

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791891

研究課題名(和文)短腸症候群：新しい腸管再生を目指して レニン-アンギオテンシン系の役割

研究課題名(英文)Small bowel resection : Role of renin-angiotensin system

研究代表者

古賀 寛之 (Koga, Hiroyuki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30468574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：短腸症候群における腸管再生(adaptation)作用機序についてレニン-アンギオテンシン系について評価した。術後腸管再生の際にアンギオテンシンII type1a受容体が増強しており、アンギオテンシンII type 1a受容体拮抗薬を投与することによりAdaptationにおける腸管上皮細胞のapoptosis/proliferationが抑制された。短腸症候群における腸管再生にアンギオテンシンII type1a受容体が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to further examine the downstream signaling factors in this system by blocking the action of angiotensin II (ATII), hypothesizing that this would lead to similar improvement of intestinal adaptation after SBR. . Because realtime PCR studies showed that only ATII receptor type 1a (ATII-1a) expression was significantly increased after SBR, compared to Sham mice. The apoptotic and proliferation signaling pathways were addressed by analysis of EC. SBR led to a significant increase in villus height and crypt depth. ATII treatment did not significantly change EC proliferation, but did significantly reduce EC apoptosis rates as compared to the nontreated SBR group. This study showed that the ATII-1a receptor may be of crucial importance for the modulation of intestinal EC apoptosis, and for regulating the post-resectional EC adaptive response.

研究分野：外科

キーワード：短腸症候群 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

小児外科領域において、壊死性腸炎や中腸軸捻転等の基礎疾患により、または成人外科領域においては悪性腫瘍や外傷により小腸大量切除を余儀なくされた場合、残存小腸の吸収機能が生命の維持及び発育に対して不十分であると短腸症候群を来す。現在、短腸症候群に対して主な治療法として経静脈栄養(TPN)・外科治療による腸管延長術・小腸移植などが行われており、最近になり腸管延長術・小腸移植の有効例が報告されつつあるが、困難を伴う手術手技・過大侵襲を伴う手術・術後管理などの問題を抱えており、これらの治療法は決して満足のできる結果には至っていない。現在臨床の場において TPN により重度の腸管機能不全の小児でも長期生存・成長が得られるようになり、短腸症候群に対する治療の第一選択になっている。しかしながら、消化不良、栄養障害や長期中心静脈栄養管理に起因する肝不全・カテーテル感染による敗血症といった合併症、入退院の繰り返しによる quality of life の低下等の多くの深刻な問題を抱えており、残存腸管の機能を最大限に活用できる低侵襲な新しい治療法の確立が切望されている。

短腸症候群では腸管切除後の残存腸管に吸収面積・吸収機能の増大といった *adaptation* が起こり、この変化は残存小腸の長さに依存していることが知られている。残存小腸の *adaptation* は腸管上皮細胞に生じるアポトーシスによる細胞の消失と分化増殖のバランスのもとに起こることは知られているが、そのメカニズムについては未だに不明な点が多く、詳細について解明はされていない。

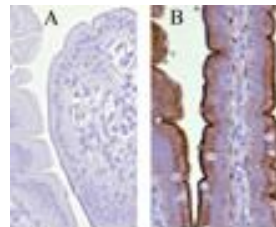
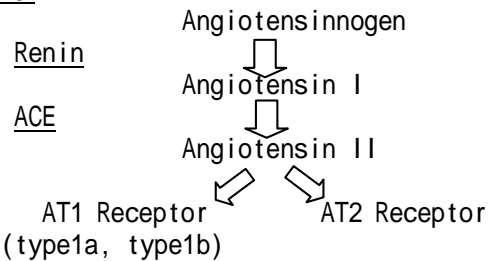
レニン-アンギオテンシン(RA)系は血圧の調整機構として腎組織に存在している事が知られている。RA系は肺胞上皮や心筋組織にも局在し、肺胞上皮、心筋細胞のアポトーシスに関与していることが報告されている。以前我々は腸管内にもRA系が局在することに着目し、RA系の一つであるアンギオテンシンが腸管上皮の再生機序に関与している事を示した。即ち、アンギオテンシン変換酵素(ACE)knockout マウスにおいて腸管上皮のアポトーシスは野生種と比し有意的に減少した。また、腸炎モデルにおいてアンギオテンシン変換酵素阻害剤を経肛門的に投与し、腸管に局在するRAをブロックすることにより、腸炎のアポトーシスが抑制され、腸管炎症重症度も軽快改善し上皮が温存されることを示した。

我々は以前腸管免疫および再生医療の分野において腸管上皮細胞の分化増殖

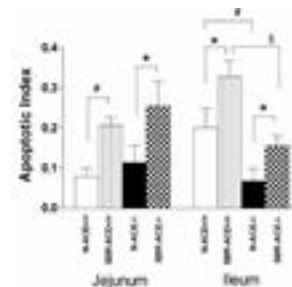
に各種 growth factor を投与することにより残存小腸の吸収能を増加させ *adaptation* を得ることを報告したが、growth factor を臨床で用いるにあたり、悪性化の可能性や全身に及ぼす影響などの副作用について、解決しなければならない問題点も多く、未だに実用するには至っていない。

そこで上記結果より、RA系は腸管におけるアポトーシスに關与する因子の一つと考え、短腸症候群において生じる腸管アポトーシスはRA系によってコントロールされ、この作用機序を解明することにより残存腸管の *adaptation* をより適切に誘導できると仮定した。短腸症候群モデルマウスを作成し、RA系の一つであるアンギオテンシン II 受容体拮抗薬を投与することにより腸管上皮 *adaptation* の変化を比較検討し、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬が短腸症候群に対して新しい治療法となり得るか検討する。

RA系



ACE免疫染色腸管 A:ACE ノックアウトマウス B:野生種 腸管上皮にACEが豊富に局在している。



Apoptosis INDEX:空腸/回腸ともにSBSではApoptosisが正常腸管(N)と比し、優位的に増加する。しかしACE ノックアウトマスではSBS,NともにApoptosisが減少する

2. 研究の目的

短腸症候群における腸管再生(adaptation)について腸管内のレニン-アンジオテンシン系について着目し作用機序を解明する。さらに、レニン-アンジオテンシン系を阻害することにより適切な腸管 adaptation が得られるか否か検討し、新しい治療法の確立を目的とする。

短腸症候群の adaptation に関して多くの研究が行なわれているが、腸管に局在する RA 系に着目しその作用機序を詳細に評価するという試みは行われておらず、この研究の特色のひとつである。しかも既存治療薬として安全性が確立しているアンジオテンシン II 受容体阻害剤投与により、アンジオテンシン II 受容体阻害剤投与が本疾患に対して全く新しい療法になり得るか否の可能性についても検討する。短腸症候群の adaptation 解明は患児・患者各々に適した治療法の確立には必要不可欠な要素である。既存の RA 系製剤使用により残存腸管 adaptation が促されることは、現在多くの問題を抱えている短腸症候群にとって光明を見出す大きな意味を持つものと考ええる。さらには副作用のない既存薬剤を使用することにより腸管再生を促すことは再生医療分野にも応用し得るものと考ええる。これは現在問題となっている消化不良、栄養障害、長期中心静脈栄養に起因する様々な合併症を防ぐ新しい治療法の確立の為に臨床応用可能と考える。

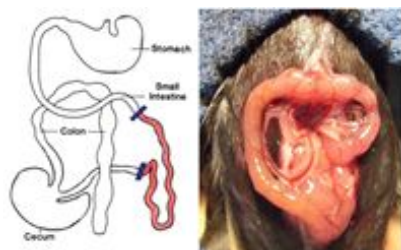
この adaptation の解明が短腸症候群の患児ひとりひとりに適した新しい治療法の確立のためには必要不可欠な要素であると考える。

3. 研究の方法

マウスを用いて短腸症候群モデルを作成し、術後 1 週間後に犠死させた後に組織検体摘出を行う。

短腸症候群モデル

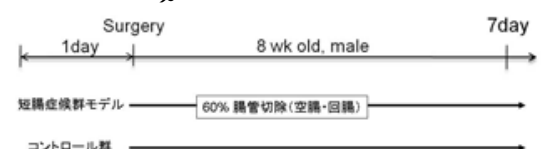
腹腔内投与による麻酔後、8-0 モノクリルを用いて腸管切除・再吻合を施行。術終了後、脱水補正目的に生理食塩水 3ml 皮下投与し、当日より自由飲水とする。



短腸症候群モデルマウスを作成し作成術後の閉塞障害を予防する目的に手術前日より Liquid food を与え、術後も引き続き Liquid food とする。

短腸症候群の 2 群を作成し、術後 1 週後に組織片を摘出し、RNA・タンパク質を採取する。

1. 短腸症候(SBS)群: Treiz 靭帯より 6cm、回盲部より 6cm 部位で腸管を切除し、再吻合する(60%腸管切除モデル)。
2. コントロール群: Treiz 靭帯より 12cm 部位で腸管を切除し、再吻合する(Sham モデル)。



術後 1 週間後の検体について下記項目を各々評価することにより、短腸症候群における残存腸管の adaptation 変化について評価・検討する。

HE 染色で腸管の形態学的変化を評価 (crypt depth / villus height)
TUNEL 染色でのアポトーシスの評価
Brd-U 染色での細胞増殖 (cell proliferation) の評価
RT-PCR で mRNA レベルでのアポトーシス経路・cell proliferation 経路の評価

上記 SBS 群・コントロール群におけるアンジオテンシン II 受容体 (Ia 型、Ib 型、II 型) の expression について術後 1 週間の mRNA 値を評価する。

3. SBS + ATII 投与群: 上記 SBS 群に連日 ATII 拮抗薬を投与する。(10mg/day)
4. コントロール群 + ATII: 上記コントロール群に同様に連日 ATII 拮抗薬を投与する。

HE 染色で腸管の形態学的変化を評価 (crypt depth / villus height)
TUNEL 染色でのアポトーシスの評価
Brd-U 染色での細胞増殖 (cell proliferation) の評価
RT-PCR で mRNA レベルでのアポトーシス経路・cell proliferation 経路の評価

検体

マウス犠死後、小腸検体 0.5 cm を 10% フォルマリンに保存する。トライツ靭帯より 2 cm 部位から回盲部より 2 cm 部までの小腸検体を採取し腸管上皮細胞の分離を行う。

病理評価

吻合部より 2 cm 離れた部位の小腸検体を 0.5 cm 程度採取し 10% フォルマリンに保存し Hematoxylin/Eosin 染色を行う。HE 染色検体から crypt depth / villus height を計測する。

腸管上皮細胞アポトーシス

Tunel 染色法を用いて腸管上皮細胞に生じているアポトーシスを評価する。Tunel キット (Apoptosis Detection Kit, Chemicon International, Temecula, CA) を用いて病理検体に染色を行い、Crypts および Villi における細胞数あたりに対する Tunel 染色陽性細胞をカウントし、Apoptosis INDEX とした。

腸管上皮細胞増殖 (cell proliferation)

腸管 Crypts における細胞分化を BrdU を用いて評価した。犠死する 1 時間前に BrdU (Roche Diagnostic, IN) を 1 ml 腹腔内投与を行い、BrdU キット (BD PharMingen, CA) を用いて病理検体に染色を行った。Crypts における細胞数あたりに対する BrdU 染色陽性細胞をカウントし、proliferation rate とした。

腸管上皮細胞分離

小腸腸管を摘出したのち Culture media buffer にて検体を保護する。腸間膜、脂肪、Payer 板を除去した後に腸管を開放し内容物も除去する。PBS buffer にて洗浄した後に 5 mm 片に細断して 37 °C で 30 分間攪拌する。攪拌後、glass wool filter で不純物を除去し遠心部分離を行う。底部の Pellets を 40% Percoll で洗浄を行う。

Real Time PCR

Ct 法を用いて RNA を抽出した後に RealtimePCR を用いて DNA 量を測定した。それら値は b-action を用いて標準化を行った。

腸間膜血流の測定

ATII 拮抗薬の副作用を評価するために Laser Doppler image をもちいて腸間膜血流を評価した。

統計処理

数値表記 mean ± standard deviation とし、t 検定および one-way analysis of variance (ANOVA)、X² 検定を用いて統計処理を行ない、P < 0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

短腸症候群モデル術後の体重変化

短腸症候群モデル群およびコントロール群の体重計測を連日行った。両群ともに術後

3 日目より体重減少をみとめ、短腸症候群モデルではコントロール群と比較して体重減少に有意差を認めた。

短腸症候群モデル群： -20.2% ± 3.2%

コントロール群： -10.0% ± 1.2%*

(* P < 0.001: 術当日体重に対するパーセント比で表示)

腸管上皮の形態学的変化

短腸症候群モデル群およびコントロール群の術後腸管形態評価 (crypt depth / villus height) を行った。crypt depth / villus height とともに短腸症候群モデルでコントロール群と比較して有意差を認めた。

villus height

短腸症候群モデル群： 325 ± 11 μm

コントロール群： 210 ± 21* μm

crypt depth

短腸症候群モデル群： 152 ± 8 μm

コントロール群： 102 ± 5* μm

(* P < 0.05)

腸管上皮細胞アポトーシス

腸管上皮細胞の Apoptosis INDEX は、短腸症候群モデル群はコントロール群よりも有意に高値であった。

Apoptosis INDEX

短腸症候群モデル群： 0.12 ± 0.03

コントロール群： 0.04 ± 0.02*

(* P < 0.05)

腸管上皮細胞増殖 cell proliferation

腸管上皮細胞の proliferation rate は、短腸症候群モデル群はコントロール群よりも有意に高値であった。

proliferation rate

短腸症候群モデル群： 35.0 ± 1.8

コントロール群： 18.1 ± 2.1*

(* P < 0.05)

我々の短腸症候群モデルマウスの残存腸管上皮細胞はコントロール群 (Sham 手術) と比して僅か 1 週で adaptation が生じており、その反応は Apoptosis および proliferation の亢進が認められた。

次に短腸症候群モデルマウスの腸管上皮におけるアンジオテンシン II 受容体について RT-PCR にて評価を行った。

アンジオテンシン II 受容体

Angiotensin II type 1a の出現量がコントロール群よりも有意に短腸症候群モデル群では高値を示した。そのほかのレセプター (type 1b, type 2) では有意差は認められなかった。

Angiotensin II type 1a

短腸症候群モデル群： 8.0 ± 1.2

コントロール群： 1.1 ± 0.4*

(* P < 0.05)

Angiotensin II type 1a 受容体が高値を

示したことより、Angiotensin II type 1a 受容体が腸管上皮に多く含まれていることが示唆された。そこでこの Angiotensin II type 1a 受容体が腸管上皮のアポトーシスに参与している否かの評価を Angiotensin II type 1a 受容体拮抗薬（以下 ATII-1a）を用いて行った。即ち短腸症候群モデル作成後、Angiotensin II type 1a 受容体拮抗薬を 10mg/kg 連日腹腔内投与を行った。

ATII-1a 投与後、短腸症候群モデル術後の体重変化

ATII-1a を連日投与することにより短腸症候群モデル群の体重減少に有意差を認めるようになった。

短腸症候群モデル群： $-20.2\% \pm 3.2\%$

短腸 + ATII-1a 群： $-7.5\% \pm 1.1\%^*$

(* $P < 0.001$: 術当日体重に対するパーセント比で表示)

しかも、ATII-1a 投与コントロール群の体重減少とコントロール群との間に有意差は認められなかった。

コントロール群： $-10.0\% \pm 1.2\%$

コン + ATII-1a 群： $-8.2\% \pm 2.2\%$

ATII-1a 投与後、腸管上皮の形態学的変化

ATII-1a 投与後の短腸症候群モデル群およびコントロール群の術後腸管形態評価 (crypt depth / villus height) を行った。crypt depth / villus height とともに短腸症候群 + ATII-1a 投与群でコントロール + ATII-1a 群と比較して有意差を認めた。

villus height

短腸 + ATII-1a 群： $335 \pm 21 \mu\text{m}$

コン + ATII-1a 群： $222 \pm 22^* \mu\text{m}$

crypt depth

短腸 + ATII-1a 群： $154 \pm 7 \mu\text{m}$

コン + ATII-1a 群： $113 \pm 5^* \mu\text{m}$

(* $P < 0.05$)

ATII-1a 投与後、腸管上皮細胞アポトーシス

ATII-1a 投与後の腸管上皮細胞の Apoptosis INDEX は、短腸症候群 + ATII-1a 投与群はコントロール + ATII-1a 群よりも有意に高値であった。しかし、興味深いことに短腸症候群と比較すると Apoptosis INDEX は低値であった。

Apoptosis INDEX

短腸 + ATII-1a 群： $0.03 \pm 0.03^*$

コン + ATII-1a 群： 0.01 ± 0.02

(* $P < 0.05$)

ATII-1a 投与後、腸管上皮細胞増殖 cell proliferation

腸管上皮細胞の proliferation rate は、短腸症候群 + ATII-1a 投与群はコントロール + ATII-1a 投与群よりも有意に高値であった。

proliferation rate

短腸症候群モデル群： 38.0 ± 1.3

コントロール群： $20.1 \pm 3.1^*$

(* $P < 0.05$)

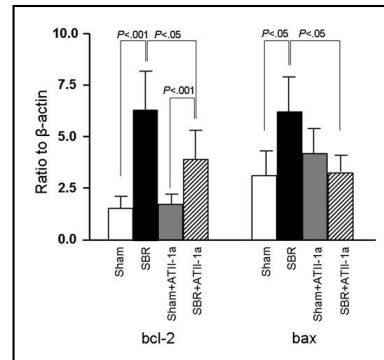
次に Apoptosis 反応のカスケードを内因性シグナル (bcl2、bax) および外因性シグナル (TNF- α 、TNF-rceptor1、FAS、FAS-ligand) に対して ATII-1a 投与が参与しているかについて RT-PCR にて評価を行った。

内因性シグナル (bcl2、bax)

短腸症候群の bcl2 シグナルはコントロール群と比較して有意に上昇していた。これは短腸症候群 + ATII-1a 投与とコントロール + ATII-1a 投与の間でも同様の傾向が認められた。しかし、短腸症候群 + ATII-1a 投与群は短腸症候群と比較して bcl2 シグナルの出現は抑えられた。

bax シグナルはコントロール群と比較して有意に上昇していた。しかし、短腸症候群 + ATII-1a 投与とコントロール + ATII-1a 投与の間では有意差は認められなかった。

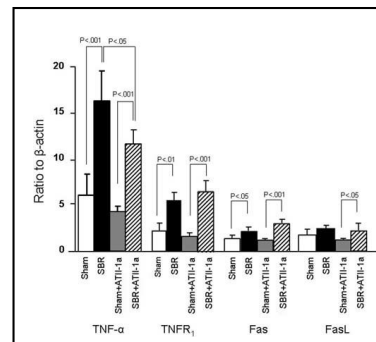
短腸症候群 + ATII-1a 投与群は短腸症候群と比較して bax シグナルの出現は抑えられた。



外因性シグナル (TNF- α , TNF-rceptor1, FAS, FAS-ligand)

これらすべてのシグナルにおいて短腸症候群はコントロール群と比較してシグナル発現が上昇していた。これらの所見は短腸症候群 + ATII-1a 投与とコントロール + ATII-1a 投与の間でも認められた。

TNF- α でのみ短腸症候群 + ATII-1a 投与と短腸症候群の間に有意差を認めた。

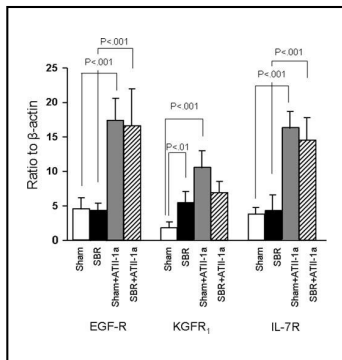


ATII-1a の作用機序

ATII-1a が腸管上皮細胞における Apoptosis と proliferation に対してどのように作用しているかを評価するために KGFR, IL7-R, EGF-R シグナルを RT-PCR にて

評価した。

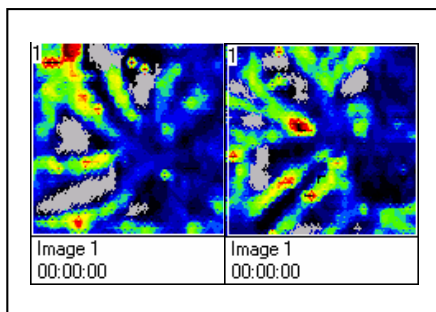
これらすべてのシグナルにおいて ATII-1a 投与することにより短腸症候群・コントロール群の両群で非投与と比較してシグナル



発現が上昇していた。しかしながら短腸症候群 +ATII-1a 投与群ではコントロール +ATII-1a 投与群との間に有意差は認められなかった。

ATII-1a の副作用 (血流低下)

ATII-1a の副作用を評価するために Native 群と Native +ATII-1a 群 (n=5 各群) の腸間膜の血流を計測した。ATII-1a 投与により、腸間膜血流低下を若干認めるが、有意差は認められなかった (2.7 ± 0.3 vs 2.5



\pm
0.3
unit
)

Native Native +ATII-1a 群

まとめ

本研究により短腸症候群における術後 adaptation には RA 系のアンジオテンシン II 受容体 type 1 a 関与している可能性が示唆された。アンジオテンシン II 受容体 type 1 a が腸管上皮粘膜における apoptosis 変化および proliferation 変化に関与していると予想される。しかし、本研究・研究期間では RT-PCR による RNA 発現のみを評価しているために、その後の蛋白出現を評価する必要がある。また、短腸症候群では腸管上皮の変化のみならず、腸管蠕動および吸収能も変化するためにこれらの機能についても評価する必要がある。

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)
今後投稿予定。

[学会発表](計 0 件)

アメリカ小児外科学会で発表予定。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古賀 寛之 (Koga Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 30468574