

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008
 課題番号：20791302
 研究課題名（和文）
 ボンベシン投与による腸管ペースメーカー細胞機能維持とその生物学的作用の解析
 研究課題名（英文） Analysis of biological action of Bobmes in that maintains the function of interstitial cells of Cajal
 研究代表者
 樋口 恒司（HIGUCHI KOJI）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：00433251

研究成果の概要：

小腸移植後の強力な免疫抑制状態下において、ボンベシンを同時投与することで腸管神経節細胞の萎縮を防ぐことがこれまでの研究成果により示され、この研究成果を踏まえて、本研究においては更にボンベシン投与の、腸管ペースメーカー細胞である Cajal 細胞への影響を解析した。結果、腸管神経節細胞と同様、Cajal 細胞も FK506 の投与により障害を受けている可能性が示唆され、また FK506 による強力な免疫抑制下でも c-kit 陽性 Cajal 細胞の構造が維持されることが示された。これらの細胞におけるボンベシンレセプターの局在解析を実施している状況である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学・神経ペプチド・小腸移植

1. 研究開始当初の背景

国際的にも小腸移植の施行症例数は増加の傾向にあり、小児をはじめとする小腸機能不全の有意義な治療法の選択肢の一つとして認められつつある。しかし、強力な免疫原性をもつ小腸を移植対象臓器とするため、その移植後長期成績の向上はまだまだ難しく、急性拒絶反応の抑制をはじめ、移植方法、臓器の保存方法、免疫寛容導入法などについて試行

研究がなされている。FK506 を中心とした免疫抑制法により急性拒絶反応を克服するようになったが、その側面で消化管機能障害、また、副作用として中心神経系への毒性が報告されるようになってきた。こうした機能低下や副作用は拒絶反応の惹起、重篤な感染症、慢性拒絶反応へつながることが知られている。消化管運動や粘膜の維持といった小腸の消化管機能は腸管神経によりコントロール

されており、神経が離断された状態で血流のみを再建される移植小腸においてはこうした消化管機能の低下は不可避であるとされてきた。しかし、我々はこれまでの研究においてラット同系異所性小腸移植モデル及び異系異所性小腸移植モデルを用いて腸管神経の萎縮現象は FK506 の神経毒性によっても引き起こされることを証明した。さらに神経ペプチドを同時投与することで神経萎縮が予防できることを明らかにした (J Pediatr Surg 2006;41:1957-1961)。さらに小腸移植実験過程において移植腸管運動機能を検討する上で神経節及び神経線維の分布検索と同様に腸管ペースメーカー細胞の分布検索が重要であると認識した。腸管ペースメーカー細胞は腸管内に分布する神経と密接な関係を有しているだけでなく、Stem Cell Factor 分泌細胞との関連も注目されており、粘膜・神経栄養因子の研究を行う上で欠かすことのできない検討項目といえる。これまでの国内外の報告においては小腸移植、虚血再灌流障害により腸管ペースメーカー細胞が障害を受け、腸管蠕動運動が低下するという現象を報告したものしかなく、小腸移植において腸管ペースメーカー細胞障害の防止・維持についての研究が必要と判断した。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの実験結果をふまえ、小腸移植後の強力な免疫抑制下においても消化管機能および腸管神経機能を低下させず、さらには腸管神経のみならず腸管ペースメーカー細胞の維持を促す管理方法を開発することを目的とする。

また、さらには神経ペプチド・ボンベシンのこれらの細胞に対する作用機序を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

同種異系同所性ラット小腸移植モデルを作成し、免疫抑制剤として FK506 を投与しつつ、神経ペプチドの一種、bombesin の投与群と非投与群に分け、腸管神経の他、腸管ペースメーカー細胞について注目し、以下の点について研究期間内に明らかにする。

実験 A 同種同系同所性小腸移植を用い、急性期 (移植後 4 週間) において FK506 および bombesin の投与量における腸管神経及び腸管ペースメーカー細胞の形態学的変化について解析を行い、bombesin の投与効果を評価する。

実験 B 同種異系同所性小腸移植を用い、急性期 (移植後 4 週間) 及び慢性期 (移植後 3 ヶ月以降) において実験 A と同様の手法を用い、評価を行う。また、蛍光ラベル結合処

理デキストランのラット経口投与方法を用いた腸管運動機能の評価を行う。

実験 A、B ともに移植ラットより定期的に血液採取を行い、炎症関連サイトカインや栄養因子の検索を実施する。

bombesin receptor の発現についても

bombesin receptor subtype-3 を用いた免疫組織化学的手法を用いて検索し、bombesin が腸管を構成する細胞・組織のどのような部位に、どのように作用しているのかを明らかにする。

[具体的手法]

実験 A 同系同所性小腸移植モデルを用いた移植後早期の腸管神経及び腸管ペースメーカー細胞に与える FK506 と bombesin の影響

雄性 inbred Lewis rat をドナー及びレシブエントとして同系同所性小腸移植モデルを作成し、免疫抑制剤 FK506 の連日筋注投与群と FK506 非投与群を作成し、さらに bombesin の投与の有無により以下の群に分ける。Bombesin の投与方法は Alzet Osmotic mini Pump(model 2002)を皮下に留置し、持続投与とする。

Group1(n=10): 生理食塩水投与 28 日間

Group2(n=10): FK506(0.3mg/kg/day, im) 単独投与 28 日間

Group3(n=10): 生理食塩水 + Bombesin (10µg/kg/day 皮下持続) 28 日間

Group4(n=10): FK506(0.3mg/kg/day, im) + Bombesin (10µg/kg/day 皮下持続) 28 日間

Group5(n= 5): Normal Control (Lewis rat/ 単開腹 + 生理食塩水入り Osmotic mini Pump 皮下留置)

移植後 7 日目、14 日目、28 日目に静脈血を採取し、かつ移植後 28 日目には移植モデル rat を犠牲死させ、パラホルムアルデヒドによる灌流固定の後、移植小腸グラフトを採取する。

各グループにおいて採取したサンプルを以下の手法により検索する。

① 組織学的 (形態学的) 検討評価

凍結薄切標本及び Whole mount 標本を作成し、c-kit 抗体を用いた免疫染色法にて腸管ペースメーカー細胞の評価を行う。また Stem Cell Factor についても検討を加える。一方、neuronal marker PGP9.5 による神経線維、神経節細胞の染色を行い神経萎縮の程度を同時に評価する。

② サイトカイン発現の検討評価

移植後 7 日目、14 日目、28 日目に採取した血液サンプルを用いて、mRNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA を作成増幅し、IL-1、IL-2、IL-6、IL-10 等炎症関連サイトカインの発現及び NGF、EGF 等の栄養因子や Stem Cell Factor の発現について定量を

行う。

③ Bombesin receptorの発現検索

Bombesin receptor subtype-3抗体を用いてレセプター発現部位についても組織学的検索を行う。また、各群において筋層の一部を採取し、PCR法を用いてレセプター発現定量を行い、比較検討する。

実験 B 異系同所性小腸移植モデルを用いた移植後早期、及び慢性期の腸管神経及び腸管ペースメーカー細胞に与える FK506 と bombesin の影響

実験 A と同様の手法を用いて異系同所性小腸移植を行い、急性期（移植後 28 日）慢性期（移植後 90 日）において腸管神経及び腸管ペースメーカー細胞の形態学的評価を行う。加えて、血液を採取し、サイトカイン、神経栄養因子、Stem Cell Factor 等の免疫学的検討も行う。また、腸管運動機能についても検討を行う。

Group1(n=6): FK506(0.3mg/kg/day, im) 単独投与 28 日間

Group2(n=6): FK506(0.3mg/kg/day, im) + Bombesin(10µg/kg/day 皮下持続) 28 日間

Group3(n=6): FK506(0.3mg/kg/day, im) 単独投与 90 日間

Group4(n=6): FK506(0.3mg/kg/day, im) + Bombesin(10µg/kg/day 皮下持続) 90 日間

Group5(n=6): Normal Control (Lewis rat/単開腹+生理食塩水入 Osmotic mini Pump 皮下留置)

移植後 14 日、28 日、60 日、90 日に移植後ラット血液を採取し、炎症サイトカイン、神経栄養因子定量用サンプルとする。Group 1,2 は 28 日目に、Group3,4,5 は 90 日目に犠牲死により移植腸管グラフトを採取、また、同時にレシピエント残存腸管を採取し mRNA 定量の際の比較サンプルとする。

① 組織学的（形態学的）検討評価： c-kit 抗体、PGP9.5抗体等。

② 炎症関連サイトカイン発現の検討評価： PCR法、ELISA定量法。

③ Bombesin receptorの発現検索

以上の項目について実験Aと同様の手法により検索を行う。

運動機能評価法：主に Group3,4 の移植後ラットに FITC 標識デキストランを経口投与し、2 時間後に犠牲死の上、小腸を 10cm 長毎の segment として採取。腸管内容物を溶解液として採取し、それぞれ蛍光分光法にて得られた数値を腸管内濃度分布として構成し、各群間で比較検討する。（参考：Gut 2003;52:1278-1285） 形態学的評価と合わ

せ、腸管ペースメーカー細胞に対する神経ペプチドの影響を形態面、機能面から総合的に検討評価する。

4. 研究成果

ラット異系小腸移植を実施。移植後ラットを

Group A: FK506/生理食塩水投与群

Group B: FK506/ボンベシン投与群

の 2 群に分けて比較した。

FK506、Bombesin の投与量を

FK506 : 0.3mg/kg/day, im

Bombesin : 10µg/kg/day 皮下持続

と設定した。また、Bombesin の投与方法は Alzet Osmotic mini Pump(model 2002)を皮下に留置し、持続投与とした。

移植後 28 日目にラットを安楽死させ、移植小腸グラフトを採取。10%緩衝ホルマリンにて固定し、切片作成の上、PGP9.5 抗体、c-kit 抗体を用いて、免疫組織化学染色を実施。

Group A、Group B の両群で PGP9.5 陽性腸管神経節細胞数、c-kit 陽性細胞数、および両者の分布を計測し、比較検討した。

小腸移植後の強力な免疫抑制状態において、ボンベシンを同時投与することで FK506 の神経毒性により引き起こされる腸管神経節細胞の萎縮を防ぐことがこれまでの我々の研究により示されていたが、本研究においては更に腸管ペースメーカー細胞である Cajal 細胞も FK506 の投与により障害を受けている可能性が示唆され、また、神経ペプチド・ボンベシンの同時投与により Cajal 細胞の構造が維持されることが示された。

[神経節細胞と Cajal 細胞の分布比較]

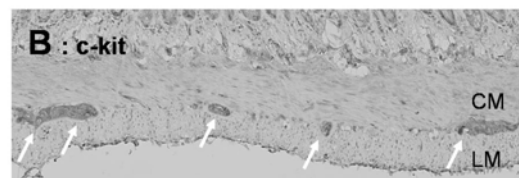
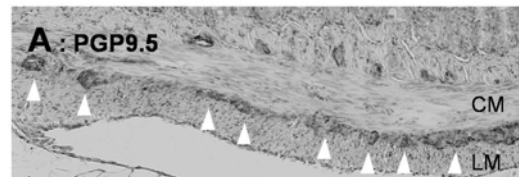


写真 A : 神経節細胞の分布(PGP9.5 染色)

写真 B : Cajal 細胞の分布(c-kit 染色)

Group B の検体において比較。

Cajal 細胞は腸管神経節の約 60%に分布し、また神経節の周囲に集中して分布していることが示されている。

[c-kit 染色標本写真]

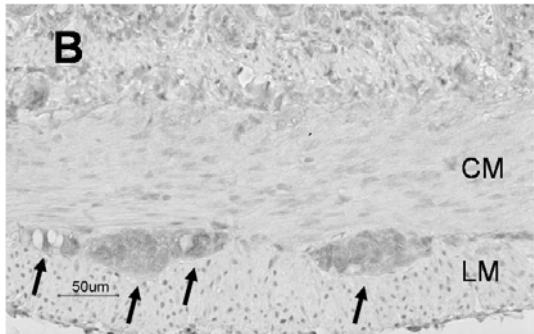
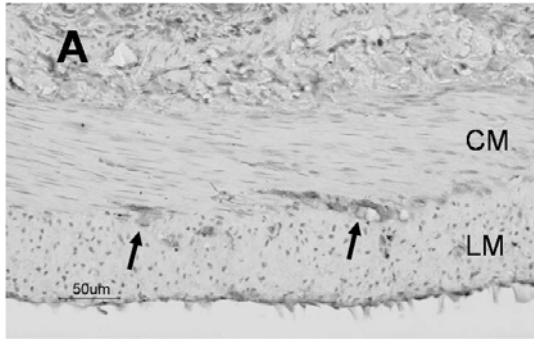
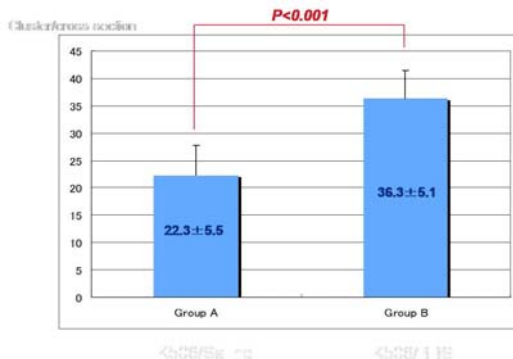


写真 A : FK506 連日投与/生理食塩水群
写真 B : FK506 連日投与/ボンベシン群
c-kit 陽性細胞 (矢印) はボンベシン投与群で明らかに形態が維持されている。

[c-kit 陽性細胞 cluster 数の比較]



FK506/生理食塩水群 : 22.3+/-5.5C/CS
FK506/ボンベシン群 : 36.3+/-5.1C/CS
(C/CS : Clusters per cross-section)

形態学的評価に加え、定量的にも有意差をもってボンベシン投与群で c-kit 陽性細胞数が維持されていることが示された。(p<0.001)

現在、腸管神経節細胞、Cajal 細胞におけるボンベシンレセプターの局在解析を免疫組織化学的染色および蛍光免疫組織化学的手法をもちいて実施している状況である。

移植小腸グラフト採取と同時に血液採取も実施し保存。

現在、炎症関連サイトカインの発現及び NGF、EGF 等の栄養因子や Stem Cell Factor の発現について定量解析を実施している。
(検討評価、成果発表 未)

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)

Koji Higuchi, Osamu Kimura, Taizo Furukawa, Hiromi Kinoshita, Naomi Iwai. Bombesin can minimize impairments of interstitial cells of Cajal induced by FK506 in small bowel transplantation. Journal of Pediatric Surgery 44: 541-545, 2009
(査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 恒司 (HIGUCHI KOJI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 00433251