

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659190
 研究課題名（和文） ビタミンA欠乏－粘膜星細胞機能障害を介した大腸炎発症と増悪：
 モデル実験による証明
 研究課題名（英文） Acceleration of colitis in vitamin A deficiency: Demonstration
 by experimental mouse model
 研究代表者
 岡安 勲 (OKAYASU ISAO)
 北里大学・医学部・名誉教授
 研究者番号：20014342

研究成果の概要（和文）：発展途上国においては栄養不足に伴う Vitamin A (Vit A) 欠乏－下痢－大腸炎による小児死亡例が多く、その発症機序を解明するべく、Vit A (-), (+) マウス 2 群を作成して DSS 大腸炎を誘導し、比較した。その結果、Vit A(-)マウスでは Vit A(+)マウスと比較して強い大腸炎を示した。cDNA microarray 解析では、複数の遺伝子が DSS 大腸炎増悪と関連性がある可能性を認めた。従って、低栄養の小児に発症する慢性下痢には Vit A 補充療法が有効であると示唆される。

研究成果の概要（英文）：To see the influence of vitamin A deficiency on colitis, Dextran sulfate sodium-colitis was induced in vitamin A deficient and vitamin A-supplemented mice. Colitis was significantly severer in vitamin A deficient mice than vitamin A-supplemented mice. cDNA microarray analysis showed different gene expression between two groups, suggesting some relation to acceleration of colitis. Thus, it is demonstrated that vitamin A supplement might improve chronic diarrhea or colitis in low nutrient infants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ビタミンA欠乏、大腸炎、下痢、大腸粘膜、上皮筋線維芽細胞、潰瘍性大腸炎モデル、デキストラン硫酸

1. 研究開始当初の背景

発展途上国では低栄養による慢性下痢－大腸炎による小児死亡例が多いことが、疫学的に示されているが、その理由は明らかでない。この理由を明らかにして、適切な治療法の開発が待たれる。そこで我々は低栄養では、ビタミンA不足が生じやすいことに着目した。

2. 研究の目的

低栄養に伴うビタミンA不足によって慢性下痢、大腸炎の増悪が生じると推定し、これを実験的に証明する。肝臓ではビタミンA貯蔵細胞は伊東細胞（星細胞）であるが、大腸粘膜の腸上皮細胞下筋線維芽細胞がビタミンA脂肪を持ち、 α -smooth muscle actin を発現していることを我々は最近みとめた。そして、これが大腸粘膜の伊東細胞（星細胞）

に相当し、粘膜陰窩基部に存在する粘膜幹細胞を保護するニッチ機能を保持していることを提唱してきた。従って、ビタミンA欠乏によって、この大腸粘膜下筋線維芽細胞の機能不全が生じ、このために、粘膜上皮細胞の粘膜バリアー機能が低下すると考えられる。そこでビタミンA欠乏状態のマウス、ビタミンA補充状態のマウスを作成して、実験的に大腸炎を誘導して、その大腸炎の発症の違いを示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの調整と実験計画

ビタミンAを含まない飼料とこれにビタミンAを補充した飼料を作成し、それぞれで飼育したマウスを交雑し、生まれたマウスをさらにビタミンA欠乏飼料とビタミンA補充飼料で飼育したマウスを作成した。

この2群（ビタミンA欠乏、ビタミンA補充マウス）に1%デキストラン硫酸（DSS）溶液を自由に給水できる状態で飲用させて、大腸炎を誘導した。対照にはDSSの替りに蒸留水を7日間給水した。

実験終了時に、大腸の長さを測定したのちに、大腸、肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節を採取し、10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋、薄切して、HE染色組織標本を作製した。大腸炎は我々が以前に開発した方法で評価した。

(2) 免疫染色

ホルマリン固定パラフィン切片に、一次抗体として、抗 α -smooth muscle actin, IgG, IgM, IgA抗体を使用し、二次抗体以下はNichirei Mouse Immunostaining kitを使い、指定通り行った。抗CD11c抗体には2%パラフォルム固定・凍結切片を作成して、使用した。

(3) 電子顕微鏡検査

大腸壁を2.5% glutaraldehyde溶液で固定後、2% osmic acidで再固定した。さらに脱水後エポン包埋して、超薄切片を作成して、電子顕微鏡による観察を行った。

(4) cDNA microarray 解析

左側大腸壁を未固定のまま採取し、RNAlater 中にて細切して4度C保存後、RNAを抽出し、cDNAを作成後、網羅的にRNA発現を評価した。

4. 研究成果

ビタミンA欠乏マウスは補充マウスと比較して、大腸の長さ、病理組織学的大腸炎スコアとも有意に大腸炎が増悪した。

背景として、ビタミンA欠乏マウスの大腸粘膜では、電子顕微鏡的観察によって、脂肪滴を持った大腸粘膜上皮筋線維芽細胞のある陰窩が、ビタミンA補充マウスと比較して有意に減少していた。

また、ビタミンA欠乏マウスの大腸粘膜固有層では、ビタミンA補充マウスと比較して、免疫染色にて、IgA陽性細胞が減少し、IgG陽性細胞が増加していた。

ビタミンA欠乏マウスの大腸粘膜固有層におけるCD11c陽性樹状細胞は、ビタミンA補充マウスと比較して有意に増加していた。

さらにビタミンA欠乏マウスの大腸粘膜における陰窩あたりの α -smooth muscle actin陽性上皮筋線維芽細胞の数が、ビタミンA補充マウスと比較して、有意に減少していた。

これらの所見から、ビタミンA欠乏マウスでは、大腸粘膜陰窩を保護する上皮筋線維芽細胞の機能障害が示唆される。また、IgAを中心とした大腸粘膜バリアー機能低下の可能性があげられ、これらはビタミンA欠乏によって生じていることが推測される。

cDNA microarrayによる比較では、RNA発現に差がある遺伝子が複数みとめられ、大腸炎発症に関与する可能性が示唆された。この結果が前述の組織学的所見とどのように関連しているかは今後の検索によって明らかにすべきである。

以上まとめると、低栄養児における慢性下痢、大腸炎にはビタミンA補充療法が有効であることが示唆される。

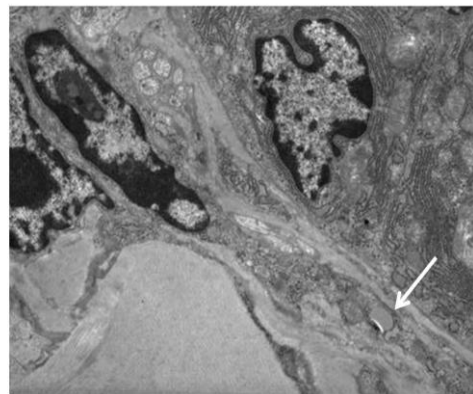


図1 ビタミンA脂肪滴保持上皮筋線維芽細胞

上皮筋線維芽細胞の細胞質内に小さな脂肪滴（矢印）をみとめる。右上は大腸粘膜上皮細胞（ビタミンA補充マウス）（電子顕微鏡像）

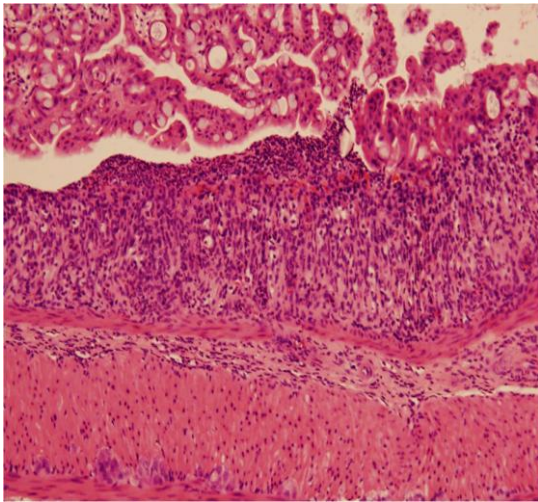


図2 DSS大腸炎による潰瘍、炎症性病変
DSS溶液の自由飲用で誘導したマウス大腸炎・潰瘍。
大腸粘膜に好中球を含む炎症細胞浸潤がつよく、左側ではびらんが生じている。

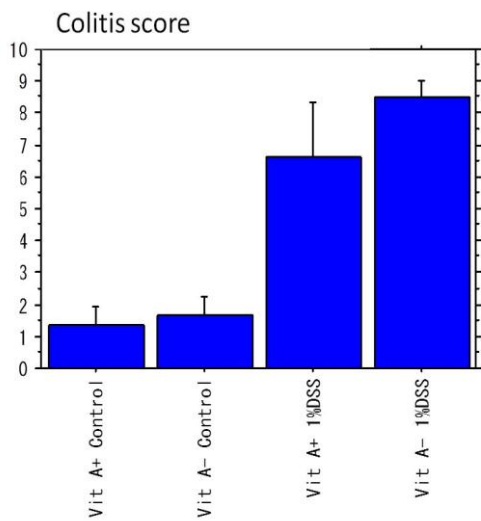


図3 ビタミンA欠乏(Vit A-)、ビタミンA補充(Vit A+)マウス各群におけるDSS大腸炎の比較
蒸留水(Control)、1%DSS溶液飲用後に誘導された大腸炎を病理組織学的にスコア化した。左側大腸、横行結腸、右側大腸それぞれの大腸炎スコアの総和を示した。Vit A+ 1%DSSとVit A- 1%DSS群間で有意な差をみとめた。

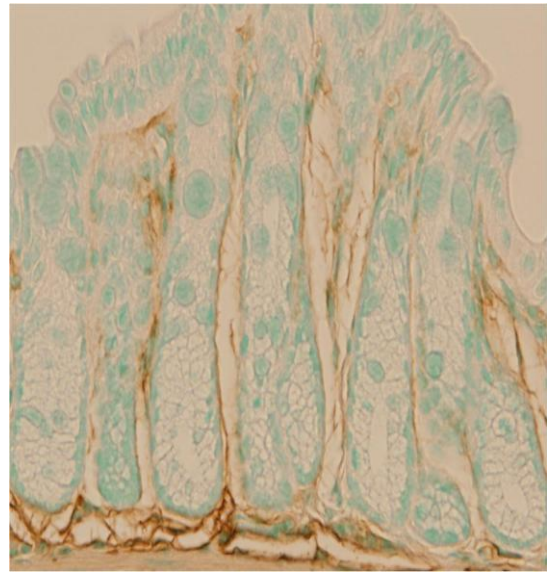


図4 α -smooth muscle actin 陽性上皮下筋線維芽細胞(免疫染色)
ホルマリン固定・パラフィン包埋切片に抗 α -smooth muscle actin抗体を反応させた免疫染色。大腸粘膜陰窩上皮筋線維芽細胞が陽性である(ビタミンA補充マウス)

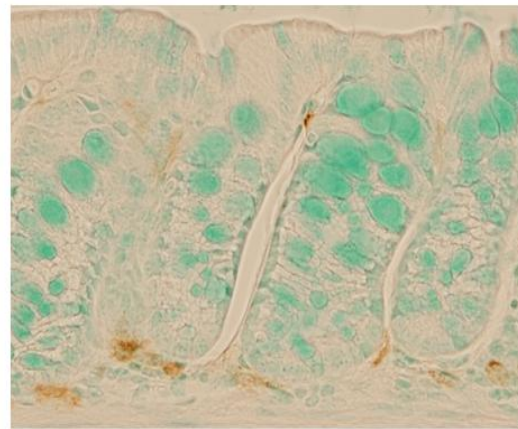


図5 CD11c+ dendritic cells (免疫染色)
2%パラフォルム固定・凍結切片に抗CD11c抗体を反応させた免疫染色。陰窩底部の間質にCD11c+陽性細胞がみとめられる(ビタミンA補充マウス)。

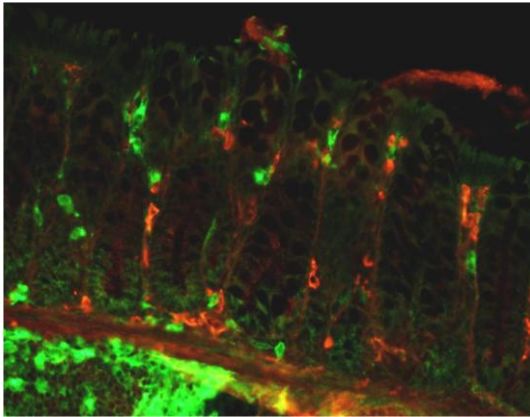


図6 CD11c (green), α smooth muscle actin (red) 二重免疫蛍光顕微鏡像

CD11c 陽性樹状細胞及び α -smooth muscle actin 陽性上皮下筋線維芽細胞の局在が明瞭にみとめられる (ビタミンA補充マウス)。

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)

[学会発表] (計1件)

岡安 勲 潰瘍性大腸炎の発症・持続とその大腸発癌・進展機序—慢性臓器炎—発癌系のモデルとして—

第100回日本病理学会総会 2011年4月28日
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡安 勲 (Isao Okayasu)
北里大学・医学部・名誉教授
研究者番号：20014342

(2) 研究分担者

なし