

主論文の要旨

**Small intestine morphology and recovery after
drug-induced colitis in proglucagon-derived
peptides knockout mice**

〔 プログルカゴン由来ペプチドノックアウトマウスにおける
小腸形態と薬剤誘発性腸炎後の回復についての検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：後藤 秀実 教授)

松下 正伸

【緒言】

プログルカゴン遺伝子は膵臓の A 細胞と、腸管の L 細胞に発現しており、酵素によりグルカゴン、GLP-1、GLP-2 といったプログルカゴン由来ペプチド (PGDPs) が誘導、産生される。腸管に作用するホルモンである GLP-2 は、腸管粘膜細胞を延命し、粘膜増殖を促進する効果を有するとされている。そのため、GLP-2 作動薬や GLP-2 の分解酵素である DPP-4 の阻害薬の投与を実験系動物に行った場合には、小腸重量及び小腸長が増加し、小腸絨毛が延長するという報告や、薬剤誘発性腸炎においては腸炎が改善されるとの報告がなされている。

このような GLP-2 の作用を増強させる研究は今までなされてきたが、GLP-2 が欠損する検討は未だなされていない。

そこで、今回我々は、GLP-2 遺伝子を含むプログルカゴン遺伝子をノックアウトしたマウスを使用し、GLP-2 を含む PGDPs が欠損した状況での小腸及び大腸の組織学的形態と、薬剤誘発性腸炎における回復過程への影響を検討した。

【対象及び方法】

本研究は、名古屋大学大学院医学系研究科の動物実験施設において行った。なお PGDPs 欠損マウスの遺伝子形については組織 DNA のジェノタイピングにより、野生型 (PGDPs^{+/+})、ヘテロマウス (PGDPs^{+/-})、ノックアウトマウス (PGDPs^{-/-}) の 3 群に分類した (Thermo Scientific Phire Animal Tissue Direct PCR kit; Finnzymes)。PGDPs^{-/-}においてはグルカゴン及び GLP-1 が存在しないことは既に確認されていたため、GLP-2 の mRNA が発現していないことを確認した (Figure 1)。

1. 小腸、大腸の形態

次に 8 週齢のオスの PGDPs^{-/-}について、小腸重量及び小腸長と、十二指腸及び上部、中部、下部の 3 か所の小腸について、小腸絨毛高、絨毛密度 (長軸 1000 μ m あたりの平均絨毛本数)、陰窩の深さを病理学的に検討し、同腹の PGDPs^{+/+}と比較検討した (n=5)。大腸については大腸重量及び大腸長と、遠位大腸の陰窩の深さの病理学的検討を同腹の野生型と比較し行った (n=5)。

2. 薬剤誘発性腸炎の影響

12 週齢の PGDPs^{+/+}及び PGDPs^{-/-}マウスを個別のケージに隔離した後に、2.5%濃度の dextran sulfate sodium (DSS) を 6 日間投与し、その後蒸留水に置き換えた。検討項目は、%体重、臨床スコア (体重、便の性状、血便の程度) とし、投与開始後 22 日目まで毎日計測した。病理学的な検討は 7 日目と 21 日目に行った (n=6)。

病理学的検討は、小腸、大腸組織の各部位を 1cm の長さに切離し、4% paraformaldehyde にオーバーナイトで浸透後にパラフィンに包埋し、H&E 染色後に顕微鏡下で行った (Olympus AX80 microscope)。

統計学的検討は、IBM SPSS Statistics Version 23 を使用し、Mann-Whitney U-test で検

討を行い、 $p < 0.05$ を有意と設定した。

【結果】

1. 小腸、大腸の形態

十二指腸、及び3つの部位の小腸において、形態異常はみられなかった。小腸長は PGDPs^{+/+} が 334 ± 11 mm (mean \pm SD) で PGDPs^{-/-} は 367 ± 39 mm、小腸重量は PGDPs^{+/+} が 1617 ± 258 mg で PGDPs^{-/-} は 1931 ± 387 mg、で有意差は見られなかった。

大腸長は PGDPs^{+/+} が 7.8 ± 1.2 cm で PGDPs^{-/-} は 8.0 ± 0.6 cm、遠位大腸における陰窩の深さは PGDPs^{+/+} が 209 ± 19 μ m で PGDPs^{-/-} は 201 ± 26 μ m、で有意差は見られなかった。

十二指腸と3つの部位の小腸において、小腸絨毛高の平均値は PGDPs^{-/-} は PGDPs^{+/+} より低かったが、有意ではなかった。そして、十二指腸から下部小腸にかけての段階的な絨毛の短縮はどちらの群においても観察された (Figure 2A)。絨毛の平均幅は PGDPs^{+/+} が 181 ± 40 μ m で PGDPs^{-/-} は 171 ± 32 μ m、絨毛密度は PGDPs^{+/+} 4.7 ± 0.7 (本/1000 μ m) で PGDPs^{-/-} は 4.8 ± 0.4 であった。陰窩の深さは、部位、群において差を認めなかった (Figure 2B)。

2. 薬剤誘発性腸炎における検討

(1)臨床評価

6日間の2.5%濃度 DSS 投与では、観察期間内に死亡は発生しなかった。症状の悪化を反映する臨床スコアは6日目まで上昇し、最大値に有意差は認めなかった (PGDPs^{+/+}; 6.9 ± 2.1 , PGDPs^{-/-}; 7.7 ± 3.4) (Figure 3A)。

%体重は9日目まで減少し (PGDPs^{+/+}; $82.4\% \pm 5.1\%$, PGDPs^{-/-}; $82.9\% \pm 4.6\%$)、そして、21日目には回復した (PGDPs^{+/+}; $97.5\% \pm 5.6\%$, PGDPs^{-/-}; $96.6\% \pm 4.6\%$)。腸炎回復期においては、15日目から19日目にかけて PGDPs^{-/-} の%体重は PGDPs^{+/+} よりも回復が遅かったが、有意ではなかった (Figure 3B)。

(2)病理学的評価

大腸長は、7日目において PGDPs^{+/+} は 6.3 ± 1.0 cm で PGDPs^{-/-} は 5.6 ± 0.8 cm、21日目において PGDPs^{+/+} は 7.6 ± 0.6 cm で PGDPs^{-/-} は 6.9 ± 0.8 cm であった。病理学的スコアによる炎症評価は、遠位小腸において7日目において両群に軽度の炎症が見られた。21日目には PGDPs^{+/+} では炎症が消失していたが、PGDPs^{-/-} の遠位小腸においては炎症が軽度残存していた。その差は有意ではなかった。

遠位大腸においては、投与7日目の病理学的スコアは両群において高値だった。21日目には PGDPs^{+/+} では病理学的スコアが低下していたが、PGDPs^{-/-} では依然高い値を示していた ($p < 0.05$) (Figure 3B)。

【考察】

GLP-2 のダウンストリームメディエーターである Vasoactive intestinal peptide (VIP)

のノックアウトマウスでは小腸の奇形が報告されている。また、GLP-2の作用を増強する薬剤の投与には、小腸絨毛を延長する作用があるとされている。しかし、GLP-2を欠損するPGDPs^{-/-}において形態の異常は小腸、大腸において観察されなかった。そして、絨毛高、幅、密度、陰窩の深さにも違いはなかった。このことはPGDPs、及びGLP-2の欠損が小腸形態の維持に影響していない可能性を示唆している。

今回使用されたDSSは、主に大腸において炎症が誘発される。GLP-2の小腸への作用に鑑みるならば、小腸粘膜障害をメインとする薬剤誘発性のモデルでの検討も必要と考えられる。

DSS腸炎において、臨床スコアおよび%体重の変化は腸炎の活動期、治癒期において差が見られなかった。過去のGLP-2作動薬及びDPP-4阻害薬投与における腸炎の改善効果からは予想していた結果とは異なるものであった。他のケミカルメディエーターによる代償が働いていた可能性も考えられる。

【結語】

プログルカゴン由来ペプチド (PGDPs) ノックアウトマウスにおいて、小腸の形態に変化は見られなかった。しかし薬剤誘発性腸炎においては、臨床スコア及び%体重に差は認めなかったが、病理学的にはPGDPsノックアウトマウス群において炎症の遷延が認められた。