

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461926

研究課題名(和文)短腸症モデルラットを用いたポリアミン摂取による治療効果の検討

研究課題名(英文)Oral administration of polyamines promote adaptation in rodent model of short bowel syndrome

研究代表者

笠原 尚哉 (Kasahara, Naoya)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50382891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ポリアミン(PA)経口摂取の治療効果を検討するためにラット短腸症モデルを作成した。同モデルにおいて標的組織である残存空腸、回腸、肝臓、全血液で投与PA濃度依存性に含有濃度が増加すること、小腸絨毛高が増高すること、糞便・血清のIgA濃度が食餌PA濃度依存性に増加するという結果が得られた。また、病理組織学的検査の結果から腸管不全関連肝障害を軽減する可能性が示唆された。糞便・血清中のIgAは腸管のバリア機能をよく反映することが知られており、PA経口摂取で残存小腸の機能を賦活化することにより完全経静脈栄養から離脱して致命的な合併症を回避し生存率を改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We made short bowel syndrome model rat by resecting of 2/3 small intestine to examine the efficacy of polyamine. In this rodent short bowel syndrome model, polyamine intake orally increase spermidine and spermine in intestine and blood. Additionally, in parallel with the concentration of dietary polyamines, progression of remnant jejunal villous height and IgA elevation in whole blood and feces are confirmed. Furthermore, histological findings revealed dietary polyamines may delay hepatic steatosis which develop as a late complication of short bowel syndrome. It is well known that IgA content in blood and feces correlate positively with gut barrier function. Polyamine intake may improve survival by activating the function of remnant intestine resulting in independence of parenteral nutrition.

研究分野：消化器外科学

キーワード：短腸症 ポリアミン 腸管免疫 腸管不全関連肝障害

### 1. 研究開始当初の背景

小腸は、先天的要因や炎症、虚血に伴う壊死で外科的に大量切除を行うことにより短腸症候群・吸収不良・蠕動障害をきたす。結果として栄養吸収が不十分となり長期間の完全経静脈栄養が必要となる。完全経静脈栄養では肝障害や中心静脈挿入部の血栓症、カテーテル関連の敗血症などの合併症が高率に発生する。これらの合併症により完全経静脈栄養施行患者の3年生存率は70%、5年生存率は63%とする報告もあり、合併症の程度や背景疾患・年齢などによって小腸移植の適応となる。小腸移植の臨床において問題となるのは、手術手技に伴う合併症・拒絶反応・感染などが挙げられる。グラフトの血栓症・血流不全などの手術に伴う技術的な問題点は症例数が増加するにしたがって改善してきている。一方、小腸はもともと体内の80%の免疫細胞が存在する臓器であり、移植によりドナーの免疫細胞はレシピエントの体内にグラフトとともに移植されることとなる。また、小腸上皮は大部分がドナー由来のままとなることもあり免疫原性が高く他の固形臓器と比較して免疫制御は困難である。tacrolimusによる維持療法に、近年IL-2モノクローナル抗体・抗胸腺グロブリン・sirolimusを加えることで早期拒絶発症率は低下してきたものの依然として最適な免疫抑制療法は見つかっておらず、施設ごとに独自のレジメンによる免疫抑制剤投与を行っているのが現状である。また、小腸は通常時には抗菌ペプチドを産生するなどして粘膜バリアーを形成して常在細菌叢の侵入を防御しているが、虚血再灌流傷害やレシピエントの免疫細胞の攻撃、組織傷害に伴う粘膜バリアー機構の破綻でbacterial translocationから敗血症へと進行する可能性が高まる。以上より、小腸移植の成績を向上させるためには採取したグラフト小腸を移植までの間適切な方法で保存して粘膜傷害を最小限にして移植後の敗血症を予防する、移植後早期の(虚血)再灌流傷害を軽減する、長期グラフト生着・生存率向上を目指して小腸移植に適した免疫抑制療法を開発することが考えられている。

### 2. 研究の目的

本申請研究で使用するポリアミン(以下PAと省略する)は主に食物から体内に吸収される化合物で、加齢に伴い各臓器組織内の含有量が低下する事や、細胞増殖や抗アポトーシスなどの機能に関与している事で知られている(Igarashi K. et al. JBC (2009))。PAは厚生労働省により「食品添加物」として承認されており、既に様々な企業から「粉ミルク」や「発毛促進サプリメント」の原材料の一つとして一般販売されている。申請者は別実験として高齢ラットにPAを自由摂食させる事による全組織の「若返り現象」(第4回日本ポリアミン学会 2013年:特願

2012-231125:論文投稿中)そして疑似肝臓移植モデルにおける「肝再生の促進」や「虚血再灌流障害の緩和」などの効果(第113回日本外科学会 2013年:論文投稿中)を明らかにしている。PAは小腸で吸収される事から小腸の機能賦活化に寄与する可能性を秘めており、本申請研究で有効性について検討する。

本研究成果は、先天的・後天的短腸症患者に対して、移植用小腸グラフトの移植時における「虚血再灌流障害の緩和」「グラフトの早期機能回復」、移植適応外となった場合の「残存小腸の機能活性化」を期待した全く新しい治療法の開発に貢献する事が期待される。学術的には術前後の任意ポイントでRNA抽出を行い、経時的かつ網羅的な「遺伝子発現の変化」を追跡する事が可能となる。詳細な遺伝子変化を解析する事により、小腸機能や再生の機序が分子レベルで明らかにする事が期待される。

### 3. 研究の方法

雄性Luc-Tgラット7週令(体重200-250g)を通常ケージ1ケージに1匹ずつ入れて固形飼料(CE-2日本クレア)水道水を自由摂食させ1週間の馴化飼育を行った後に一晩絶食させて実験に使用する。

腹部正中切開を加えて、Treitz靭帯より5cm肛門側の空腸から回盲部10cm口側の回腸までの小腸を切除する(2/3小腸切除モデル)。7-0ポリグリコネート縫合糸で残った空腸回腸を全層一層で端々吻合する。腹部は3-0ナイロンで二層縫合する。コントロールとして、Treitz靭帯より5cm肛門側の空腸で切断して再吻合するモデルを作成する。吻合部の狭窄や縫合不全などで経口摂食不良となる個体もあることから、術後3週間の時点において術前の体重から15%以上の体重減少があった個体はその後の実験の対象から除外する。15%以下の体重減少にとどまった個体のみ解析対象として無作為にPA濃度別の実験群へと割り付けを行う。各濃度PA含有食;0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%(PAはスペルミジン、スペルミンを等量ずつ混合)を自由摂食させて4群に分けて自由摂食させる。2週間後、4週間後にsacrificeして空腸、回腸、肝臓、血液、糞を採取した。採取した検体を用いて、主なPAとして知られるプトレシン、スペルミジン、スペルミンの血清、残存空腸、残存回腸、肝臓中の含有量をHPLCにより測定した。また、ポリアミン摂取による腸管免疫増強作用を評価するために血清・糞中のIgAをELISAで測定した。組織標本を作製して空腸、回腸の絨毛高を測定して比較した。Real-time PCR法により残存空腸組織におけるDPP4、Si、Neurog3、Sox9のmRNA発現を定量した。さらに、次世代シーケンサーを用いて16S rRNA解析を行い各群の糞便に含まれる細菌叢解析し摂取PAが腸内細菌叢に与える影響について検討した。短腸症の晩期合併

症の一つである脂肪肝についても各群間の差異を検討した。

#### 4. 研究成果

空腸、回腸、肝臓、血液で PA 含有量が食餌中 PA 濃度依存性に増加しており、経口摂取により有意に各組織の PA 濃度が増加することが示された。特に、今回飼料中に添加していないプトレシンが回腸組織内のみで顕著に増加していた(図1)。

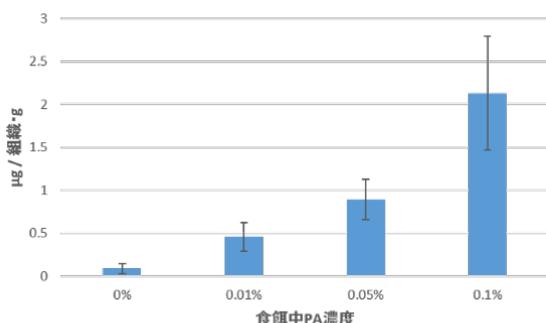


図1 短腸症モデルラット 回腸組織プトレシン濃度

分解酵素 (diamine oxidase) が腸内に存在するため食物に含まれているプトレシンは分解が進み消化管からの吸収量(到達量)は低下する。本実験でのプトレシン増加は大部分が PA 投与により変化した細菌叢が産生したものと推測された。残存空腸の絨毛高や腸管バリア機能の指標とされる血清・糞便中の IgA 濃度も飼料中の PA 濃度依存性に増加していた。PA が腸内細菌叢の変化を促進した間接的な影響か、IgA を産生する機序に直接的に働きかけた結果か詳細な機序は不明であり今後の研究課題の一つである。また、PA 投与により短腸症の晩期合併症の一つである小腸不全関連肝障害の抑制効果を病理組織標で確認した(図2)。

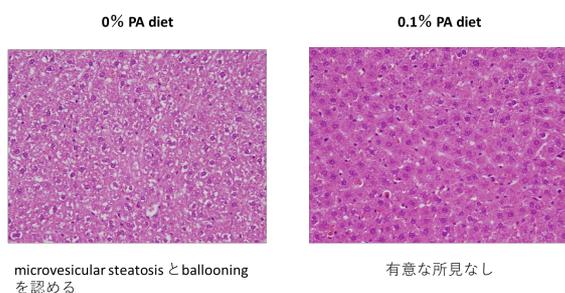


図2

さらに、糞便から抽出した DNA を用いて行った 16S rRNA 配列解析による細菌叢解析では、図3に示すように(解析結果を主座標分析図で表したもの)通常食から PA 0%食への切り替えで劇的な腸内細菌叢の変化を生じていた。また、PA 食摂取後 4 週間の細菌叢解析では数種類の菌種において PA 濃度依存性の変化を生じていた。今後行う糞便のメタボローム解析の結果と合わせて PA が短腸症モデルの腸内細菌叢の組成に与える影響と短

鎖脂肪酸などの他の既知の

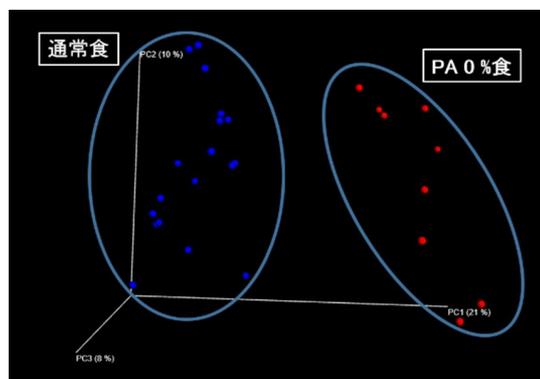


図3 16S rRNA配列解析による細菌叢解析 主座標分析図

有効成分増加の有無や新規の有効代謝物に関して探索を進める予定である。

#### 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2件)

(1) Yokota S, Ueki S, Ono Y, Kasahara N, Pérez-Gutiérrez A, Kimura S, Yoshida O, Murase N, Yasuda Y, Geller D, Thomson A: Orthotopic mouse liver transplantation to study liver biology and allograft tolerance. *Nature Protocols* 2016 Jul;11(7):1163-74.

doi: 10.1038/nprot.2016.073.

(2) Okumura S, Teratani T, Fujimoto Y, Zhao X, Tsuruyama T, Masano Y, Kasahara N, Iida T, Yagi S, Uemura T, Kaido T, Uemoto S.: Oral administration of polyamines ameliorates liver ischemia-reperfusion injury and promotes liver regeneration in rats. *Liver Transpl.* 2016 Sep;22(9):1231-44.

doi: 10.1002/lt.24471.

〔学会発表〕(計1件)

短腸症モデルラットを用いたポリアミン摂取による治療効果の検討

〔図書〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

短腸症モデルラットを用いたポリアミン摂取による治療効果の検討

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

(1)

名称: ポリアミンを有効成分とする、軟骨組織の再生を促進するための組成物

発明者: 寺谷工、他

権利者: 寺谷工、他

種類：特開 2016-117772(P2016-117772A)  
番号：  
出願年月日：2016年3月25日  
取得年月日：  
国内外の別：  
(2)  
名称：ポリアミンを有効成分とする、軟骨組織の再生を促進するための組成物  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：  
取得状況(計1件)

(1)  
名称：ポリアミンを有効成分とする造精機能障害を改善するための組成物  
発明者：寺谷工、笠原尚哉、他  
権利者：寺谷工、笠原尚哉、他  
種類：特願 2015-33785(P2015-33785)  
番号：5909173  
出願年月日：2015年2月24日  
国内外の別：国内、国外

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 尚哉 (KASAHARA, Naoya)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50382891

### (2) 研究分担者

寺谷 工 (TERATANI, Takumi)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70373404

三木 厚 (MIKI, Atsushi)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20570378

佐久間康成 (SAKUMA, Yasunaru)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10296105

藤本康弘 (Fujimoto, Yasuhiro)  
京都大学・医学部・助教  
研究者番号：80335281

佐田 尚宏 (SATA, Naohiro)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20261977

上本伸二 (UEMOTO, Shinji)  
京都大学・医学部・教授  
研究者番号：40252449

小林英司 (KOBAYASHI, Eiji)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00245044

安田是和 (YASUDA, Yoshikazu)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40158001

浦橋泰然 (URAHASHI Taizen)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90277161

(3) 連携研究者  
該当なし