

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591958

研究課題名(和文) 小児難治性炎症性腸疾患の病態に関する二光子レーザー顕微鏡リアルタイムイメージング

研究課題名(英文) In vivo real-time visualization of in inflammatory bowel disease model mice using two photon laser scanning microscopy

研究代表者

内田 恵一 (UCHIDA, Keiichi)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30293781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：GFP発現マウスDSS colitisの盲腸壁を二光子励起顕微鏡下生体内イメージングすると、著明な炎症細胞浸潤と陰窩上皮細胞の傷害、脱落が観察できる。IFX投与群ではコントロール群(non-IFX)よりIFX投与後7日目(DSS投与後14日目)の陰窩内白血球浸潤数と陰窩欠損数は各々減少していた。陰窩上皮細胞に関しては、管腔側で一部脱落欠損するものや陰窩内上皮細胞が全欠損するものが観察できた。IFX投与後7日目のIFX投与群の陰窩の長さはnon-IFX群に比して有意に長く陰窩内上皮細胞の再生が確認できたが、陰窩底部から管腔側に向かう再生上皮の継時的変化は観察できなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to visualize in vivo therapeutic response of infliximab (IFX) in the murine UC model using two photon laser scanning microscopy (TPLSM) and to analyze their histopathological response morphologically. Both extensive inflammatory cell infiltration and the damage or loss of epithelial cells in the crypt was observed in vivo real-time in the dextran sodium sulfate (DSS) colitis model of green fluorescent protein (GFP) expressing mice using TPLSM. The number of leukocyte infiltrates within the crypt (2.4 versus 6 per field of view: FOV) and the number of crypt loss (1.0 versus 4.5 per FOV) were reduced in IFX-treated mice, compared with non-IFX, control mice. The length of colonic crypt (99.8 versus 80.0 micrometer) was increased in IFX-treated mice, compared with non-IFX, control mice. Serial change in regenerative epithelial cells was not observed, which regenerated from the bottom of the crypt toward the top of the crypt (the luminal side).

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：潰瘍性大腸炎 二光子レーザー顕微鏡 DSS腸炎マウス

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis: UC) とクローン病 (Crohn's Disease: CD) の総称で、原因不明の慢性難治性腸疾患である。これまでの精力的な研究によりその複雑な病態が分子レベルで解明されつつあり、遺伝的異常による疾患感受性の亢進、腸内細菌の変化、自然免疫の異常、獲得免疫の異常、免疫恒常性の破綻などが複雑に絡み合って発症する多因子疾患と考えられている。従来の分子生物学的手法、病理組織学的手法を中心とした研究により、分子レベルでの IBD 発症メカニズムはかなり解明されてきたが、さらなる病態解明には、生きた生命現象としての IBD 発症機序を実体的かつ統合的に捉えることができる生体内イメージングによる補完が必要であると考えられる。

二光子レーザー顕微鏡 (Two-Photon Laser Scanning Microscopy; TPLSM) は物質励起に二光子過程を利用した顕微鏡である。長波長の励起光を用いるため、共焦点顕微鏡より退色・光毒性が低く、生きたままの組織や細胞の観察が可能 (低光毒性) で、組織表面から数百マイクロメートルといった深部観察 (高透過性; 我々の腹腔内臓器の生体内イメージングでは 400 μm まで) も可能である。また、蛍光波長の異なる二つの蛍光色素 (Green Fluorescent Protein; GFP と Red Fluorescent Protein; RFP など) を 1 波長で同時励起する多重同時染色も可能である。

近年、マウス IBD モデルにおける Infliximab (IFX) の抗炎症効果の報告が散見され、我々も TPLSM を用いた生体内三次元消化管全層観察法により IFX の治療効果を可視化し、IFX の粘膜治癒過程における作用点、作用機序の解明を開始した。われわれの実験系を用いれば、'生きたマウス IBD モデル' における、'炎症細胞の動態' や '陰窩軸に沿った陰窩上皮細胞' の状態をリアルタイムイメージングし生体内評価できるだけでなく、数日後、数ヵ月後も同一マウスの大腸を繰り返し観察することで個体間誤差を少なくしながら継時的効果を生体内評価可能である。われわれの手法は、これまで分子レベルで解明されてきた IBD 発症メカニズムを実体的かつ統合的に補完し、炎症性腸疾患の病態解明と新規治療法の開発に貢献できると思われる。

2. 研究の目的

二光子レーザー顕微鏡を用いマウス IBD モデルの粘膜の炎症と再生を細胞レベル生体内リアルタイムイメージングし、炎症細胞浸潤とその消退だけでなく陰窩軸に沿った陰窩上皮細胞の傷害とその再生を生体内で評価する。

さらに、IBD 治療薬の生体内リアルタイムイメージングし、薬物の作用点および作用機序を検証する。

3. 研究の方法

<マウス IBD モデル>

UC モデルとしてデキストラン硫酸ナトリウム誘発性大腸炎 (DSS, MP Biomedicals, Inc., Solon, OH, USA) を用いた。

<IBD 治療薬>

UC モデルにおける infliximab (IFX, Mitsubishi Tanabe Pharma, Japan) の効果を臨床的及び形態学的に評価した。

<Experimental protocol>

2% DSS を 6 日間自由飲水させた DSS colitis model の薬物投与後 day7 より IFX 5mg/kg を腹腔内投与 (1 回) し、治療効果を検討した。

<二光子レーザー顕微鏡 (Two photon laser scanning microscopy: TPLSM)>

大腸の創外脱転による固定と大腸切開することなく漿膜側から粘膜側まで大腸全層を断層像で観察できる serosal-approaching method により、大腸を TPLSM で生体内リアルタイムイメージングした。

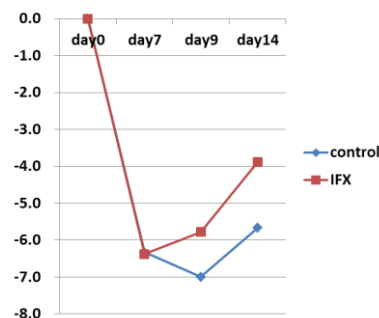
<蛍光標識抗 TNF α 抗体の生体内可視化>

Zenon Alexa Fluor 標識キット (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い、抗 TNF α 抗体 (Rabbit polyclonal, abcam, MA, USA) を Alexa Fluor 594 で蛍光標識後、経静脈的に投与。その結合部位を生体内リアルタイムイメージングした。

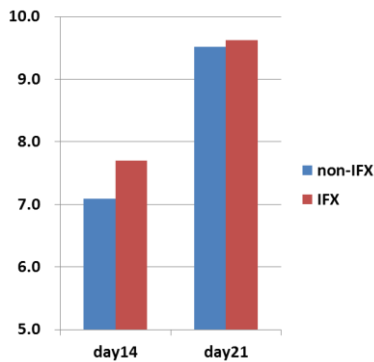
4. 研究成果

<DSS colitis における IFX の臨床的治療効果>

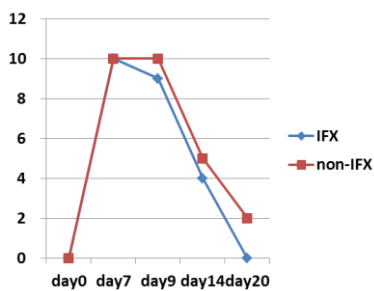
体重減少率の経時的変化は、IFX 群 (n=10) では -6.38g (day7)、-5.80g (day9)、-3.89g (day14)。一方 non-IFX 群 (n=10) では -6.33g (day7)、-7.00g (day9)、-5.67g (day14) であった。



全大腸の長さは IFX 群 (n=10) では 7.7cm (day14)、9.62cm (day21)。一方 non-IFX 群 (n=10) では 7.09cm (day14)、9.52cm (day21) であった。



臨床的スコアは、IFX 群 (n=10) では 9 点 (day9)、4 点 (day14)、0 点 (day21) であり、non-IFX 群より低値であった。



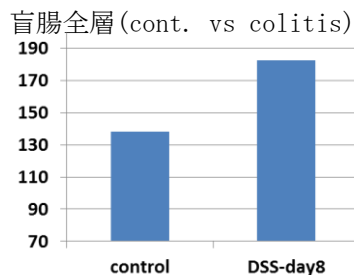
以上より、マウス DSS colitis に対し IFX は臨床的に効果を認めた。

<TPLSM を用いた生体内リアルタイムイメージングによる IFX の組織学的治療効果 >

DSS colitis における陰窩上皮細胞の炎症による傷害とその後の再生に焦点を絞り、形態学的解析を行った。

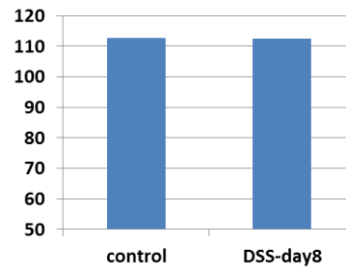
(1) 全層と陰窩の長さ

DSS colitis の極期である day8 では、盲腸壁の全層は 182.5 マイクロメートルで、正常盲腸全層の 138 マイクロメートルより壁肥厚を認めた。



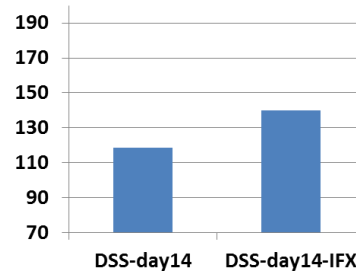
そのうち陰窩の長さは正常では 112.8 マイクロメートル、DSS (day8) では 112.5 マイクロメートルとほぼ同じであることから、粘膜下層以下の炎症による浮腫等による肥厚が推測された。

陰窩長 (cont. vs colitis)

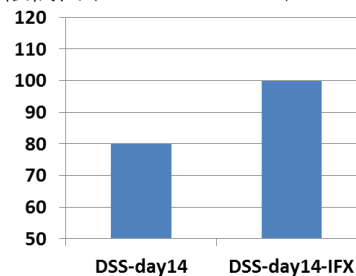


IFX 群 (n=10) では day14 における盲腸壁の全層と陰窩の長さはそれぞれ、140.0、99.8 マイクロメートルで、non-IFX 群 (n=10) の 118.3、80.0 マイクロメートルより長かった。IFX は陰窩の長さすなわち陰窩上皮細胞の再生を促している可能性が示唆された。

盲腸全層 (non-IFX vs IFX)



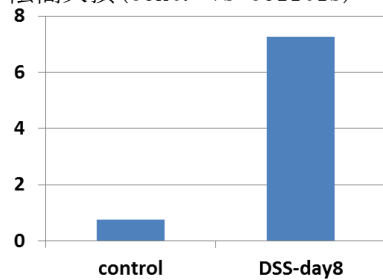
陰窩長 (non-IFX vs IFX)



(2) 陰窩欠損

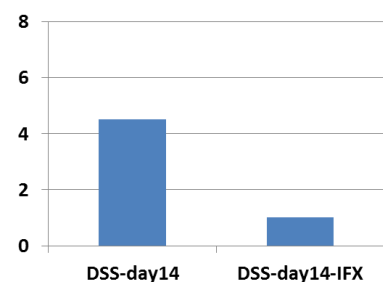
陰窩底部には上皮幹細胞が存在し、粘膜再生に寄与していると考えられている。実際、陰窩の長さは炎症で短縮し、その後徐々に回復する。TPLSM を用いた盲腸の生体内リアルタイムイメージングで陰窩底部から頂部 (管腔側) までの断層像を解析すると、上皮細胞が欠損した陰窩が観察される。水浸 600 倍の 200 × 200 マイクロメートルの視野 (単位面積としての field of view: FOV) で平均 10 の陰窩が観察できる。正常でも平均 0.75 個/FOV の陰窩欠損が観察されるが、DSS colitis (day8) では 7.25 個/FOV となる。

陰窩欠損(cont. vs colitis)



IFX 群(n=10)では day14 における陰窩欠損数は1個/FOVで、non-IFX群(n=10)の4.5個/FOVより少なかった。すなわち、炎症により欠損した陰窩は陰窩底部の上皮幹細胞により再生されたことが推測された。

陰窩欠損(non-IFX vs IFX)

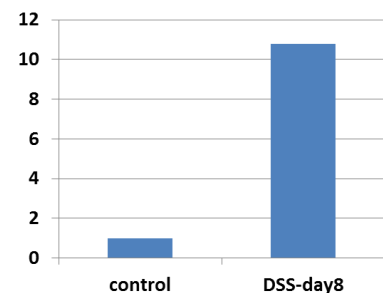


しかしながら、IFX 群における day8-day13 の観察で陰窩底部から頂部向かって再生している陰窩上皮細胞は観察できなかった。すなわち、陰窩欠損かほぼ正常陰窩は観察できたが、底部からの部分的に再生しつつある陰窩(部分的再生陰窩)は見られなかった。

(3) 陰窩内白血球浸潤

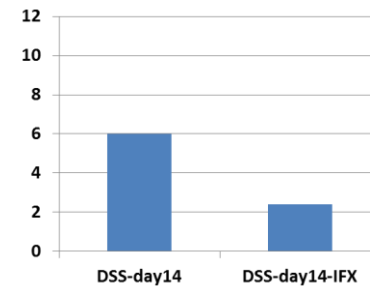
正常でも非特異的炎症反応と思われる陰窩内への白血球浸潤が平均1個/FOV観察されるが、DSS colitis (day8)では10.8個/FOVとなる。

陰窩内白血球浸潤(cont. vs colitis)



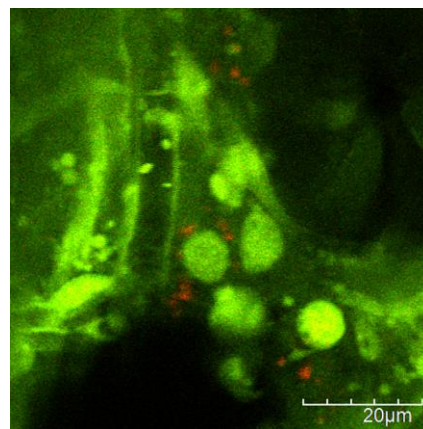
IFX 群(n=10)では day14 における陰窩内白血球浸潤数は2.4個/FOVで、non-IFX群(n=10)の6個/FOVより少なかった。すなわち、IFXは陰窩内に浸潤した白血球の消退を促進していることが推測された。

陰窩内白血球浸潤(non-IFX vs IFX)

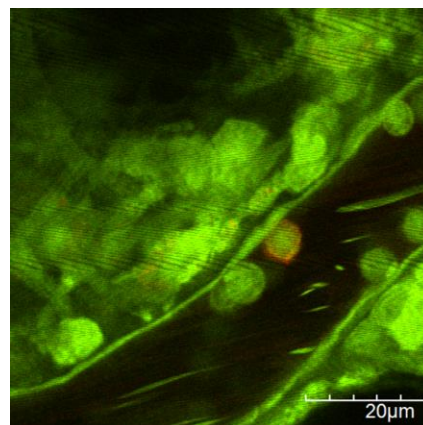


TPLSM を用いた生体内リアルタイムイメージングによる抗 TNF α 抗体の生体内動態
IFX の生体内動態を解析するため、マウス TNF α に対する抗 TNF α 抗体 (Rabbit polyclonal, abcam, MA, USA) を蛍光標識し生体内リアルタイムイメージングした。蛍光標識抗 TNF α 抗体は粘膜固有層、粘膜下層に集積し遊離型 TNF α と結合していると考えられた。また、後毛細管細静脈内皮に接着している白血球表面にも集積するのが観察され、TNF α 産生細胞の膜結合型 TNF α と結合しその産生を阻害していると考えられた。

粘膜固有層に集積



白血球表面に集積



今後、Zenon Alexa Fluor 標識キットによる抗体の標識が生体内でどのくらい持続するのか、また、血管内投与された蛍光標識抗体の組織移行がいつ生じるのかなどを検討し、蛍光標識抗体の生体内可視化の至適条件（投与量、観察時期など）を決める必要がある。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 小池勇樹、田中光司、井出正造、大竹耕平、井上幹大、内田恵一、毛利靖彦、溝口明、楠正人、敗血症モデルマウスにおける消化管微小循環と Neutrophil extracellular traps の経時的観察と検討、第 114 回日本外科学会、2014 年 4 月 4 日、京都国際会館（京都）

- ② Tanaka K, Shimura T, Okigami M, Toiyama Y, Morimoto Y, Kitajima T, Kondo S, Kawamura M, Saigusa S, Okugawa Y, Ohi M, Inoue Y, Uchida K, Araki T, Mohri Y, Mizoguchi A, Kusunoki M、In vivo optical pathology of paclitaxel efficacy on the peritoneal metastatic xenografts of gastric cancer using multiphoton microscopy、2013 年 6 月 1 日、2013 ASCO annual meeting. (シカゴ、米国)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 恵一 (UCHIDA, Keiichi)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30293781

(2) 研究分担者

井上 幹大 (INOUE, Mikihiro)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30422835

溝口 明 (MIZOGUCHI, Akira)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90181916

楠 正人 (KUSUNOKI, Masato)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50192026

(3) 連携研究者

()

研究者番号：