

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590808

研究課題名（和文） 腸管アルカリフォスファターゼが炎症性腸疾患の粘膜防御機構に果たす役割

研究課題名（英文） The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory bowel disease

研究代表者

杉本 健 (SUGIMOTO KEN)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20529507

研究成果の概要(和文):炎症性腸疾患において粘膜のバリア機構はその病勢に大きく関与する。我々は、過去に腸管バリア機構を増強すると報告されてきた腸管アルカリフォスファターゼ (IAP) に着目した。遺伝子操作により IAP をマウスの腸管粘膜局所で増減させる実験系の確立を探索した。炎症性腸疾患のモデルマウスとしては、過去の報告では安定した病気の作成が困難とされたクローン病類似モデルであるマウス TNBS 腸炎を腹腔麻酔の代わりに吸入麻酔を使用することにより安定したモデルにすることに成功した。これらの系を用いて、今後 IAP の粘膜防御におけるメカニズムをさらに検討していく予定である。

研究成果の概要(英文): The mucosal barrier function may contribute to the disease activity of inflammatory bowel disease (IBD). Previous studies showed that the intestinal alkaline phosphatase (IAP) maintains mucosal integrity of the gut. We tried to establish the experimental system which increases or decreases IAP on intestinal mucosa by using gene transfer system. It is known that TNBS colitis, which is one of mouse models of Crohn's disease, is very difficult to induce colitis stably. However we succeeded in establishment of the system which makes the stable TNBS colitis by using continuous inhalation anesthesia with sevoflurane instead of conventional intraperitoneal anesthesia. We will further examine that the mechanism of IAP in mucosal barrier functions by using these models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：一般

キーワード：炎症性腸疾患、粘膜防御機構、腸管アルカリフォスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

腸管アルカリフォスファターゼ (intestinal alkaline phosphatase: IAP) が腸管粘膜のバリア機構を増強し、炎症反応制御に深く関与しているという興味深い2つの論文が相次いで発表された(Bates JM, Cell Host Microbe,

2007, Goldberg RF, Proc Natl Acad Sci USA, 2008)。興味深いことに生体内での IAP タンパクの発現は飢餓状態(starvation)では強く抑制されることが知られており (Hodin RA, Am J Physiol, 1994, Hodin RA, Am J Physiol, 1995)、さらに、潰瘍性大腸炎の患

者の大腸粘膜においては免疫組織化学染色を用いた症例で IAP 活性が低下していることが報告されている (Torres MI, Pathol Res Pract, 2007)。

2. 研究の目的

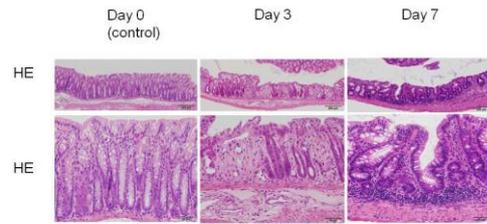
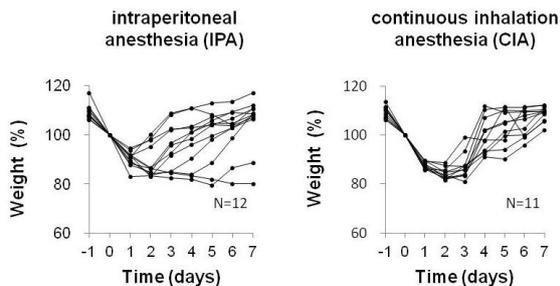
現在のところ IAP が炎症性腸疾患の病態にどのように関与しているのかは殆どわかっていないが、慢性的な低栄養状態をきたしやすい潰瘍性大腸炎の患者では、低栄養→IAP 活性の低下→粘膜防御機能の障害→炎症悪化→栄養状態悪化というような悪循環が起きていることが推察される。よって、何らかの方法で大腸粘膜での IAP 活性を増強することによってこの悪循環を断ち、炎症を制御することが可能になると考えられるため、今回の研究で IAP の粘膜防御機構への関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- ① マウス実験腸炎モデルの大腸粘膜における IAP の発現レベルの解析
- ② IAP 発現ベクターおよび IAP 抑制 shRNA ベクターの作成
- ③ 粘膜局所での IAP 強制発現、IAP 発現抑制がマウス実験腸炎へ及ぼす変化の解析

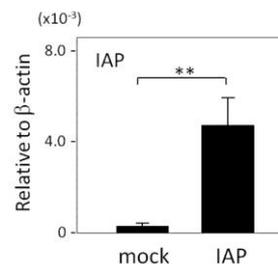
4. 研究成果

- ① マウス実験腸炎モデルとして TNBS 腸炎モデルを使用した。個体間での炎症や体重減少の程度のばらつきが非常に大きいことが問題となった。この原因としては従来 TNBS を注腸する際には麻酔として Avertin の腹腔内麻酔を使用していたが、この方法だと均一な麻酔をかけることができず、個体間での麻酔時間を調整することが困難であり、それにより TNBS の腸内滞留時間も大きく異なるため、発症する腸炎の程度や致死率にも個体間で大きなばらつきがおきてしまうためであった。試行錯誤の結果、Avertin の代わりに吸入麻酔薬の Sevoflurane を使用し、マウスの TNBS 注腸中の体位を倒立保持し麻酔深度を調節することにより、非常にばらつきの少ない TNBS 腸炎発症モデルの作成手技を確立した。



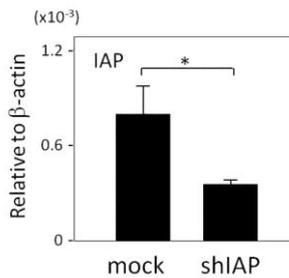
Day 7 の TNBS 腸炎マウスの大腸粘膜より mRNA を抽出し、PCR にて IAP の発現量を調べたところ、コントロールと比較して IAP の発現量は有意に減少していた。

- ② マウス大腸粘膜より抽出した cDNA をテンプレートとして使用した。IAP 発現ベクター作成に関しては、まず Full length mouse IAP (alkaline phosphatase 3:AKP3) を RT-PCR で増幅し、pCR2.1TOPO vector (Invitrogen) でクローニングした。制限酵素処理後、pIRES-hrGFP II vector (Stratagene) と pSecTag2/Hygro vector (Invitrogen) を用いてサブクローニングした。作成したベクターを COS7 細胞に transfection し、タンパク発現をチェックした。作成した IAP 発現ベクターあるいはコントロールである mock ベクターをマウスの大腸に麻酔下開腹下で直接 non-microbial-mediated gene-delivery system を用いて injection した。1 週間後マウス大腸を摘出し、大腸粘膜より mRNA を抽出。PCR にて IAP の発現を調べたところ、IAP ベクターを transfection した大腸粘膜において有意な IAP の発現が認められた。



IAP 抑制 shRNA ベクター作成に関してはまず、BLOCK-iT RNAi Target Screening System (Invitrogen) を用いて IAP に対するサイレンシング活性が最も強い shRNA を判定した。サイレンシング活性が最も強い shRNA シークエンスを決定し BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Kit (Invitrogen) を用いて IAP 抑制 shRNA ベクターを作成した。作成したベクターを CT26 (マウス大腸癌細胞株) に transfection し、IAP 発現抑制効果 PCR にてチェックしたところ、mock ベクターと比較して IAPshRNA ベクターを transfection した CT26 において有意な

IAP 発現の低下を認めた。



しかしながら、マウス大腸に shIAP を transfection したところ、mock ベクターに比較して有意な IAP の発現低下は得られず、*in vivo* における有効な shIAP ベクターの完成には残念ながら未だにいたっていない。

- ③ とりあえず、*in vivo* における IAP 強制発現の系と IBD のマウス腸炎モデルである TNBS 腸炎の安定したモデルは今回の申請期間内に完成したので、今後はこれらの系を用いて、*in vivo* における粘膜局所での IAP 強制発現が TNBS 腸炎へ及ぼす変化の解析を行っていきたいと考えている。

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 9 件)

- ① Hanai H, Sugimoto K, et al. (計 13 人, 10 番目) 査読有: Nutritional therapy versus 6-mercaptopurine as maintenance therapy in patients with Crohn's disease. *Dig Liver Dis*, 44(8):649-54. 2012.
DOI: 10.1016/j.dld.2012.03.007.
- ② Takayanagi Y, Osawa S, Sugimoto K, et al. (計 11 人, 2 番目, 11 番目) 査読有: Norepinephrine suppresses IFN- γ and TNF- α production by murine intestinal intraepithelial lymphocytes via the β (1) adrenoceptor. *J Neuroimmunol*, 245(1-2):66-74. 2012.
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.007.

- ③ Ikeya K, Osawa S, Sugimoto K, et al. (計 8 人, 2 番目, 8 番目) 査読有: Decompression side tube-equipped double-balloon enteroscopy extends intubation depth and reduces patient discomfort. *Endoscopy*, 44; Suppl 2:E256-7. 2012.
DOI: 10.1055/s-0032-1309356.
- ④ Uotani T, Osawa S, Sugimoto K, et al. (計 14 人, 8 番目, 9 番目) 査読有: Ability of rabeprazole to prevent gastric mucosal damage from clopidogrel and low doses of aspirin depends on CYP2C19 genotype. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10(8): 879-885, 2012.
DOI: 10.1016/j.cgh.2012.04.016.
- ⑤ Yamade M, Osawa S, Sugimoto K, et al. (計 11 人, 8 番目, 9 番目) 査読有: Trastuzumab has opposing effects on SN-38-induced double-strand breaks and cytotoxicity in HER2-positive gastric cancer cells depending on administration sequence. *Anticancer Res*, 32(1):105-14, 2012.
- ⑥ Sugimoto M, Osawa S, Sugimoto K, et al. (計 7 人, 4 番目, 5 番目) 査読有: Proton Pump Inhibitor Therapy before and after Endoscopic Submucosal Dissection: A Review. *Diagn Ther Endosc*, 2012;2012:791873. Epub 2012.
DOI: 10.1155/2012/791873.
- ⑦ Terai T, Osawa S, Sugimoto K, et al. (計 9 人, 8 番目, 9 番目) 査読有: Lymphomatoidgastropathy mimicking extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type: a case report.

World J Gastroenterol, 18(17):2140-4. 2012.

DOI: 10.3748/wjg.v18.i17.2140.

- ⑧ Kawasaki S, Osawa S, Sugimoto K, et al (計 9 人, 2 番目, 3 番目) 査読有 : Cecal vanishing tumor associated with cytomegalovirus infection in an immunocompetent elderly adult. World J Gastrointest Oncol, 15; 2(11): 417-20, 2010.

DOI: 10.4251/wjgo.v2.i11. 417.

- ⑨ Osawa S, Sugimoto K, et al. (計 9 名, 1 番目, 8 番目) 査読有 : Treatment with Corticosteroid for Pericardial Effusion in a Patient with Advanced Synchronous Esophageal and Gastric Cancers following Chemoradiotherapy. Case Rep Gastroenterol, 4:229-237, 2010.

DOI: 10.1159/000318751.

[学会発表] (計 4 件)

- ① IBD における粘膜治癒の位置付け クロウン病の粘膜治癒を得るための治療選択 術後症例からの検討 杉本健、飯田貴之、花井洋行 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会 2012 年 5 月 13 日東京
- ② サイトメガロウイルス感染症による下部消化管病変の臨床的、内視鏡的特徴 非炎症性腸疾患患者における検討 鈴木崇弘、杉本健、他 第 82 回日本消化器内視鏡学会総会 2011 年 10 月 22 日福岡
- ③ 潰瘍性大腸炎中等症・重症例における手術回避に関与する因子の検討 杉本健、大澤恵、他 第 52 回日本消化器病学会大会 2010 年 10 月 13 日横浜
- ④ サイトメガロウイルス感染症を合併し

たステロイド抵抗性潰瘍性大腸炎に対する治療戦略 当科におけるタクロリムス対白血球除去療法の retrospective study から 杉本健、濱屋寧、他 第 53 回日本消化器病学会大会 2011 年 10 月 20 日福岡

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 健 (SUGIMOTO KEN)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 20529507

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし