

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461918

研究課題名(和文)2光子励起顕微鏡を用いた小腸虚血再灌流障害時における好中球動態の解析

研究課題名(英文) Intravital Imaging of Neutrophil Recruitment in intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice using two-photon laser scanning microscopy

研究代表者

本田 正樹 (Honda, Masaki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80573609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：LysM-EGFPマウス(好中球が緑色の励起光を発する遺伝子改変マウス)を用い、全身麻酔下に45分の腸管血流遮断を行い温虚血再灌流障害モデルを作成し、その後2光子励起レーザー顕微鏡を用いて、小腸虚血再灌流障害時における好中球動態を観察・解析した。個体を生かしたまま非常に低い侵襲性のもと、リアルタイムに長時間観察可能であった。また3D解析画像を組み合わせることで、腸管の構造、好中球分布の様子を三次元的に評価できた。

研究成果の概要(英文)：Activated neutrophils induce local inflammation and result in pathophysiologic changes during intestinal ischemia-reperfusion (I/R) injury. However, few studies have examined real-time intravital neutrophil recruitment. Here, we show a method for imaging and dynamic change of the neutrophil recruitment in intestinal I/R injury using two-photon laser scanning microscopy (TPLSM). LysM-eGFP mice were subjected to 45 min of warm intestinal ischemia followed by reperfusion. Using time-lapse TPLSM technique, we directly observed the behavior of neutrophils in intestinal I/R injury. At low magnification, the number of neutrophils per field of view continued to increase for 4 hour after reperfusion. High magnification images revealed the presence or absence of blood circulation. TPLSM imaging could reveal the real-time neutrophil recruitment in intestinal I/R injury. Z-stack imaging was useful to evaluate pathophysiological changes of intestinal wall.

研究分野：小児外科・移植外科・生体内イメージング

キーワード：小腸虚血再灌流障害 2光子励起顕微鏡 好中球動態 生体内イメージング 微小循環

1. 研究開始当初の背景

小腸において腸間膜動脈閉塞症、絞扼性イレウス、壊死性腸炎、中腸軸捻転等の疾患、門脈血行遮断等の手術操作、小腸移植等、虚血およびそれに続く再灌流による臓器障害は临床上重大な問題である (Eltzsching, et al. Nat Med 2011)。小腸虚血再灌流障害の進展には遊走し、組織に浸潤する好中球が重要な役割を演じることが知られており、機序として好中球から産生される活性酸素・炎症性サイトカインによる直接作用や血管内皮細胞との接着による微小循環障害、protease による間接的障害が報告されている。実際動物実験ではこれらをターゲットにした治療法の有効性が示されてきている。しかし、これまでの小腸虚血再灌流障害に関する多くの研究は、in vitro あるいは免疫組織学的な検討が中心であり、小腸組織での炎症細胞浸潤や、臓器障害のリアルタイムな変化はほとんど研究されていない。そのため詳細なメカニズム解析にいたっておらず、有効な治療法も確立していない。従来の解析では注目する組織・臓器を固定し、いわば生体を死体にして観察していたので、細胞の動きに関する情報は得られなかった。我々はこの点に着目し、生体内蛍光イメージング法を用いて虚血再灌流障害時の小腸組織における免疫細胞、特に好中球の経時的な動態の変化を観察できないかと考えた。「生体内イメージング」では、実験動物を麻酔下で生かしたまま、観察したい組織・臓器を手術的に露出して観察する。このアプローチは方法論的に困難な点は多々あるが、多くの利点があり、特に循環血流が保たれるメリットは非常に大きい。血流があることにより、観察している組織を生理的な環境に保つことができ、血管と組織間での細胞の流入を捉えることもできる。細胞の動きを直接観察することで、障害の進展に関する新た

な知見、さらには薬物投与の適切な投与タイミングを見いだせる可能性が高まる。生体内蛍光イメージングは、生体内で GFP 等を発現させ、または生体に蛍光有機化合物や量子ドット等を投与し、光励起してその蛍光物質が発する光を体外から検出する手法である。In vivo で蛍光イメージングを行う際には、散乱、吸収、自家蛍光など生体の光学的特性によって深部観察が難しい問題点があるが、新たな技術革新として低侵襲で深部組織の観察に適した 2 光子励起顕微鏡の登場により、イメージング研究は急速に進歩し、多くの生命科学の領域で適用が広がっている。これまで、我々は肝癌微小環境および肝虚血再灌流時の白血球動員、遊走につき研究しており (Honda M, et al. Transplantation 2013, Takeichi T, et al. Int J Cancer 2012, Takeichi T, et al. J Gastrointest Surg 2010)、共焦点レーザー顕微鏡および 2 光子励起レーザー顕微鏡を用いて、生存状態でのマウス肝微小環境下での血管系と好中球の動的変化を 4 次元 (3 次元 + 時間) で映像化、解析することに成功している。本研究ではこれらの手技を発展させ、臓器の固定がさらに困難で報告の少ない小腸のイメージングを行っていきたいと考えた。

2. 研究の目的

2 光子励起顕微鏡を用いて、小腸虚血再灌流 (ischemic reperfusion; I/R) 障害時の好中球動態を in vivo, real time に観察し、そのメカニズムの新たな解析、ならびに新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

1) マウス小腸虚血再灌流障害モデル (Ischemia reperfusion : I/R 群) の作成
生後 8-12 週齢の LysM-EGFP マウス (励

起により好中球が蛍光反応し緑色の励起光を発する遺伝子改変マウス)を用いた。キシラジン(10mg/kg)+ケタミン(100mg/kg)による腹腔内麻酔下に小開腹後、マウスの上腸間膜動静脈を非侵襲的な血管クリップで遮断し一旦閉腹、45分後に開放することで、温虚血再灌流障害モデルとした。虚血は肉眼的な腸管色調変化で確認した。開腹のみを行い腸管虚血を行っていないものをControl群とし、比較検討を行った(各群n=5)。

2) 2光子励起顕微鏡による観察

再灌流後、設定した時間において2光子励起顕微鏡による観察を行った。セットアップはBX61WI+ FV1000MPE (Olympus)、およびMai Tai HP Deep See femtosecond-pulsed laser (Spectra Physics)を用いた。腹腔内麻酔下に開腹し、生きた状態で小腸を体外に露出し固定した。小腸の固定には定位固定装置を用い、蛍光試薬(TRITC-Albumin、血管を赤色に標識)を静注し、2光子励起レーザー顕微鏡を用いて小腸を観察した。この顕微鏡下では、数百マイクロメートルまでの深部観察が可能であるため、腸管壁を切開することなく漿膜から管腔内の粘膜までが観察できた。

3) 評価方法

2光子励起顕微鏡による観察は、低倍率・高倍率の2パターンで行った。再灌流後0、1、2、3、4時間時点で、それぞれ冒頭の10分の動画を撮影した。再灌流後どのように好中球が浸潤していくかを観察するため、タイムラプスイメージングを編集した。また一視野辺りの好中球数の経時変化、陰窩径、陰窩内好中球数を解析、検討した。さらに小腸壁の3D画像構築も行い、小腸壁への好中球浸潤の分布ならびに絨毛高の

評価も行った。画像解析はImage J (National Institute of Health)を用いて行った。血液生化学的検査所見、病理学的所見もあわせて比較検討を行った。

4. 研究成果

1) 2光子励起顕微鏡解析所見

a. 低倍率画像

粘膜固有層ならびに筋層のイメージング画像を示す(図1)。粘膜固有層では毛細血管ネットワークの中にある整然とした陰窩配列を、筋層では重なり合う筋繊維を詳細に観察することができた。タイムラプスイメージングでは、I/R群で有意な一視野辺りの経時的な好中球数増加を認めた(図2)。

図1

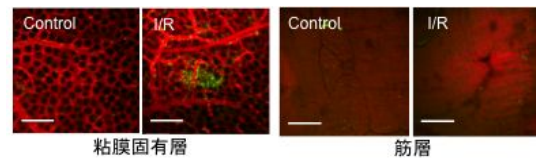
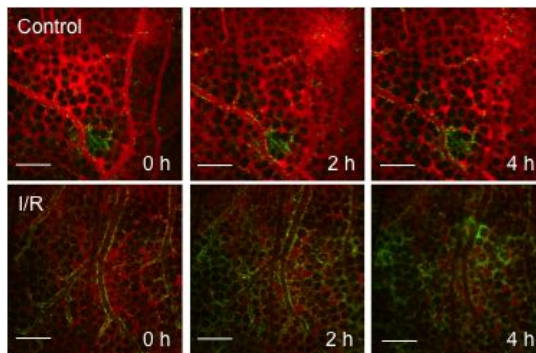


図2



b. 高倍率画像

高倍率画像では、小腸血管の循環の有無や細胞レベルでの好中球の動態をクリアに観察することができた。I/R群では、好中球の血管壁へのローリング・固着・血管外浸潤・間質内遊走の様子を捉えることが出来た(図3)。また有意差はでなかったものの陰窩径はI/R群で短い傾向にあり、経時的な陰窩内の浸潤好中球数はI/R群で有意に

多い結果となった(図4、5)。

図3

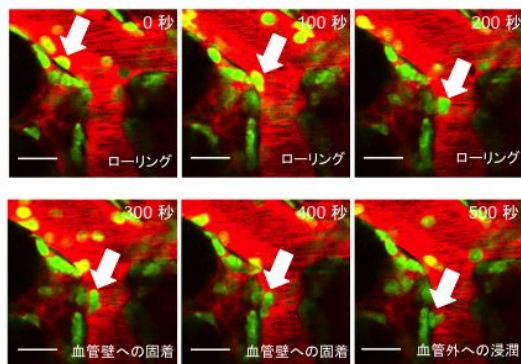


図4

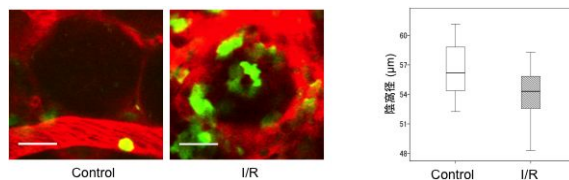
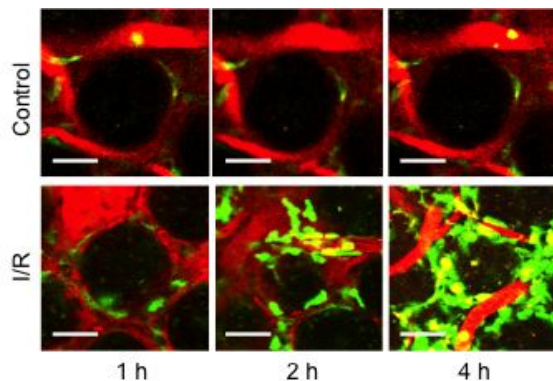


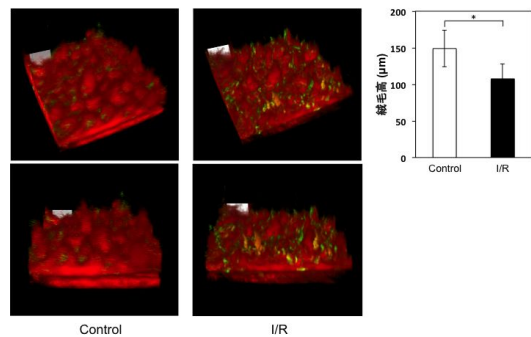
図5



c. 3D 構築画像

Image Jを用いての小腸3D構築画像を示す(図6)。好中球の分布や小腸構造の形態学的変化を一目で捉えることができた。また、4時間後のI/R群における絨毛高は、Control群と比較して有意に短縮していた。

図6



2) 病理学的所見

再灌流後0、2、4時間後の組織像、ならびに粘膜障害度をPark分類⁹⁾によって数値化し経時変化をみると、血液生化学所見同様、I/R群では再灌流後4時間までの経時的なPark scoreの悪化を認めた。

3) 血液生化学所見

小腸粘膜障害の指標とされているLDH、ならびにAST、ALTいずれにおいても、I/R群では再灌流後4時間まで経時的な値の上昇を認め、control群と比較し有意に高値を示していた。

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4件)

第27回 日本小腸移植研究会
2015年3月14日 Junko Fukutake Hall(岡山大学病院内)

2 光子励起顕微鏡を用いた小腸虚血再灌流障害時における好中球動態の解析

橋本晋太郎、本田正樹、門久政司、室川剛廣、林田信太郎、李光鐘、山本栄和、武市卒之、阿曾沼克弘、猪股裕紀洋

第50回 日本移植学会
2014年9月10日~12日 京王プラザホテル

ル

小腸虚血再灌流障害時における好中球動態
イメージング法の確立と好中球動態の解析
橋本晋太郎、本田正樹、武市卒之、入江友章、
門久政司、室川剛廣、林田信太郎、李光鐘、
阪本靖介、猪股裕紀洋

第 115 回 日本外科学会

2015 年 4 月 16 日～18 日 名古屋国際会議
場

2 光子励起顕微鏡を用いた小腸虚血再灌流
障害時の好中球動態イメージング法の確立
と好中球動態の解析

橋本晋太郎、本田正樹、勾坂正孝、吉井大貴
宇戸啓一、阪本靖介、猪股裕紀洋

第 28 回 日本小腸移植研究会

2016 年 3 月 12 日 国立成育医療センター
マウス小腸虚血再灌流障害時における好中
球動態の解

橋本晋太郎、本田正樹、室川剛廣、林田信太
郎、阪本靖介、猪股裕紀洋

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田 正樹 (HONDA Masaki)
熊本大学医学部附属病院 非常勤診療医師
研究者番号 : 80573609

(2)研究分担者

猪股 裕紀洋 (INOMATA Yukihiro)
熊本大学大学院生命科学研究部 教授
研究者番号 : 50193628

武市 卒之 (TAKEICHI Takayuki)
熊本大学医学部附属病院、非常勤診療医師
研究者番号 : 00380999