

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791119

研究課題名(和文) 晩期循環不全でのサイトカインを含むバイオマーカーと転写因子発現プロファイルの検討

研究課題名(英文) The analysis of serum cytokine and transcription factor level on the pathophysiology of late-onset circulatory collapse of extremely low birth infant

研究代表者

俣野 美雪 (MATANO, MIYUKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90458315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：晩期循環不全を発症した極低出生体重児6例と、発症しなかった極低出生体重児11例について、血清サイトカイン濃度と心血管バイオマーカー、核内転写因子発現およびシグナル伝達分子を測定した。対象群では晩期循環不全発症時のIL-8、TNF- α などの炎症性サイトカインが有意に高値を示し、治療開始後は経時的に低下した。NT-proBNPはいずれの群においても高値だったが、2群間での有意差はなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed cytokine and transcription factor levels in peripheral blood from 6 extremely low birth weight(ELBW) infants with late-onset circulatory collapse and those from 11 ELBW without late-onset circulatory collapse. We found that inflammatory cytokines (IL-8, TNF- α) were at higher level in the late-onset circulatory collapse group. In these group, Serum level of IL-8 and TNF- α decreased over time. NT-proBNP was higher level in the both group. But we can not find significant differences between both group.

研究分野：医歯薬学

キーワード：晩期循環不全 サイトカイン 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1)国内外の学術的背景

晩期循環不全は主に本邦で 2000 年代に入ってから報告されている早産児の疾患で、脳室周囲白質軟化症の新たな主因となっており (Fukuda S, Brain Dev 2008) 臨床上大変重要な疾患である。しかし、その原因、病態については多くの見解があり、未解明な部分が多く、今後の検討が待たれている。副腎不全の関与が示唆され、実際にステロイド投与により改善することが多いが、血中ステロイドは必ずしも低下していないことも知られている (Masumoto K, Pediatr Res 2008)。また循環不全の病態も循環血液量の減少が示唆されているものの (Fukuda S, Brain Dev 2008) その原因は不明である。

海外では早産児の副腎機能については、むしろ生後早期からの機能低下が問題視されており、この晩期循環不全に相当する病態についてはあまり報告がない。本疾患の原因として、何らかのストレスにより産生されるサイトカインの関与が予想されるが、いまのところ、その報告はない。また、循環不全の病態についても、超音波検査などの生理的検討は報告があるが、生化学的バイオマーカーの検討はなされていない。

(2)応募者の研究成果と着想

応募者の施設では、年間約 80 名の極低出生体重児を含む 400 名の新生児が入院するが、晩期循環不全を呈する早産児は決して稀でなく、年間 5 ~ 10 名程度が治療を要している。当 NICU は微量検体でも大量の情報解析が可能な suspension-array system を用いて、種々の早産児の病態解析を行っている。特にサイトカインプロファイルについては、臍帯血のサイトカインプロファイル (Takahashi, Cytokine, 2009) などを報告してきた。この Bio-rad 社の suspension array system は、血清 30 μ l で多項目のサイトカインが測定でき、現在は、ホルモンなどの分子や転写因子のプロファイルも解析可能となっている。そこで、応募者は、この system を用いて、晩期循環不全の症例において、サイトカイン、循環関連のバイオマーカーおよび転写因子プロファイルを検討することにより、晩期循環不全の病態を解析し、本疾患の治療や予防につなげられるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

晩期循環不全は 2000 年代に入り、本邦に広まった疾患で、副腎不全の関与が示唆されているものの、病態はいまだ不明である。コルチコステロイドの分泌は必ずしも大きく低下していないことから、原因として何らかのストレスの存在が考えられる。我々は、多くの微量検体を一度に測定できる suspension array system を用いて種々の新生児疾患でサイトカインプロファイルを解析し、多くの新生児の病態を検討してきた。そこで、今回、晩期循環不全の児のサイトカインおよび

NT-proBNP などの循環関連バイオマーカーのプロファイリングを行い、同時に炎症、ストレス反応に関わる転写因子を測定し、本疾患の病態を明らかにすることを目的として本研究を計画した。

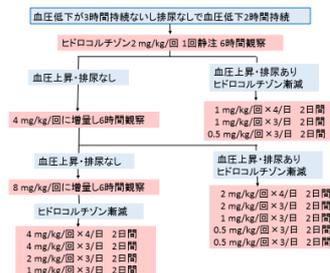
3. 研究の方法

(1)自治医科大学倫理委員会の承認を得て、いずれも患児の保護者に説明書を提示し同意書を取得し、児からの採血を行い解析を行った。

(2)自治医科大学総合周産期母子医療センター新生児集中治療部 (以下、当院 NICU) に入院した極低出生体重児の中から、晩期循環不全を発症しステロイド治療を行った症例 (対象群) および晩期循環不全の無かった症例 (比較対照群) を抽出し、検体を採取、測定を行った。

(3)当院での晩期循環不全に対するステロイド療法の適応と方法について表 1 に示す。

表 1 晩期循環不全症例に対する管理方針



(4)対照群については治療としてのステロイド投与前、投与後 1 日、2 日、14 日に採血を行い検体を採取した。検体は遠心分離し、血清と血球を保存し、これらの血清を用い 9 種類のサイトカインと心血管バイオマーカーを測定し、血球成分で転写因子発現解析を行い、それぞれ経時的変化を追った。その結果と臨床像と合わせて、病態解析した。比較対照群は、生後 1 週、2 週、4 週で採血を行い、比較対象とし、同様の検討を行った。

(5)サイトカイン測定: Bio-rad 社の Bio-plex system を用いて行った。測定キットとして millipore 社の human cardiovascular disease キットを用いた。9 種類のサイトカインとバイオマーカーの測定項目は IL-1b、IL-6、IL-8、MCP-1 などの 5 種類の炎症性サイトカインと 2 種類のケモカインおよび VEGF、NT-proBNP を測定した。

(6)転写因子発現: 測定機器は上記の Bio-plex system である。測定キットとして当初、Pnomic 社の Procarta Transcription Factor Plex Kit を用いる予定であったが、製品が製造中止となったため Bio-rad 社の cell signaling phosphoprotein assay kit を用い、ATF2、ERK1/2、HSP、JNK、MEK1、NFkB、p38MAPK、Smad2 の 8 種類の転写因子およびシグナル伝達分子の発現を測定した。

4. 研究成果

(1) 晩期循環不全症例 6 例からのべ 42 検体、比較対象群 11 例からのべ 33 検体を採取し、測定を行った。

(2) 各群の周産期因子を表 2 に示す。在胎週数、出生体重は各群に有意差はなく、その他の周産期因子にも各群間に有意差はなかった。絨毛膜羊膜炎の有無が比較対照群に比し対象群が有意に多かった。

表 2 各群の周産期因子

	対象群 (n=6)	比較対照群 (n=11)	P値
在胎週数(週)	25.6±2.3 (23-29)	29.9±2.2 (26-32)	0.99
出生体重(g)	754.8±270 (583-1292)	1157.2±275 (697-1562)	0.99
SFD	1(16.6%)	5(45.4%)	0.23
男児	4(66.6%)	8(72.7%)	0.79
Apgar1 分値	4.5±2.2 (2-8)	5.1±2.5 (1-8)	0.7
多胎, n (%)	1(16.6%)	4(18.1%)	0.93
母体ステロイド, n (%)	4(66.6%)	6(54.5%)	0.62
CAM, n (%)	4(66.6%)	2(18.1%)	0.04

(3) 各群の入院後の合併症を表 3 に示す。慢性肺疾患と甲状腺機能低下症は比較対照群群と比し対象群で有意に合併が多かった。甲状腺ホルモン補充によりステロイド代謝の亢進が促進され、ステロイドの相対的欠乏に陥り晩期循環不全をきたすとの報告があるが、今回、甲状腺機能低下症を発症した 2 例は、いずれも、晩期循環不全発症後にホルモン補充を開始されていた。

表 3 入院後合併症

	対象群 (n=6)	比較対照群 (n=11)	P値
慢性肺疾患	5(83.3%)	4(36.3%)	0.06
呼吸窘迫症候群	5(83.3%)	5(45.4%)	0.12
脳室内出血	0(0%)	0(0%)	1
動脈管閉存症	2(33%)	3(27%)	0.79
未熟児網膜症	1(16%)	0(0%)	0.16
脳室周囲白質軟化症	1(16.6%)	0(0%)	0.16
壊死性脳炎	0(0%)	0(0%)	1
甲状腺機能低下症	2(33.3%)	0(0%)	0.04

(4) 臨床像

対象群の臨床像について表 4 に示す。

表 4 対照群臨床像

	症例①	症例②	症例③	症例④	症例⑤	症例⑥	
BW(g)	589	697	1292	748	620	583	
GAI(週)	28	24	29	25	25	23	
晩期循環不全 発症週数(週)	31	26	32	27	31	25	
ステロイド投与期間(日)	13	16	9	33	11	23	
ステロイド最大投与量 (mg/kg/dose)	2	2	2	2	4	4	
発症時	ACTH (pg/ml)	56.1	23.9	62.8	17.9	32.2	12.2
	Cortisol (μg/dl)	13.8	6.9	13.8	5.5	4.4	2.4
再燃の有無	○	○	×	○	×	○	
PVLの合併	×	×	○	×	×	×	

晩期循環不全発症日齢はいずれも生後 2 週間から 1 カ月だった。1 例のみ日齢 43 と生後遅くに発症した例があった。ステロイド投与期間は 10 日前後であり、もっとも長期に投与したものは 33 日間だった。発症時の ACTH、Cortisol の測定を行ったが、4 例は Cortisol の低下を認めたが、2 例は Cortisol の低下は認めなかった。6 例中 5 例で血圧低下や尿量低下などの循環不全の再燃を認めた。脳室周囲白質軟化症(PVL)の合併例は 6 例中 1 例だった。

(5) サイトカイン測定結果

晩期循環不全発症時の対象群のサイトカイン血中濃度と比較対照群の生後 2 週でのサイトカイン血中濃度との比較を表 5 に示す。

表 5 晩期循環不全発症時のサイトカイン血中濃度

	対象群 (n=6)	比較対照群 (n=10)	P値
IL-1β (pg/ml)	0.65±0.25	0.55±0.27	0.4
IL-6 (pg/ml)	22.7±12.4	19.4±5.2	0.37
IL-8 (pg/ml)	193.4±131.7	85.0±26.2	0.04
IL-10 (pg/ml)	122.7±47.2	73.5±25.8	0.08
IFN-γ (pg/ml)	4.6±1.9	4.4±3.9	0.46
TNF-α (pg/ml)	66.9±14.2	29.9±10.8	0.006
MCP-1(MCAF) (pg/ml)	717.9±201.3	724.6±187.7	0.52
VEGF (pg/ml)	460.0±337.2	369.9±209.5	0.29
NT-proBNP (pg/ml)	509.4±270.6	577.2±219.3	0.52
検体採取日齢(日)	20.3±11.6	13.8±1.2	0.12

IL-8、TNF-α は対照群において比較対照群と比較して有意に高値だった。IL-10 は有意差はなかったが、対照群において比較対照群と比較して高値の傾向があった。IL-8、TNF-α、IL-10 はいずれも、治療開始後、経時的に低下した。NT-proBNP はいずれの群においても高値だったが、2 群間で有意差はなかった。

(6) 転写因子発現

各群ともに晩期循環不全の発症時の転写因子発現に有意差はなかった。

(7) 考察

過去の報告でも晩期循環不全と慢性肺疾患、絨毛膜羊膜炎などの炎症が関連していることがいわれている。今回の検討でも、晩期循環不全発症時に炎症に関わるサイトカインである IL-8、TNF-α が上昇しており、抑制性のサイトカインである IL-10 が高値の傾向だった。高値だったサイトカインは治療開始後、低下傾向だったことから、晩期循環不全発症の機序に炎症性サイトカインが関与した可能性が示唆された。

NT-proBNP は BNP 前駆体から BNP とともに切り離される生理的非活性ペプチドであり、心臓の容量不可に反応し分泌される。晩期循環

不全の血行動態は容量負荷というより、末梢血管拡張、血管透過性亢進による相対的な血管内 volume 不足であり、NT-proBNP は対象群と比較対照群との間で有意な差は認められなかった。

Ellison らは極低出生体重児の脳室白質軟化症を発症した群は髄液中の IL-6、IL-10、および TNF- α が有意に高値であったと報告している。今回の検討では、脳室周囲白質軟化症発症例において他の症例と比較し IL-10 は高値だったが、炎症性のサイトカインは他の症例と比較し上昇は認めなかった。今回の検討では脳室周囲白質軟化症発症例は 1 例と少なかったため、今後、症例数を増やして検討する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

俣野美雪、矢田ゆかり、小池泰敬、鈴木由芽、下澤弘憲、河野由美
晩期循環不全を発症した極低出生体重児の血中サイトカイン濃度の検討
第 60 回日本新生児成育医学会、2015 年 10 月 24 日、岩手

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俣野 美雪 (MATANO MIYUKI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：90458315

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：