was decreased. 2) Paracellular route: Same model was adopted in paracellular route study. Claudin-1 protein expression of both the small and large intestine decreased ($P < 0.05$), occludin protein expression of the small intestine decreased ($P < 0.05$), and occludin protein expression of the large intestine had decreasing tendency ($P = 0.07$) in irinotecan treated rats. In irinotecan treated rats, claudin-1 mRNA of the small intestine decreased ($P < 0.05$), claudin-1 mRNA of large intestine had a tendency to decrease ($P = 0.05$), occludin mRNA of both small and large intestine decreased ($P < 0.05$). 3) Autophagy: We use the Atg knock out mouse (lacked the autophagy function). Mouse was treated with irinotecan. Now we investigate the relationship between the autophagy function and bacterial translocation.

【Conclusions】：Those findings indicated some relationship between the transcellular and paracellular route and bacterial translocation. It is possible that these mechanism prevent the bacterial translocation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

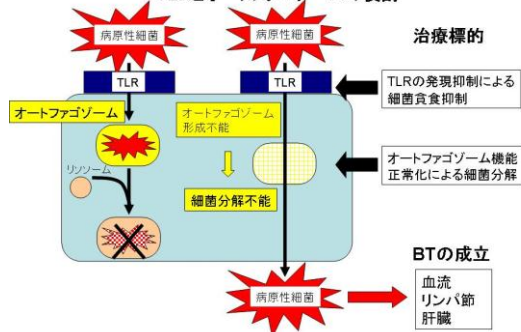
科研費の分科・細目：外科臨床医学・消化器外科学

キーワード：バクテリアルトランスロケーション、オートファジー、腸管傷害

1. 研究開始当初の背景

Bacterial translocation (BT) は腸管内細菌などが腸管のバリア機能の破綻により全身の血中に移行する現象であり敗血症や多臓器不全へと進行する。現在のところBT発症のメカニズムは不明であるが細菌が腸粘膜を通過する経路としてトランスセルラールルートとパラセルラールルートが存在することが示されている。トランスセルラールルートにおいて細菌の貪食にToll like receptor (TLR) が関与していることが腎細胞のセルラインで確認された。(J Immunol 2006, 176:3070 -3079)。もともとTLRは抗原提示細胞上に発現しており、現在のところ10種類以上が同定されている。なかでもTLR4はグラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 (LPS) を認識するうえで重要である。TLR刺激は主にMyD88を介してNF κ Bを活性化し結果としてTNF- α 、IL-6といった炎症性サイトカインを分泌し感染局所に炎症反応を惹起することが判明している。また transcellular routeにおいて細胞内の蛋白質分解系であるオートファジーが注目されており、病原性細菌の細胞内侵入の解析では、細胞にとって有害な異物の除去に働いていることが分かった。またオートファゴゾームに必要なAtg5蛋白が欠損した細胞では細菌の分解が不能であり、細胞内で増えた菌の一部が細胞外に放出されることが分かっている。(Science 2004, 306:1037-1040) 消化器外科領域の悪性疾患に対する抗癌剤のkey drugである5FU、CPT-11による消化管障害は極めて重要な問題であり、これらの薬剤による腸管粘膜上皮の障害をbacterial translocationの面から検討した報告はない。粘膜障害にトランスセルラールルートが関与しているかについて検討を行う。

図1.バクテリアルトランスロケーションの成立と治療標的
TLRとオートファゴゾームの役割



2. 研究の目的

抗癌剤のCPT-11の腸管粘膜障害によりBTを引き起こすモデルを作成し、オートファジー機能からみたトランスセルラールルートとパラセルラールルートとBTのメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

CPT-11 投与による BT モデルは、Wister 系ラットを用いて CPT-11 を 250mg/kg を腹腔内投与 (0, 24 時間) した。2 回目投与後 24 時間後に犠死させて腸間膜リンパ節を培養し BT を確認した。

1) トランスセルラールルート

BT モデルを用いて腸管上皮粘膜を TUNEL 染色しアポトーシスを確認した。また腸管内のサイトカインを PCR 法を用いて計測した。腸管粘膜の電位に関しては Ussing chamber 法を用いて検討した。

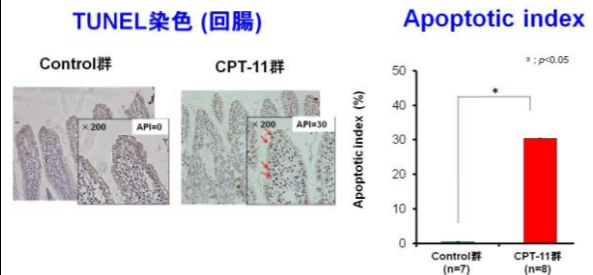
2) パラセルラールルート

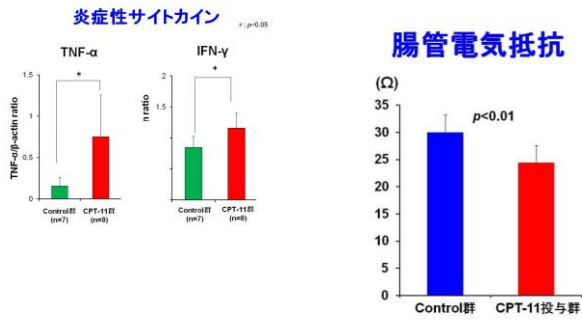
BT モデルを用いて、腸管 (小腸、大腸) を摘出し、Western blot 法と RT-PCR で Tight junction の変化 (Claudin-1, Occludin-1, ZO-1) を測定した。

4. 研究成果

1) トランスセルラールルート

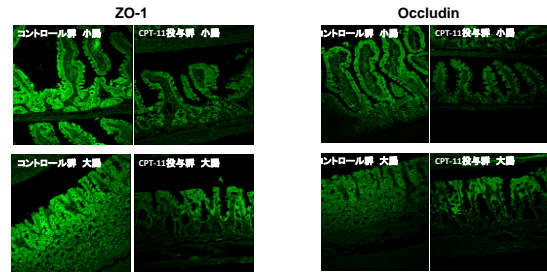
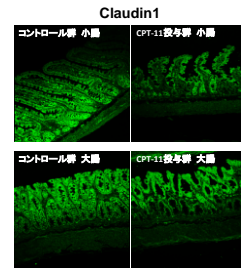
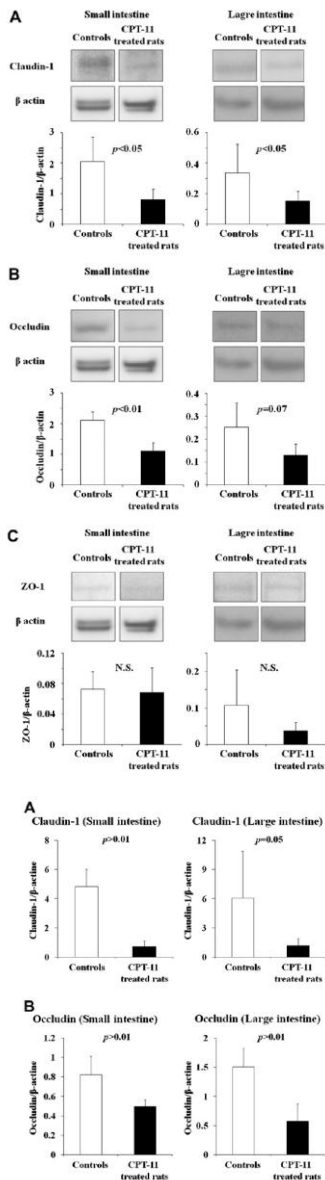
コントロール群と比較して腸管上皮のアポトーシスが増加していた。腸管内の炎症性サイトカインを測定したところ IFN- γ 、TNF α の上昇が認められた。電気抵抗に関しては大腸で電気抵抗の低下を認めた。





2) パラセルラールート

Tight junction タンパク発現の減少、Claudin-1, Occludin の低下を認めた。ZO-1 は変化を認めなかった。Tight junction 障害を介した BT 発症が示唆された。



3) オートファジーに関してはオートファジーの能力を全身で欠損したマウス (Atg ノックアウトマウス) を用いて CPT-11 を投与し、腸間膜リンパ節を摘出し、細菌の有無を培養および PCR で検索し BT の発症を確認する。また腸管内の炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TNF) を測定し、オートファジーの BT 発症に及ぼす影響を現在確認中である。

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 4 件)

1. Chikakiyo M, Yoshikawa K et al Kampo medicine “Dai-kenchu-to” prevents CPT-11 induced small intestinal injury in rats Surgery Today 2011; in press (査読有り)

2. Nakao T, Yoshikawa K et al Irinotecan injures tight junction and causes bacterial translocation in rat. J Surg Res. 2010; 10:1-7 (査読有り)

3. Yoshikawa K et al Sonic hedgehog pathway in adenoma-carcinoma sequence. J Gastroenterol, 2009; 44:1113-1116 (査読有り)

4. Yoshikawa K et al Increased risk of lymph node metastasis in

mucosal gastric cancer with extra indication for endoscopic mucosal resection. J Am Coll Surg 2009; 208:1045-1050 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 中尾寿宏
CPT11によるBacterial Translocationの発症とTight Junction傷害
第110回 外科学会 2010.4.8 名古屋

2. 小松 正人
CPT-11による腸管粘膜傷害と大建中湯の予防効果に関する研究
第45回 日本外科代謝栄養学会 2009.7.9 名古屋

3. 井川 浩一
CPT-11による腸管粘膜障害と大建中湯の予防効果に関する研究
第109回 外科学会 2009.4.2 福岡

〔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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川幸造 (YOSHIKAWA KOZO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：80448331

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

島田光生 (SHIMADA MITSUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10216070

栗田信浩 (KURITA NOBUHIRO)

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号：30335814

岩田貴 (IWATA TAKASHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

准教授

研究者番号：00380022

西岡将規 (NISHIOKA MASANORI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50398020

高橋章 (TAKAHASHI AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90304047