

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592679

研究課題名(和文) IFN γ ・STAT1・PAI-1シグナル抑制による緊急手術後腸管癒着予防法の開発

研究課題名(英文) Development of intestinal adhesions prophylaxis after emergency surgery by IFN gamma - STAT1 -PAI-1 signal suppression

研究代表者

上田 健太郎 (Ueda, Kentaro)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20438279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：我々は癒着形成メカニズムの重要因子であるPAI-1とSTAT1の発現を抑制するPAI-1 siRNA vectorとSOCS1 expression vector(特異的にSTAT1を抑制)を作製し、マウス腸管癒着モデルでの癒着予防効果を検討した。

A: Control群、B: SOCS1群、C: PAI-1 siRNA群、D: SOCS1+PAI-1 siRNA群、F: HGF(positive control)群を設定した。癒着の程度と組織像はA, B, Cの3群に差は無かったが、D群で優位に癒着は改善しておりF群と同等の結果であった。全ての群で骨髄、肝臓、腎臓への副作用を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We constructed SOCS1 expression vector to suppress STAT1 specifically and PAI-1 siRNA vector, and examined the prevention effect of adhesion in mouse intestinal adhesion model using these vectors.

We had set the 5 group: A: Control group, B: SOCS1 group, C: PAI-1 siRNA group, D: SOCS1 + PAI-1 siRNA group, F: HGF(positive control). The results were equivalent to that of the F group was no difference in the three groups A, B, and C histology with the degree of adhesion, but adhesion is improved edge in the D group and E group. We found no side effects of bone marrow, liver, to the kidney in all groups.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：マウス腸管癒着モデル siPAI-1 HVJ vector SOCS1 HVJ vector

1. 研究開始当初の背景

消化器外科手術の実に 60%以上に術後腸管癒着が発生し、腸管-腸管、腸管-腹膜などの癒着形成は再手術が困難になるばかりではなく、腸閉塞、腹痛、不妊症などの合併症を高頻度に引き起こす。その頻度は**外傷・急性腹症に対する腹部緊急手術**でさらに高く、救命できた患者の QOL 低下を招く結果となり、臨床的に大きな問題となっている。しかし、現時点で腸管癒着に対する明確な予防法はまだ確立されていない。今回、我々は腸管癒着の発生機序の中で重要因子である STAT1 と PAI-1 の発現を抑制し、腸管癒着を予防することに着眼した。HGF タンパク質は IFN- γ の産生を抑制することから腸管癒着の予防効果を有する結果となった。しかし、IFN- γ は Th1 への分化、マクロファージ活性化、MHC 分子の発現増強、NK 活性化作用、抗腫瘍作用など様々な免疫反応に携わっており、侵襲度の高い術後に IFN- γ の機能を極度に低下させることは、術後患者の全身状態の改善に悪影響が及び、合併症を誘発してしまう可能性が示唆される。よって、本研究では腸管癒着形成のメカニズムで IFN- γ より下流にある STAT1 と PAI-1 を標的とする。

2. 研究の目的

今回、我々は癒着形成メカニズムの重要因子である PAI-1 と STAT1 の発現を抑制する PAI-1 siRNA vector と SOCS1 expression vector (特異的に STAT1 を抑制) を作製しこれらを用いて、マウス腸管癒着モデルで予防効果と安全性を詳細に検討する。

腹部外科手術に伴う術後腸管癒着は様々な合併症を高頻度で引き起こし、臨床の現場で大きな問題となっているが、最近までその分子生物学的なメカニズムの解析と癒着を制御する予防薬に関する研究は皆無であった。その理由としてヒトの消化器外科

手術に伴う腸管癒着と同等なモデルマウスが確立されていなかったことが考えられる。2008 年にマウス盲腸をバイポーラ凝固鉗子で 1 秒間焼灼することで 1 週間後に強度の腸管癒着を形成するマウスモデルが確立された (Nat Med, 14: 437, 2008)。

今回我々は、まだこの他に報告のないこのモデルを作製して、腸管癒着の発生機序の中で重要因子である STAT1 と PAI-1 の発現を抑制することによる腸管癒着の予防効果を検討する。現在まで腸管癒着形成メカニズムの重要因子をターゲットとした予防法の研究は、IFN- γ の産生を抑制する HGF タンパク質投与の有用性が示唆されたのみである。以上より、本研究は新規性・独創性に非常に高いと考える。

また、マウスモデルへの PAI-1 siRNA と SOCS1 遺伝子の導入は HVJ Envelope vector を用いてモデル作製終了時の閉腹の際、腹腔内投与で行う。この vector は非ウイルス vector で炎症を誘起する危険性もなく副作用もほとんどないことが確認されており、高効率に著明な特異的目的蛋白発現をコントロールすることが可能である (J Immunol, 170: 3653, 2003, EMBO Journal, 23: 4413, 2004)。以上より、本研究により術後腸管癒着に対する劇的な予防効果が予想され、長年に渡り救急外科医の難問であったこの病態を解決に導く可能性が高いと考える。

3. 研究の方法

PAI-1 に対する 5 種類の siPAI-1 を合成し、そのノックダウン高率の検定を行うことで最適な ssiRNA を決定した。本研究では、HVJ Envelope vector Kit を用いて、この siRNA を transfection することで siPAI-1 HVJ Envelope vector を作製した。続いて SOCS1 expression HVJ Envelope vector を作製した。作製したそれぞれの vector をマウス正常腸管細胞株に transfection し、SOCS1 の増強・STAT1 の低下・

PAI-1 の低下をリアルタイム PCR 法並びに Western blot 法で行うことで In vitro における作製 vector の発現効率は、動物実験に使用できるレベルであることを確認した。術後腸管癒着形成モデルは BALB/c マウスを用いて以下のプロトコルで行う。Pentobarbital (20%) による麻醉下で、右下腹部正中切開にて開腹を行う。ヒトの手術用バイポーラ凝固鉗子を用いて盲腸を 1 秒間焼灼し (MERA; 30W, 500kHz, 150Ω)、閉腹する。7 日後再開腹し、癒着の程度を評価する。

4. 研究成果

BALB/c マウスを用いて術後腸管癒着形成モデルを作製した。A: Control 群、B: SOCS1 群、C: PAI-1 siRNA 群、D: SOCS1+PAI-1 siRNA 群、F: HGF (positive control)群の 5 群 (各群: n=7) を設定し、閉腹時に A 群は PBS i.p., B 群は SOCS1 expression HVJ Envelop vector i.p., C 群は PAI-1 siRNA HVJ Envelope vector i.p., D 群は SOCS1 expression HVJ Envelop vector + PAI-1 siRNA HVJ Envelope vector i.p., F 群は HGF タンパク質 i.s.を施行する。

その後、独立した実験系で 7 日後に、以下の項目を検討した。

1) 癒着の程度と組織像の検討

屠殺後、腹腔内を観察し癒着の程度を score 化しその後、焼灼部位を中心とした癒着腸管を取り出し、病理切片を作成した。HE 染色、シリウスレッド染色で病理学的に癒着の強度を評価した結果、A, B, C の 3 群に差は無かったが、D 群で優位に癒着は改善しており F 群と同等の結果であった。

2) PAI-1, STAT1, SOCS1, IFN- γ の相対的 mRNA レベルと発現蛋白レベルの検討

取り出した腸管から AI-1, STAT1, SOCS1, IFN- γ の mRNA を RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN)で抽出し、SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen)を用

いて cDNA 化して TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)を用いたリアルタイム PCR 法で相対的 mRNA 発現量を測定した。また、AI-1, STAT1, SOCS1 の発現タンパク量を測定するため、それぞれの抗体と VECTASTAIN Elite ABC KIT (Vector Laboratories Inc.) を用いて免疫組織染色で評価した結果、D 群で、AI-1, STAT1 の発現が著明に抑制されていた一方、他群と比較して SOCS1 は強発現していた。

3) Vector 投与による全身状態への影響の検討

マウス尾静脈から採血し、骨髄機能や肝腎機能における副作用のレベルを各群間で検討した。全ての群で差はなく安全性が証明された。

今後、術後腸管癒着形成モデルを用いた SOCS1 expression HVJ vector・PAI-1 siRNA HVJ vector と HGF タンパク質投与における併用効果を検討した上で、論文投稿する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 0 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

上田 健太郎 (UEDA, Kentaro)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20438279

(2) 研究分担者

木田 真紀 (KIDA, Maki)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：00326381

研究分担者

米満 尚史 (YONEMITSU, Takafumi)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80382331

(3) 連携研究者

()

研究者番号：