

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 5 月 24 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23792027
 研究課題名（和文）：アラミン概念に基づく 2 光子レーザー顕微鏡を用いた壊死性腸炎の病態解明と治療戦略
 研究課題名（英文）：Breakthrough of the pathogenesis and treatment strategy in necrotizing enterocolitis using two-photon laser scanning microscopy based on the alarmin concept.
 研究代表者：
 小池 勇樹（KOIKE YUHKI）
 三重大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号： 10555551

研究成果の概要（和文）：

本研究では、2 光子レーザー顕微鏡を用いて、NEC モデルの観察し、その病態を解明することを目的とした。NEC モデルの前段階として、LPS 静注による敗血症モデルを作成し、腸管微小循環の変化を捉えることに成功した。腸管壁内の Capillary vessel と Post capillary venule において、LPS 投与直後の敗血症急性期では、Leukocytes adhesion/ Platelets aggregation on leukocytes が経時的に増加していた。また、Blood flow velocity と Shear rate は、時間経過に伴い減少する傾向がみられた。現在、ラット新生児モデルを用いた NEC モデルの作成に移行中である。

研究成果の概要（英文）：

This research project is making the necrotizing enterocolitis model created in beta-actin-green fluorescent protein transgenic mice observed by two-photon laser-scanning microscopy(TPLSM), and figuring out the pathogenesis and treatment of this disease using this model and system.

As for the preliminary study, we performed the LPS induced septic model mouse, and achieved the observation of dynamic pathology of intestinal microcirculation in this septic model mouse. Next stage, we tried to performed the necrotizing enterocolitis (NEC) model in neonatal mouse induced by LPS with hypoxia (with or without hypothermia exposure).

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	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：小児外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性消化器疾患学、two-photon laser-scanning microscopy (TPLSM), necrotizing enterocolitis (NEC) model

1. 研究開始当初の背景

近年わが国においては、低出生体重児の発生率が年々上昇しており、それに伴い低出生体重児における新生児管理と強い影響があるとされる壊死性腸炎（Necrotizing Enterocolitis:NEC 以下 NEC と略す）の発生率が、本邦のみでなく世界中で急増している。現在、各国において NEC の病態究明に関して、多くの研究・報告がされているが、

いずれも実際の臨床における治癒率の上昇までを期待できるトランスレーショナルリサーチはなされていない。わが国における出生率低下やそれに伴う人口減少・超高齢化社会・少子化問題においても、その発生率・死亡率を減少させる研究が、急務である。そこで壊死性腸炎モデルにおいて、最新技術である二光子レーザー顕微鏡と GFP マウスを使用し、アラミンという疾患概念に基づいて、

この疾患を捉えることにより、in vivo における NEC の病態解明と新たな治療法の検討を行うこと目的とし、計り知れない臨床面への償却を行うことが本研究の全体構想である。

2. 研究の目的

＜アラーミン概念に基づいた NEC の病態＞
アラーミンはアメリカ NIH の Oppenheim ら (Arthr Rheum 2004;50:3401-3) によって提唱されたもので、“アラーミンとは、障害局所で生成され、殺菌・自然免疫・修復反応などを生体に誘導する活性をもつ生体由来の因子”と定義することができる。NEC においては、低酸素あるいは虚血をきたした未熟な腸管に腸管粘膜の損傷が加わって起こる腸管の炎症性・壊死性変化が主体であり、特に腸管粘膜における微小循環不全・微小血栓が広範囲に起こっていることが判明してきた。この腸管の壊死性変化に關与するメディエーターとして、HMGB1(High Mobility Group B-1 Protein) や一酸化窒素(NO)が關連することが最近になり報告された(Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 289:G643-652, 2005/ J Biological Chemistry 285:4995-5002, 2010)。これらのメディエーターは NEC における微小循環不全や微小血栓の発生に多大な影響を及ぼしていると考えられ、またアラーミンとして捉えられる。これらのアラーミン物質は、腸管の障害部位局所においては、血栓形成を促すことで、それ以上の炎症の波及を食い止めているという「善」の作用をもつ一方で、HMGB1 等が全身性に循環した場合には「悪」としての作用(すなわち DIC や SIRS といった変化。このため死のメディエーターとも言われる)をも有していることが分かってきている(Science 285:248-251, 1999)。しかし生体内、特に NEC モデルにおける生きたままの腸管粘膜において、これらが実際にどのように作用しているかは未だ不明であり、その悪としての作用を抑制する方法も解明されていない。
本研究では、第一に、最新技術である 2 光子レーザー顕微鏡によって、現在までに研究してきた DSS 大腸炎モデルや bacterial translocation モデルの作成・観察の実験経験 (Intravital imaging of DSS-induced cecal mucosal damage in GFP-transgenic mice using two-photon microscopy. J Gastroenterol 2010;45:544-53.)を活かし、NEC モデルの作成・観察を行う。これは同一個体での NEC における病理組織学的変化のリアルタイムイメージを提示するという

画期的なモデルとなる。この際に、NEC モデルでは LPS を静注することにより、微小循環不全・微小血栓が惹起されるが、これまでに微小循環不全の指標として用いられてきた Functional Capillary Density(FCD)を二光子レーザーの Tissue penetration を利用することで、腸管の漿膜面からの観察で、腸管粘膜レベルでのより詳細なリアルタイムな評価を世界で初めて可能とすることを目標とする。さらに上記に示した Selective laser irradiation to the endothelium を行い、血管内皮層のみを障害することで、その領域に露出・放出されたアラーミン(HMGB1 や NO)を特異的蛍光抗体を用いて、リアルタイムに同定し定量化を行う。この血管内皮選択的レーザー障害モデルと NEC モデルにおけるこれらアラーミンの露出・放出の差異をリアルタイムに明らかにすると共に、同血管内皮障害部位をそれぞれ Microdissection 法により cDNA 化し、分子レベルにおいてもこれらアラーミンの同定・定量化を行う。その上で、HMGB1 の「悪」とされる側面に対し、抗 DIC・抗炎症性に働くことが証明され始めたトロンボモジュリン等の新規薬剤や、近年欧米でも注目されている腸管の蠕動運動亢進作用と腸管選択的な血流増加作用を併せ持つ大建中湯等の薬剤を用いて、NEC における治療効果だけでなく予防効果をも、分子レベルの解析だけでなくリアルタイムな in vivo 解析と合わせることで、より信頼性の高い薬剤効果判定を可能とする。

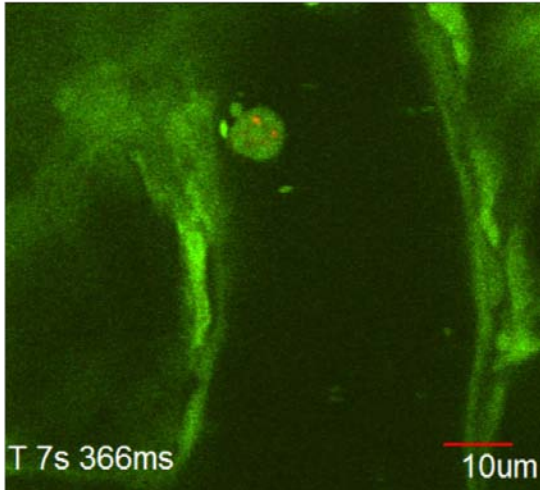
3. 研究の方法

- 1) GFP-actin transgenic mouseを用いた壊死性腸炎モデル (Zani et al. Eur J Pediatr Surg 2008 etc.) の経時的観察 {A-model}
- 2) 二光子レーザー顕微鏡を用いた selective laser irradiation to the endotheliumの経時的観察 {B model}
- 3) {A-model} と {B-model} における血管内皮障害領域の形態学的変化や血流速度・ずり応力の相違を比較検討
- 4) アラーミン (HMGB1 や NO) の特異的蛍光抗体を用いて、これらアラーミンの血管内皮障害部位における露出・放出・接着に関してのリアルタイムな同定と定量化
- 5) {A-model} と {B-model} における Thrombomodulin や大建中湯等による薬剤効果判定

基本的には、上記の順で実験を遂行していく。途中、新知見などがあれば、それについてさらなる研究が派生していく可能性はある。

4. 研究成果

まず、NEC モデルを作成する前段階として、

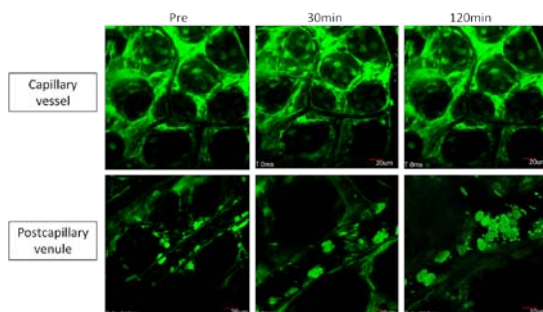


腸管壁内の微小循環の変化について、詳細に検討する方針とした。使用したのは、 β -actin-green fluorescent protein transgenic mice (GFP マウス) であり、まず GFP マウスの大腿静脈にカニューレーションを行い、Organ stabilizing system を用いて、GFP マウスの盲腸を固定。さらにイソフルラン吸入麻酔下 (0.7~1.2%) で GFP マウスの盲腸壁を漿膜面から、粘膜層の微小血管までをリアルタイムに観察した。この観察の中で、正常時でも Adherent Leukocytes/Rolling Leukocytes が観察されるレベルが Post capillary venule であり、この確証を得るため、Granulocytes の表面抗原である CD11b (Alexa fluor 647®) を用いて確認した (図 1)。

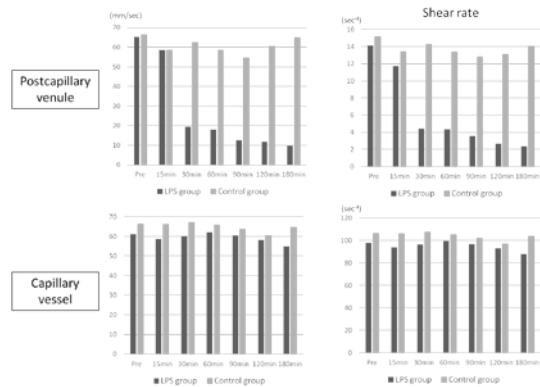
図 1

Leukocytes 観察部位の 3D-image のオリエンテーション (毛細血管・Post capillary venule の 2 カ所) をつけた上で、LPS 10mg/kg を IV. 経時的に上記 2 カ所の微小循環について、観察を行い解析を行った。この際に、Leukocyte rolling number per 30s/ leukocytes rolling speed/ leukocytes adhesion number だけでなく、line-shift-diagram method により、Blood flow velocity や、Blood flow shear rate までを測定した。結果として、LPS 投与後では、Post capillary venule のみ、Leukocytes rolling/Leukocytes adhesion/ Platelets aggregation on leukocytes が経時的に増加していた (図 2)

図 2

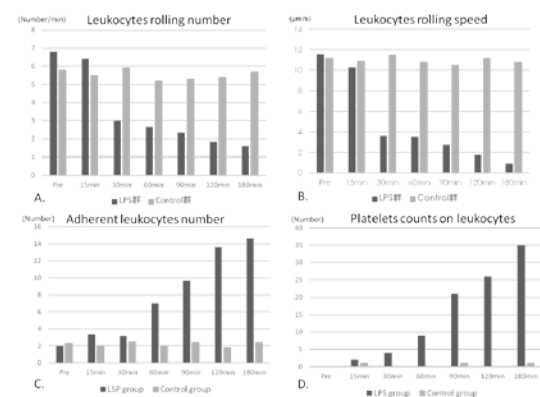


さらに blood flow velocity だけでなく、Shear rate も capillary vessel では、急性期に変化はないものの、Postcapillary venule においては、ダイナミックな変化が急性期に起こっていることが判明した。(図 3) 図 3



一方で、このドラマティックな変化のみられた Post capillary venule において、生食投与のみのコントロール群を比較すると、LPS 投与群においてのみ、leukocytes rolling number と leukocytes rolling speed が減少傾向を示すのとは逆に、Adherent leukocytes number と Platelets counts on leukocytes は、時間経過と共に、増加する傾向が有意差をもって示された。(図 4)

図 4



これらの新発見は、現在論文作成中であり、近日投稿予定である。

次に、同様の LPS-induced septic model mouse を出生直後の新生児マウスに投与した上で、同様の観察を行ったところ、新生児マウスが、非常に侵襲に脆弱で、観察開始から

1 時間以内に死んでしまった。このため、このモデルを長時間にわたって TPLSM で観察していくには、個体自体を大きくする必要があると判断し、現在新生児ラットを用いた実験系に移行中である。その上で、元々予定していた LPS+低酸素暴露 もしくは LPS+低酸素暴露±低体温暴露のモデルをそれぞれ作成し、これまでに培った TPLSM による腸管微小循環の観察を行なっていく予定である。

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 1 件)

In vivo time-course imaging of tumor angiogenesis in colorectal liver metastases in the same living mice using two-photon laser scanning microscopy

Tanaka K, Morimoto Y, Toiyama Y, Matsushita K,

Kawamura M, Koike Y

J Oncol. 2012. 265487

doi: 10.1155/2012/265487 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. 二光子レーザー顕微鏡を用いた敗血症モデルマウスにおける Neutrophil extracellular traps の観察と検討

小池勇樹

第 50 回日本小児外科学会学術集会

2013/05/29~2013/05/31

京王プラザホテル

2. 二光子レーザー顕微鏡を用いたマウス敗血症モデルの消化管微小循環における病態進展メカニズムの検討

小池勇樹

第 49 回日本小児外科学会学術集会

2012/05/14~2012/05/16

パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 勇樹 (KOIKE YUHKI)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 10555551