



Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinalepithelial apoptosis and bacterial translocation in experimentalsevere acute pancreatitis.

中島, 高広

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-06

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2930

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002930>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 8 8 】

氏 名・（本 籍） 中島 高広 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第2005号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月6日

【 学位論文題目 】

Protective effects of vascular endothelial growth factor on
intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation
in experimental severe acute pancreatitis.

（実験重症急性膵炎における腸管粘膜上皮アポトーシスと
バクテリアル・トランスロケーションに対するVEGFの防御効果）

審 査 委 員

主 査 教 授 東 健
教 授 林 祥剛
教 授 横野 浩一

【背景・目的】

重症急性膵炎は良性疾病でありながら死亡率が20%に達する重篤な疾患であり、厚生労働省の難病(特定疾患)指定をうけている。本疾患における最も重篤な合併症は発症後期の感染性合併症(感染性膵壊死および敗血症)であり、高死亡率の原因となっている。後期の感染性合併症はその成立機序として全身の免疫能低下や腸内細菌の腸管外移行(bacterial translocation)が重要と考えられている。私共はこれまでにラット重症急性膵炎モデルにおいて、重要臓器(肝・腎)にアポトーシスが誘導されることを解明し、このアポトーシス誘導が臓器障害発生に関与していることを報告してきた。さらに、ラット重症急性膵炎モデルにおいて、腸管粘膜上皮のアポトーシスが亢進していることを明らかにし、この現象が腸管壁の透過性亢進や bacterial translocation と関連していることを報告してきた。一方、腸管粘膜における微小循環障害や虚血性変化も bacterial translocation の成立に重要な役割を果たしていると考えられており、私共は以前にラット重症急性膵炎モデルにおいて酸素化 PFC の腹腔内投与が腸管粘膜上皮のアポトーシスを抑制し、bacterial translocation を改善することを報告している。

Vascular endothelial growth factor(以下 VEGF)は血管内皮細胞に作用する増殖因子で、血管新生の促進、血管内皮のアポトーシスの抑制、血管透過性の亢進などをきたすといわれている。関節リウマチ患者の滑液や癌患者の血清において VEGF 値の上昇が報告されており、VEGF は炎症、血管新生、創傷治癒過程、癌の転移などにおける重要なメディエーターと考えられている。私共は、急性膵炎臨床例およびラット急性膵炎モデルにおいて血清 VEGF 値が有意に上昇しており、VEGF が肝・腎のアポトーシスを抑制し肝・腎障害の防御因子として作用していることを報告してきた。そこで本研究では、実験重症急性膵炎における腸管粘膜上皮のアポトーシス亢進と bacterial translocation に対する VEGF の効果を検討した。

【方法】

Wistar 系雄性ラット(体重 300-350 g)を実験に使用した。本動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験指針に基づき、同大学動物実験委員会の承認を得て行った。

重症急性膵炎モデルとして、ラットを麻酔下に開腹後、3%デオキシコール酸(0.1 ml)を膵管に逆行性注入して出血性壊死性膵炎(3% DCA 膵炎)を作製した。ラットを以下の3群に分類して実験を行った。(1) Sham 群: 生食 1 ml を静注後、単開腹、(2) SAP 群: 生食 1 ml を静注後、3% DCA 膵炎を作製、(3) VEGF+SAP 群: recombinant rat VEGF (2 µg/ml, 1 ml) を静注後、3% DCA 膵炎を作製。

モデル作製 8、18、22 時間後に犠牲死させ以下の検討を行った。(1) 膵炎作製 8 時間後、回腸粘膜におけるアポトーシスの状態を DNA fragmentation ELISA と TUNEL

染色で検討した。(2) 膵炎作製 8 時間後、血清アミラーゼ値とトリパーゼ値を測定した。(3) 膵炎作製 18 時間後、回腸末端の HE 染色により小腸絨毛高を検討するとともに、膵の HE 染色により膵炎の程度を検討した。(4) 膵炎作製 22 時間後、血管透過性の指標としてヘマトクリットと膵組織の含水率を測定した。(5) 膵炎作製 22 時間後、腸間膜リンパ節の細菌培養を行い、bacterial translocation を検討した。(6) 膵炎作製 22 時間後、血管内皮細胞傷害のマーカーとして血漿 plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 値を測定した。(7) 膵炎作製 22 時間後、血管内皮細胞のマーカーとして抗 von Willebrand factor 抗体を用いて回腸末端の免疫組織染色を行い、微小血管密度を計測した。

統計学的解析は、二群間の平均値の差には Mann-Whitney U 検定、頻度の差には χ^2 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

【結果】

(1) 膵炎作製 8 時間後、DNA fragmentation ELISA の結果、回腸粘膜の断片化 DNA 量は Sham 群に比べ SAP 群で有意に増加していたが、VEGF+SAP 群では有意に抑制されていた。回腸の TUNEL 染色では、Sham 群に比べ SAP 群で TUNEL 陽性細胞が増加していたが、VEGF+SAP 群では SAP 群に比べ TUNEL 陽性細胞が減少していた。(2) 膵炎作製 8 時間後、血清アミラーゼ値とトリパーゼ値は Sham 群に比べ SAP 群で有意な上昇がみられたが、VEGF+SAP 群では SAP 群と比べて差はなかった。(3) 膵炎作製 18 時間後、小腸の HE 染色の結果、SAP 群では Sham 群に比べ絨毛高の著明な低下が認められたが、VEGF+SAP 群では絨毛高の低下が改善していた。また膵の HE 染色の結果、SAP 群では Sham 群に比べ著明な炎症と壊死が認められたが、VEGF+SAP 群ではこれら膵炎の組織に変化を認めなかった。(4) 膵炎作製 22 時間後、ヘマトクリットと膵組織の含水率は Sham 群に比べ SAP 群で有意に増加していたが、VEGF+SAP 群では SAP 群と比べて差はなかった。(5) 膵炎作製 22 時間後、腸間膜リンパ節の細菌培養の結果、細菌培養陽性率は Sham 群で 0% (0/10)であるのに対し、SAP 群では 71% (24/34) と有意に増加していた。VEGF+SAP 群では 41% (12/29) であり、SAP 群に比して有意に改善していた。また、細菌のコロニー形成の程度を検討したところ SAP 群では(1+)が 65%、(2+)が 6%みられたのに対し VEGF+SAP 群では(1+)が 41%であった。(6) 膵炎作製 22 時間後、血漿 PAI-1 値は Sham 群に比べ SAP 群で有意に増加していたが、VEGF+SAP 群では有意に抑制されていた。(7) 膵炎作製 22 時間後、小腸における von Willebrand factor の染色性は Sham 群に比べ SAP 群で減弱していたが、VEGF+SAP 群では改善されていた。微小血管密度は Sham 群に比べ SAP 群で有意に減少していたが、VEGF+SAP 群では SAP 群に比して有意に改善していた。

[考察]

重症急性膵炎において、腸管粘膜バリアの機能不全とそれに引き続いて起こる bacterial translocation は感染性合併症の成立に関与しており、bacterial translocationを防ぐには粘膜バリアの機能を保つことが重要である。最近、さまざまな病態において腸管粘膜上皮のアポトーシスが亢進し、bacterial translocationと関連していることが報告されており、私共は重症急性膵炎の早期から腸管粘膜上皮のアポトーシスを制御することがbacterial translocationの抑止につながるのではないかと推察してきた。一方、私共は前研究で重症急性膵炎において VEGF が肝・腎のアポトーシスを抑制し、肝・腎障害の防御因子として作用することを明らかにした。そこで今回、腸管粘膜上皮のアポトーシス亢進と bacterial translocation に対する VEGF の効果を検討した。VEGF は小腸粘膜のアポトーシス亢進および小腸粘膜の萎縮を改善し、腸間膜リンパ節への bacterial translocation を抑制した。

腸管粘膜上皮のアポトーシス亢進に対する VEGF の抑制効果の機序に関して考察する。まず、VEGF は重症急性膵炎における血清アミラーゼ値やリパーゼ値の上昇を改善しなかったし、膵の組織所見も改善しなかったため、重症急性膵炎自体に対する改善効果はなかったと考えられる。また、VEGF は重症急性膵炎におけるヘマトクリットや膵組織の含水率の上昇を改善しなかったため、血管透過性に対する効果もなかったと思われる。本実験モデルでは、VEGF は障害臓器(小腸)の血管血管内皮細胞周囲で産生され、バラクライン様式で臓器保護因子として作用している可能性が考えられる。また、VEGF 受容体は血管内皮細胞に存在しており、小腸粘膜上皮細胞には存在しないと言われているので、小腸粘膜上皮細胞に対する VEGF の直接的作用はなかったと考えられる。以上より、2つの機序が考えられる。一つは、VEGF の血管新生促進作用により微小血管が修復され、腸管粘膜への血流が改善されて腸管粘膜上皮のアポトーシスが抑制される機序である。実際、本結果において VEGF は微小血管密度を増加していたので、微小循環が改善していたと推察される。もう一つは、VEGF が血管内皮細胞自体のアポトーシスを抑制することにより血管内皮細胞傷害を軽減し、微小循環を改善して腸管粘膜上皮のアポトーシスを抑制する機序である。本結果では VEGF は血漿 PAI-1 値の上昇を改善していたので、血管内皮細胞傷害が軽減していたと考えられる。

[結語]

重症急性膵炎の早期から腸管粘膜上皮のアポトーシスを制御することによりバリア機能を保つことは、bacterial translocation の予防対策として重要であると考えられた。また、重症急性膵炎において、VEGF の投与や VEGF 産生の強化が新しい治療の選択肢の一つとして成り得る可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	乙 第 2 0 0 8 号	氏 名	中島高広
論 文 題 目 Title of Dissertation	Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis 実験重症急性膵炎における腸管粘膜上皮アポトーシスとバクテリアル・トランスローケーションに対する VEGF の防御効果		
審 査 委 員 Examiner	主 査 東 健 Chief Examiner 副 査 林 祥剛 Vice-examiner 副 査 横野 浩一 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 1 9 年 2 月 2 6 日		

(要旨は 1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

3
重症急性膵炎は死亡率の高い疾患であり、厚生労働省の難病指定をうけている。本疾患の主な死因は感染性合併症（感染性膵壊死、敗血症）であり、その成立機序として腸内細菌の腸管外移行（bacterial translocation）が重要といわれている。これまで、本研究者らはラット重症急性膵炎モデルにおいて、腸管粘膜上皮のアポトーシスが亢進し、この現象が腸管壁の透過性亢進や bacterial translocation と関連していることを明らかにしている。また、腸管粘膜における微小循環障害や虚血性変化も bacterial translocation の成立に重要な役割を果たしていると考えられている。VEGF は血管内皮細胞増殖因子で、血管新生の促進、血管内皮のアポトーシスの抑制、血管透過性の亢進をきたし、炎症、創傷治癒過程、癌の転移などにおける重要なメディエーターと考えられている。本研究者らは、急性膵炎臨床例とラット急性膵炎において血清 VEGF 値が上昇し、VEGF が肝・腎のアポトーシスを抑制して肝・腎障害を改善することを見出してきている。

本研究では、ラット重症急性膵炎における腸管粘膜上皮アポトーシスと bacterial translocation に対する VEGF の効果を検討した。

ラットに生食もしくは recombinant rat VEGF を静注後、3%DCA を膵管に逆行性注入して出血性壊死性膵炎を作製した。VEGF は血清アミラーゼ・リパーゼ値の上昇および膵炎の組織学的所見を改善しなかった。VEGF の投与により小腸粘膜上皮のアポトーシス（断片化 DNA 量および TUNEL 陽性細胞）は有意に減少し、小腸絨毛高の低下も改善された。VEGF はヘマトクリットと膵組織の含水率を改善しなかった。VEGF の投与により腸間膜リンパ節の細菌培養の陽性率は有意に改善した。VEGF の投与により血漿 PAI-1 値の上昇は有意に低下し、von Willebrand factor

抗体による染色性（微小血管密度）の減少を有意に改善した。

本研究により、重症急性膵炎において VEGF は小腸粘膜のアポトーシス亢進および小腸粘膜の萎縮を改善し、腸間膜リンパ節への bacterial translocation を抑制することが明らかとなった。

VEGF は急性膵炎自体に対する改善効果も血管透過性に対する効果もなかったと考えられる。また、VEGF 受容体は小腸粘膜上皮細胞には存在しないと言われているで、VEGF の直接的作用はなかったと考えられる。よって、VEGF の血管新生促進作用による微小血管の修復もしくは血管内皮のアポトーシス抑制作用による血管内皮傷害の軽減により、腸管粘膜への微小循環を改善して腸管粘膜上皮のアポトーシスを抑制したと推察される。

以上、重症急性膵炎の早期から腸管粘膜上皮のアポトーシスを制御することは bacterial translocation の予防対策として重要であり、VEGF の投与が新しい治療の選択肢の一つとして成り得る可能性が示された。

本研究は、重症急性膵炎における腸管粘膜上皮アポトーシスと bacterial translocation に対する VEGF の効果を研究したものであるが、本疾患における感染に対する新しい治療の可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。