

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

高齢者の消化器臓器障害機構の解明と恒常性維持機構破綻の病態（24-1）

主任研究者 京兼 和宏 国立長寿医療研究センター
消化機能診療部・内視鏡診療科（医長）

研究要旨

年間全体について

高齢者では様々な疾患により低栄養になり易く、逆に低栄養は疾患発症の誘因となりうる。

高齢者では薬剤性消化管障害や臓器障害が非高齢者に比べ発症しやすいことが知られており、薬剤性消化管粘膜障害を発症した場合は消化吸収能の低下により低栄養になり得る。しかし、低栄養がその発症に関与しているかどうかは明らかにされていない。

一方、高齢者は組織が障害を受けた際の修復・再生能も非高齢者に比べ劣っていると考えられている。その理由として加齢により組織幹細胞が老化することで上皮の再生・臓器維持機能が障害され臓器維持機能が低下すると考えられているが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く、様々な病態に対する幹細胞の動態や組織再生の解析はほとんど行われていない。

本研究では、まず高齢者の薬剤性消化管障害として非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）による潰瘍発症患者や抗生剤投与に伴う偽膜性腸炎の患者で、疾患発症と栄養状態の関連を検討した。次に、胃および、再生がおこらないと考えられてきた腭組織に対し、免疫組織学的に幹細胞マーカーの発現や局在を調べることにより、組織障害時の修復・再生のメカニズムを検討した。

平成26年度について

本年度は、経過観察対象となっている NSAID 長期投与患者の潰瘍発症を引き続き観察した。また、胃潰瘍患者の生検組織を対象とし、幹細胞マーカーである LGR5 の発現と細胞増殖の関連を、免疫組織染色により検討した。

主任研究者

京兼 和宏 国立長寿医療研究センター 消化機能診療部・内視鏡診療科（医長）

分担研究者

新飯田俊平 国立長寿医療研究センター バイオバンク（副センター長）

北川 雄一 国立長寿医療研究センター 医療安全推進部（感染管理室長）
（平成24年度、25年度分担）

研究期間 平成24年4月1日～平成27年3月31日

A. 研究目的

高齢者では様々な疾患により栄養の摂取が不良となり低栄養になり易く、逆に低栄養は臓器の機能低下や免疫能の低下などを引き起こすことにより様々な疾患発症の誘因となりうる。

高齢者では薬剤の副作用が非高齢者に比べ発症しやすいことが知られており、薬剤により消化管粘膜障害や臓器障害を起こした場合には消化吸収能の低下から低栄養の原因となる。しかし、逆に低栄養が薬剤性消化管粘膜障害の発症に関与しているかどうかは明らかにされていない。

また、高齢者に薬剤性消化器障害が多い理由として、加齢により上皮の再生・維持機能が非高齢者に比べ低下するためと考えられているが、その詳細なメカニズムについては研究も少なく不明な点が多い。

一方、消化吸収の中心臓器の一つである膵臓は、以前は一度障害をうけると再生されないと考えられてきたが、高齢者に多い膵炎（自己免疫性膵炎、慢性膵炎）では、治療により膵組織が再生しうることが報告されている。

近年の研究により、ほとんどの臓器には組織幹細胞と呼ばれる限定された多分化能を有する一群の細胞があり、組織の修復・再生や恒常性の維持に関与していることが明らかとなっている。最近、下部消化管における組織幹細胞マーカーとして

Leucine-rich-repeat containing G-protein coupled receptor 5(LGR5)が発見され、下部消化管粘膜上皮のすべての細胞がLGR5陽性細胞由来であることが証明された。しかし、消化管臓器における組織幹細胞は同定されたばかりであり、種々の疾患における組織幹細胞の動態や組織修復・再生の詳細なメカニズムは不明な点が多い。

本研究では、薬剤性消化管粘膜障害と栄養状態との関連および、組織障害時の修復・再生のメカニズムを検討することを目的とし、以下の検討を行う。1) 高齢者の薬剤性消化管障害として非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)による薬剤性粘膜障害(京兼)や抗生物質による偽膜性腸炎(北川)を発症した患者を、主に栄養状態の面から背景因子を解析し、低栄養が高齢者における危険因子かどうか検討する。2) 胃(京兼)や膵臓(新飯田)から採取された組織を用い、免疫組織学的に幹細胞マーカーの発現や局在を、様々な疾患と正常組織で検討することにより、組織障害および修復・再生のメカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

3年間全体について

1) 高齢者の薬剤性消化管障害の臨床像の検討

高齢者の薬剤性消化管障害として、NSAIDsによる上部消化管粘膜障害と偽膜性腸炎に着目し、その発症を栄養状態の面から解析し、栄養状態が疾患発症の危険因子かどうか検討した。

京兼は、高齢者におけるNSAIDs潰瘍の実態を明らかにする目的で、2011年1月から12月までの間に国立長寿医療研究センターでNSAIDsを処方された患者のうち、65歳以上の患者2,324名を対象者とし、有症状にて発見された上部消化管潰瘍の発症例を栄養状態を含む背景因子の面からレトロスペクティブに解析した。

北川は、偽膜性腸炎について、2010年8月より2013年10月31日までに国立長寿医療研究センターにおいて便CDトキシン検査陽性であった65例の栄養状態を含む背景因子を解析した。

栄養評価の指標としてレトロスペクティブに検討可能なGNRI(Geriatric Nutritional Risk Index： $14.89 \times \text{Alb} + 41.7 \times \text{DW}/\text{IBW}$)およびPNI(Prognostic Nutritional Index： $10 \times \text{Alb} + 0.005 \times \text{TLC}$)を用いた。またBarthel IndexによるADLの評価も行った。

2) 高齢者の消化器臓器における組織再生分子機構の解析

京兼は、胃粘膜障害時における修復・再生の分子機構について解析を行った。NSAIDs潰瘍を含む胃潰瘍患者の病変辺縁部から採取した生検組織を対象とし、下部消化管における組織幹細胞マーカーとして確立されているLeucine-rich-repeat containing G-protein-coupled receptor 5(LGR5)の発現や局在を免疫組織学的染色により検討した。同一患者の内視鏡的正常粘膜からの生検組織を対照群とした。次に、LGR5の発現と細胞増殖との関連について検討した。細胞増殖は、細胞増殖マーカーであるKi-67の発現を免疫組織学的染色により評価した。

新飯田は、従来は一旦障害されると再生しないと考えられてきた腭組織における組織再生の分子機構を解明することを目的とし、近年ES細胞の発生初期に発現する遺伝子として発見されたZscan4(Zinc finger and scan domain containing 4)遺伝子に着目し、正常腭組織および慢性腭炎組織におけるその発現や局在を免疫組織学染色により検討した。

なお、これらの研究は国立長寿医療研究センターの倫理・利益相反委員会の承認を得て実施した。

平成26年度について

本年度は、LGR5陽性細胞の発現が、実際に細胞増殖と関連があるかどうかを検討した。胃潰瘍患者の病変辺縁部および内視鏡的正常部から採取した生検組織を対象とし、LGR5の

発現と細胞増殖との関連を検討した。内視鏡的正常粘膜からの生検組織を対象群とした。細胞増殖は細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現を免疫組織学的染色により評価し、胃粘膜上皮の核 500 個中の陽性率 (Ki-67 Labeling Index:Ki-67 LI) を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理原則を遵守し、「臨床研究に関する倫理指針」「疫学研究に関する倫理指針」に従って実施した。

C. 研究結果

3年間全体について

1) 高齢者の薬剤性消化管障害の臨床像の検討

a) NSAIDs 潰瘍の臨床像 (京兼)

国立長寿医療研究センターにて 2011 年 1 月から 12 月までの間に NSAIDs を処方された 65 歳以上の患者は 2,324 名であった。このうち定期または不定期に 4 週間以上の使用歴のある 1085 名を解析の対象とした。2014 年 12 月までに胃または十二指腸潰瘍の発症が確認された患者は 67 名 (6.2%) であった。

まず、1085 症例において潰瘍発症に関わる背景因子を多変量解析にて解析した。プロトンポンプ阻害薬、プロスタグランジン製剤の併用は潰瘍発症を抑制し、抗血小板薬の併用は潰瘍発症を増加させていた。H2 受容体拮抗薬、粘膜防御剤の併用や COX-2 選択的阻害薬の使用は潰瘍発症との間に明らかな関連を認めなかった (表 1)。

次に GNRI (Geriatric Nutritional Risk Index : $14.89 \times \text{Alb} + 41.7 \times \text{DW/IBW}$) を栄養状態の指標とし、NSAIDs 潰瘍発症を栄養状態の面から検討した。NSAIDs 投与開始時期の GNRI は 614 名 (潰瘍発症例 : 67 例、非発症例 : 547 例) で算出可能であった。潰瘍発症例 (95.29 ± 9.06) では非発症例 (99.97 ± 8.27) に比べ薬剤投与開始時の GNRI は有意に低値であった ($p < 0.01$)。中等度以上の栄養障害を示す $\text{GNRI} < 92$ を低栄養と規定した場合、低栄養は NSAIDs 潰瘍発症の有意なリスク因子であった (表 2)。潰瘍発症例のうち GNRI の推移を検討可能であった 53 例では、潰瘍発症時の GNRI (91.15 ± 1.56) はそれ以前の値 (93.99 ± 1.99) に比べ有意に低下していた ($p < 0.01$)。

表1. NSAIDs潰瘍発症に関わる背景因子 (n=1085)

	p	オッズ比	95%信頼区間
性別	N.S.		
プロトンポンプ阻害薬	<0.01	0.33	0.15 - 0.75
プロスタグランジン製剤	0.021	0.30	0.11 - 0.83
H2受容体拮抗薬	N.S.		
粘膜防御剤	N.S.		
COX-2選択的阻害薬	N.S.		
抗血小板薬	<0.01	3.06	1.76 - 5.32

表2. 中等度の栄養障害 (GNRI<92)を低栄養とした場合のNSAIDs潰瘍発症リスク (n=614)

	p	オッズ比	95%信頼区間
低栄養 (GNRI<92)	<0.01	3.85	2.22 - 6.68

b) 偽膜性腸炎 (北川)

2010年8月より2013年10月31日までの間に、CDトキシンが陽性であった65例の背景因子を解析した。64例(98.5%)の症例で何らかの基礎疾患を有していた。ADLの指標であるBarthel IndexおよびPNI、GNRIによる栄養評価は、いずれも正常値に比べ低値であった。

次に、同一の注射用抗生剤が2週間以上投与された症例77例を解析した。下痢症状等でCDトキシン検査が施行された症例は22例で、そのうち陽性例は6例であった。抗生剤長期投与後でも下痢症状のなかった症例のうち、年齢性別をマッチングさせた12例をCD toxin陽性群と比較した。GNRIには差が見られなかったが、陽性例でADLの指標であるBarthel Indexが有意に低値であった(表3)。

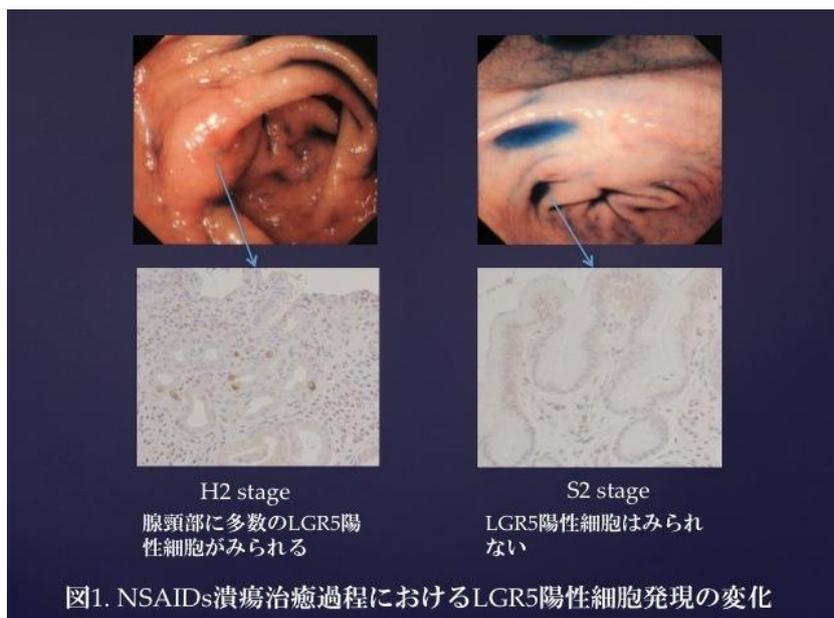
表3. CD Toxin陽性例と無症状例(マッチング例)の比較

	CD Toxin陽性例 (n=6)		無症状例 (n=12)		p
	平均±標準偏差	中央値	平均±標準偏差	中央値	
Barthel Index	24.2 ± 31.8	12.5	68.3 ± 32.5	70	0.02
BMI	17.6 ± 3.4	16.4	20.2 ± 3.8	20.6	N.S.
PNI	34.1 ± 6.6	34.1	36.0 ± 8.5	39.0	N.S.
GNRI	74.8 ± 9.0	78.9	80.7 ± 15.3	87.6	N.S.

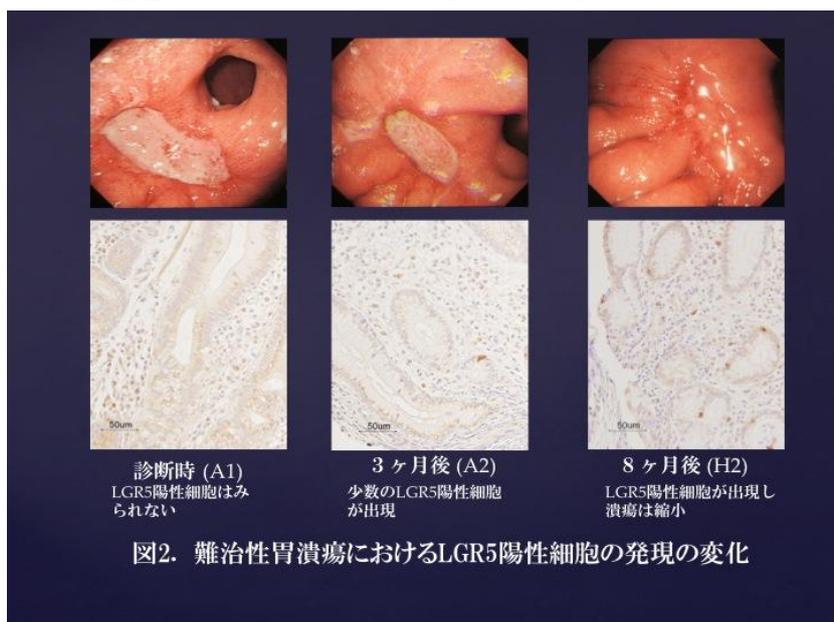
2) 高齢者の消化器臓器における組織再生分子機構の解析

a) 胃粘膜組織における検討 (京兼)

胃潰瘍患者の潰瘍辺縁部から採取した生検組織 44 例（77 病変）を対象とし、既に下部消化管において組織幹細胞マーカーとして同定されている LGR5 の発現や局在を免疫組織学的染色により検討した。同一患者の内視鏡的正常粘膜からの生検組織を対照群とした。LGR5 陽性細胞は、内視鏡的正常粘膜ではほとんどみられないが、潰瘍辺縁部の腺頸部付近で発現が増強していた。経時的に潰瘍治癒課程を観察した 16 例において、潰瘍治癒に伴い陽性細胞が減少する傾向が見られた（図 1）。観察時に潰瘍と潰瘍瘢痕が混在した症例では、潰瘍の辺縁に LGR5 陽性細胞の発現が見られたが、瘢痕部ではみられなかった。



難治性潰瘍の 2 例では診断時および治療初期には LGR5 陽性細胞は潰瘍辺縁部にほとんど見られないが、長期経過のうちに LGR5 陽性細胞が出現し潰瘍は治癒した（図 2）。



b) 膵組織における検討 (京兼、新飯田)

膵臓組織における組織再生分子機構の解明する目的で、疾患治療のため切除された正常膵臓組織 5 例および高齢者慢性膵炎 3 例の組織を用い、Zscan4 の発現パターンを解析した。正常膵臓組織では、膵導管細胞及び腺房細胞に極めて少数の Zscan4 が発現していた。更に、外分泌だけではなく、内分泌細胞にも Zscan4+細胞が広く分布していたが、その数は極めて少数であった。これらの Zscan4 陽性細胞は、これまで他の臓器で同定されている LGR5 や BMI1 などの幹細胞マーカーと共局在していた。慢性膵炎組織では炎症の部位で正常膵臓組織に比べ Zscan4 陽性細胞の数が有意に増加していた。

平成 26 年度について

まず、胃潰瘍患者の癒痕を含む潰瘍病変部位からの生検組織 (n=64) で LGR5 の発現の有無と Ki-67 LI との関連を検討した。病変部位に LGR5 が陽性の症例は陰性症例に比べ有意に Ki-67 LI が高値であった (陽性例 n=38 : 44.99 ± 12.98 、陰性例 n=26 : 24.01 ± 6.29 、 $p < 0.01$)。

次に、病変部と内視鏡的正常粘膜 (対照群) を同時に評価可能であった 30 病変で、LGR5 の発現と Ki-67 LI の関連を検討した。病変部に LGR5 が発現していた症例 (n=19) では対照群に比べ有意に Ki-67 LI が高値であった ($p < 0.01$) が、LGR5 が発現していない症例 (n=11) では対照群との間に有意な差は認めなかった (図 3)。

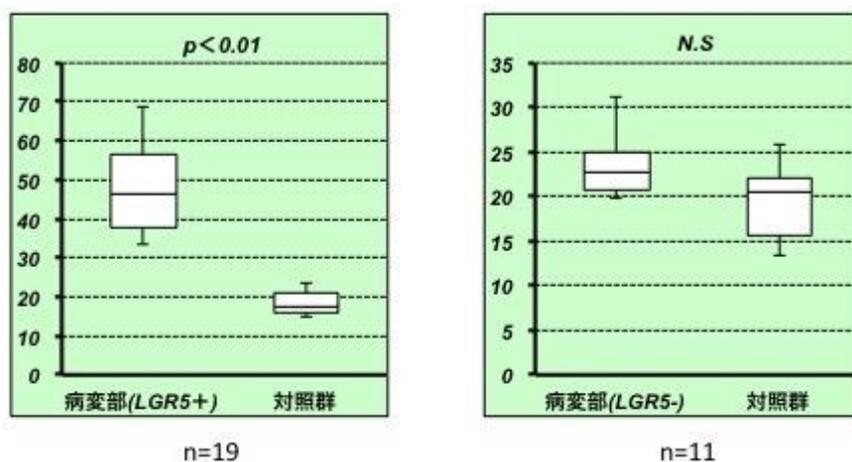


図3. 病変部(LGR5陽性、陰性)と対照群のKi-67 LIの比較

D. 考察と結論

本研究では高齢者の薬剤性消化管障害として NSAIDs 潰瘍および偽膜性腸炎に着目し、こ

これらの疾患の発症と栄養状態との関連につき検討を行った。

NSAIDs 潰瘍発症例では、薬剤投与開始時の GNRI 値が非発症例に比べ有意に低値であり、中等度以上の栄養障害がある症例 (GNRI < 92) は高齢者の NSAIDs 潰瘍発症の危険因子であると考えられた。また、高齢者の NSAIDs 潰瘍は症状に乏しいことが知られているが、薬剤投与中の栄養状態の悪化は潰瘍発症を疑う指標になりうることが示唆された。

偽膜性腸炎の検討では、ADL 低下症例で発症しやすいことが推測された。発症症例では栄養状態の指標は低値であったが有意差は見られていない。これは症例数が少なく有意差が出なかった可能性があり、引き続き検討が必要である。

今回の検討から、栄養状態や ADL の悪い高齢者に NSAIDs や抗生物質を投与する場合には、薬剤性消化管障害を発症する可能性が高いことが予測され、これらの薬剤の長期投与の際には十分な観察を行うとともに、あらかじめ効果的な予防策を講じる必要があると考えられる。

次に、胃、膵組織を用い幹細胞マーカーによる免疫組織学的染色により、組織障害時の修復機構の検討を行った。胃潰瘍での検討では、LGR5 陽性細胞は潰瘍辺縁部に発現が誘導され組織修復後に発現が減弱すること、LGR5 の発現は細胞増殖と関連することが確認された。これらの結果から、下部消化管で組織幹細胞として同定されている LGR5 陽性細胞は胃粘膜においても組織幹細胞であり、組織障害時に発現が誘導され組織修復に関与していることが推定された。また、膵組織での検討では、Zscan4 陽性細胞は成人膵における組織幹細胞であること、炎症により発現が誘導されることが推測され、高齢者の膵組織でも組織再生維持機構が存在する可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成 24 年度

1) Ko SB, Kyokane K, et al

Molecular mechanisms of pancreatic stone formation in chronic pancreatitis.
Front Physiol. 2012;3:415.

平成 25 年度

1) Ko SB, Kyokane K, Niida S, et. al

Inflammation increases cells expressing ZSCAN4 and progenitor-cell makers in the adult pancreas. Am J Physiol. 2013 Jun;304(12):G1103-16

2. 学会発表

平成24年度

1) 洪 繁、松浦俊博、京兼和宏、山田 理

慢性膵炎における消化管幹細胞マーカーLGR5陽性細胞の発現
第43回膵臓学会大会、2012.6.28-29、山形

2) 京兼和宏、山田 理、松浦俊博

高齢者の内視鏡的止血術の現況および出血に伴う合併症について
第20回JDDW2012,2012.10.10-13、神戸国際会議場 神戸市

平成25年度

1) Yuichi Kitagawa. MALNUTRITION, POSSIBLY FRAIL PATIENTS HAS RISK OF CLOSTRIDIUM
DIFFICILE ASSOCIATED DIARRHEA (CDAD) INFECTION. International
Conference on Frailty & Sarcopenia Research (ICFSR) 2014.3.12

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし