

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10170

研究課題名(和文)胎生期の子宮内炎症が胎児早産児の副腎機能に与える影響の解析

研究課題名(英文)Analysis of the influence of intrauterine inflammation to adrenal function in preterm fetal infants

研究代表者

北西 龍太(Kitanishi, Ryuta)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20436116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中期において子宮内炎症が胎児のコルチゾル分泌能に与える影響を解析した。対照群9例と炎症群11例のヒツジ胎児にCRH負荷試験を実施した。CRH負荷に対するACTHの経時的変化は、対照群と炎症群に有意差はなかった($p=0.209$)。一方コルチゾルの血中濃度は有意に上昇した($p=0.016$)。現在その機序の解明のため、副腎内のステロイド合成酵素の遺伝子発現量の変化を解析中である。

だが本研究結果にはコルチゾル産生への胎盤による制御が含まれる。よって胎盤内の11b-hydroxysteroid dehydrogenaseの遺伝子発現量の変化や血漿中コルチゾン値の推移を今後解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日の新生児医療において、極低出生体重児に発症する相対的副腎不全は脳虚血の遷延による深刻な脳白質損傷を誘導し、脳性麻痺や発達障害の原因となっている。その予防法の開発は周産期新生児医療の大きな課題である。本研究では胎児副腎機能の発達と出生への適応過程を明らかにするため、ヒツジ胎児を用いた子宮内炎症モデルを応用して、出生前の炎症性ストレスがコルチゾル分泌能に与える影響を検証した。今後の研究により、出生前の子宮内環境に応じた出生後のグルココルチコイド補充療法を提案し、極低出生体重児の合併症を減少させ、その長期予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The study was performed to analyze the influence of intrauterine inflammation to adrenocortical ability using chronically instrumented premature fetal sheep. The fetuses were divided into two groups; control ($n=9$) and inflammation groups ($n=11$). We carried out CRH loading test. There was no difference between the two groups in the change of ACTH concentration ($p=0.209$) over time, but a significant difference in the change of cortisol ($p=0.016$). We are currently analyzing changes in the gene expression level of steroid synthase in the adrenal gland to elucidate the mechanism.

However, placental control over cortisol production is added to the results of this study.

Therefore, we plan to analyze changes in the gene expression level of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase in the placenta, which converts cortisol to inactive cortisone, and changes in plasma cortisone levels.

研究分野：胎児生理学

キーワード：副腎 胎児 ヒツジ 子宮内炎症

1. 研究開始当初の背景

超低出生体重児ではその副腎皮質容積の **80%**以上を **3 β -hydroxysteroid dehydrogenase** 活性のない胎児層が占めるため、エストロゲン合成能は高いがコーチゾル分泌能に乏しく、潜在的に相対的副腎不全の状態にある。そのため出生後の急性期を経て **1-2** 週間を過ぎた頃に誘因なく、もしくは慢性肺疾患の増悪期と一致して、カテコラミン抵抗性の低血圧と乏尿に陥りやすい。本邦では晩期循環不全と呼ばれるこの病態はその本質が相対的副腎不全であるため、その大多数はグルココルチコイド補充によって速やかに症状が改善する。しかし、低血圧による脳虚血が遷延すれば深刻な脳白質損傷が誘導され脳性麻痺や発達障害の原因となるため、その予防法の開発は周産期新生児医療の大きな課題である。

一方、胎生期のどのような子宮内環境が胎児早産児の副腎機能の発達を促進もしくは抑制するのか、その病態生理の解析はまだ端緒についたばかりである。子宮内炎症が早産児の副腎機能を抑制する可能性が報告されているが、その具体的な抑制機構は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では胎児副腎機能の発達と出生への適応過程を明らかにするため、ヒツジ胎児を用いた子宮内炎症モデルを応用して、出生前の炎症性ストレスがコーチゾル分泌能に与える影響を明らかにする。これは成育限界で出生する早産児の内分泌学的な適応についての基礎研究であり、この成果を踏まえることによって、出生前の子宮内環境に応じた出生後のグルココルチコイド補充療法を、その病態生理に基づいて具体的に提案することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験センターの承認 (**2016 医動-294**) のもと東北大学医学部附属動物実験施設内において実施された。対象として妊娠期間が確定した **Suffolk** 種ヒツジの胎児を用いた。ヒツジの発情期が夏期であるため実験は **10~3** 月にかけて **4** 年間で合計 **20** 回行った。

(1) 慢性実験系の作成

妊娠 **91-97** 日に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎児の右腋窩動脈、腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置、心電図電極を固定した後、胎児を子宮内に戻して閉腹した。以後、胎児動脈圧、中心静脈圧、羊水内圧を連続監視して記録した。

(2) 子宮内炎症による壊死性臍帯炎の負荷

手術後 **48** 時間を経た胎児 (**n=20**) をランダムに **2** 群に分けた (対照群、炎症群)。炎症群には術後 **48** 時間から **5** 日間連日 **granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF; Neutrogin®)** **50** μ g/日を静注し、術後 **96** 時間に **1** 回だけ羊水腔内に **endotoxin (E. coli 055:B5) 20 mg** を注入して胎児に壊死性の臍帯炎を誘導した。対照群には **G-CSF** の代わりに生理食塩水を投与して、**endotoxin** を負荷しなかった。

(3) 胎児血漿中の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 測定

羊水内への **endotoxin** 注入前、注入 **12** 時間後、**24** 時間後、**72** 時間後における胎児血漿中 **MCP-1** 値を **Bovine CCL2 VetSet ELISA Development Kit (Mayflower Bioscience 社, St. Louis)** を用いて測定した。

(4) 子宮内炎症への曝露による胎児のコーチゾル分泌能の評価 (CRH 負荷試験)

全ての対象胎児に対して手術後 **7** 日 (負荷実験後) に **CRH** 負荷試験 (ヒツジ **CRH, 1.5** μ g/kg) を実施した。負荷前、**15, 30, 45, 60, 90, 120** 分後に採血し、**CRH** に対する **ACTH** とコーチゾルの反応性を **2** 群間で統計学的に比較した。

(5) RNA sequencing を利用した副腎における各種ステロイド合成酵素の遺伝子発現量解析

CRH 負荷試験を行ったあとに母獣を再度全身麻酔のうえ帝王切開術を行った。娩出された胎児を安楽死のうえ剖検に供し、胎児副腎を採取した。摘出された副腎はすみやかに液体窒素により急速冷凍され、**-80** で保管された。後日保管された副腎組織から、**RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN Sciences 社, Germantown)** を用いてトータル RNA を精製した。現在は次世代シーケンサーを用いた **RNA sequencing** を用いて、各種ステロイド合成酵素の遺伝子発現量を解析中である。

(6) 統計学的解析

対照群と炎症群のサイトカイン値における有意差の検定には **Mann-Whitney U-test** を用いた。また **CRH** 負荷試験における群間の有意差の検定には **Two-way Repeated measure ANOVA** を用いた。いずれも **p < 0.05** を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 対象の背景

4年間でヒツジ胎仔 20例 (対照群 9例, 炎症群 11例) を解析に用いた. 対象の基礎データを表 1 に示した. CRH 負荷試験を実施した妊娠日齢と体重に有意差を認めなかった. 数値データはいずれも「平均 ± 標準誤差」で示した.

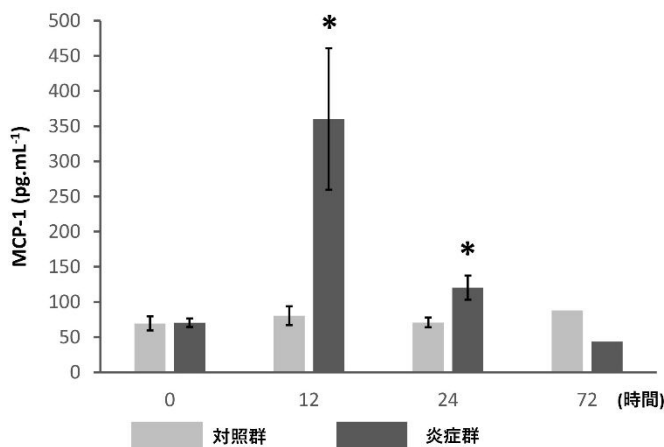
表 1. 対象の基礎データ

群 (例数)	対照群 (n=9)	炎症群 (n=11)	P 値
単胎/多胎	8/1	8/3	
雄/雌	4/5	4/7	
妊娠日齢	98.0 ± 0.8	97.1 ± 0.8	0.429
体重 (kg)	1.21 ± 0.10	1.13 ± 0.07	0.697

(2) endotoxin 注入後の胎仔血漿中の MCP-1 の経時的変化

羊水中への endotoxin 注入前, 注入 12 時間後, 24 時間後, 72 時間後の胎仔の血漿中の MCP-1 値の推移を図 1 に示した. 対照群と炎症群を比較すると, 注入後 12 時間と 24 時間において有意差が認められた ($p < 0.05$).

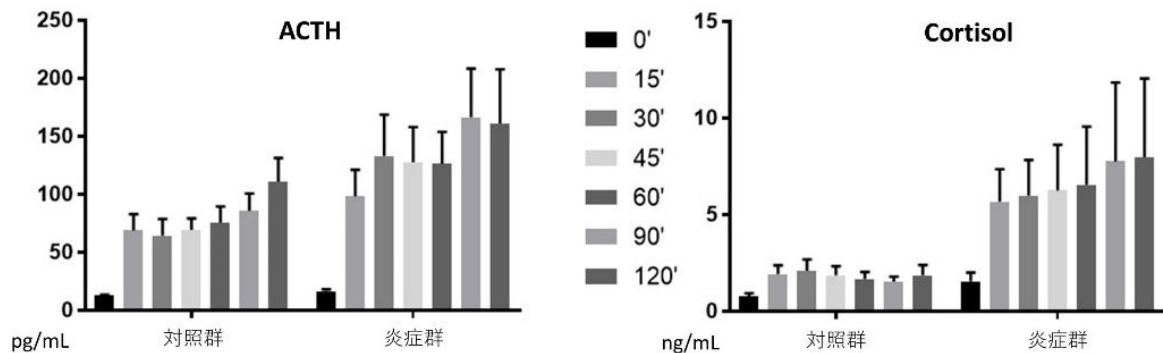
図 1. 胎仔血漿中の MCP-1 の経時的変化



(3) 子宮内炎症への曝露による胎仔のコルチゾル分泌能の評価 (CRH 負荷試験)

図 2 には CRH 負荷試験における ACTH とコルチゾルの経時的変化を示した. CRH 負荷に対する ACTH の経時的変化は, 対照群と炎症群に有意差を認めなかった ($p = 0.209$). 一方でコルチゾルは, 炎症群の方が CRH に対する反応が有意に強かった ($p = 0.016$).

図 2. CRH 負荷試験における ACTH およびコルチゾルの経時的変化



(4) 各種ステロイド合成酵素の遺伝子発現量解析

CRH 負荷に対する血漿中 ACTH 値の変化は対照群と炎症群において有意な差が見られない. 一方でコルチゾル値には有意差を認めたことから, 炎症群では副腎皮質内のステロイド合成酵

素の発現量が変化した可能性がある．そのため **RNA sequencing** を用いて，副腎内の各種ステロイド合成酵素の発現量の変化を解析中である．

以上の結果から子宮内炎症に曝された胎仔の副腎では，**ACTH** に対するコルチゾル分泌能が高くなることが予測された．現在その機序の解明のため，副腎内のステロイド合成酵素の遺伝子発現量の変化を解析中である．

ただし本研究はあくまで母獣の子宮内で実施された **CRH** 負荷試験であり，これらの研究結果には **CRH, ACTH** を介したコルチゾル産生に対する胎盤による制御が加味されている可能性がある．そのためコルチゾルを不活性型のコルチゾンへ変換する胎盤内の **11 β -hydroxysteroid dehydrogenase** の遺伝子発現量の違いや血漿中のコルチゾン値の推移を解析する必要がある．また出生した新生児のコルチゾル分泌能を推定するためには，胎盤からの影響を排除することができる人工子宮下での実験が有用かもしれない．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Usuda Haruo, Watanabe Shimpei, Miura Yuichiro, Saito Masatoshi, Musk Gabrielle C., Rittenschöber-Bohm Judith, Ikeda Hideyuki, Sato Shinichi, Hanita Takushi, Matsuda Tadashi, Jobe Alan H., Newnham John P., Stock Sarah J., Kemp Matthew W.	4. 巻 217
2. 論文標題 Successful maintenance of key physiological parameters in preterm lambs treated with ex-vivo uterine environment therapy for a period of 1 week	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Obstet Gynecol.	6. 最初と最後の頁 457.e1 ~ 457.e13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajog.2017.05.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Usuda Haruo, Watanabe Shimpei, Saito Masatoshi, Sato Shinichi, Musk Gabrielle C., Fee Ms Erin, Carter Sean, Kumagai Yusaku, Takahashi Tsukasa, Kawamura Mr Shinichi, Hanita Takushi, Kure Shigeo, Yaegashi Nobuo, Newnham John P., Kemp Matthew W.	4. 巻 221
2. 論文標題 Successful use of an artificial placenta to support extremely preterm ovine fetuses at the border of viability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 69.e1 ~ 69.e17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajog.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Usuda Haruo, Watanabe Shimpei, Saito Masatoshi, Ikeda Hideyuki, Koshinami Shota, Sato Shinichi, Musk Gabrielle C., Fee Erin, Carter Sean, Kumagai Yusaku, Takahashi Tsukasa, Takahashi Yuki, Kawamura Shinichi, Hanita Takushi, Kure Shigeo, Yaegashi Nobuo, Newnham John P., Kemp Matthew W.	4. 巻 223
2. 論文標題 Successful use of an artificial placenta-based life support system to treat extremely preterm ovine fetuses compromised by intrauterine inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 755.e1 ~ 755.e20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajog.2020.04.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 昌利 (Saito Masatoshi) (00451584)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	埴田 卓志 (Hanita Takushi) (30400360)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	松田 直 (Matsuda Tadashi) (50361100)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	渡邊 真平 (Watanabe Shimpei) (70509413)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	The University of Western Australia		