

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462711

研究課題名(和文) 壊死性腸炎発症における サイトカインストームの 病態解明と治療戦略

研究課題名(英文) Pathogenesis of cytokine storm in necrotizing enterocolitis develop a treatment strategy

研究代表者

窪田 昭男 (Kubota, Akio)

和歌山県立医科大学・医学部・特命教授

研究者番号：10161671

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)：新生児壊死性腸炎(NEC)は、新生児期に発症する重篤な疾患である。その発症機序はまだ不明な点が多いが、今回その発症機序としてサイトカインストームの影響があるのではと考えた。子宮内胎児発育遅延モデルマウスを作製し、これに腸管ループ起炎試験を行い、NECに準ずる病態を作製した。このマウスの炎症性サイトカインの血中濃度を測定することで、NECにおけるサイトカインの影響・病態を確認することを目指したが、成熟マウスと比較して有意な炎症性サイトカインの上昇を確認できなかった。より簡便なモデルとして、NECに近い細胞株を作製した。今後のNECの研究に利用できるものと考えた。

研究成果の概要(英文)：Necrotizing enterocolitis(NEC) is a fetal inflammatory disease of premature infant. Although the pathogenesis is still unclear, we thought that the cytokine storm played an important role in etiology of NEC. We made a NEC model mice using Intrauterine growth restriction (IUGR) model mice with Intestinal loop causative test. We try to appear the role of inflammatory cytokines in NEC by measuring the blood cytokine levels in those mice. But It failed to reveal a significant elevation of inflammatory cytokines in NEC model mice. We made a NEC model cell line as simple model. I thought that it could be useful for future research of NEC etiology and treatment

研究分野：新生児外科学

キーワード：新生児壊死性腸炎 サイトカインストーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児外科疾患の死亡率は、医学の発展に伴い多くの疾患で経年的に低下してきた。しかし、その中でも消化管穿孔は 1993 年以降に上昇に転じ、先天性横隔膜ヘルニア、臍帯ヘルニアと並んで、最も予後不良な新生児外科疾患のひとつとなっている。また新生児消化管穿孔の中でも、新生児壊死性腸炎(NEC)は特に予後不良で、最近の集計でも死亡率は 68% にのぼると報告されている。そのためこれまでもその病因解明のため多くの研究がなされてきた。NEC は従来、未熟な腸管内の細菌叢の異常が重要視されてきた。実際、NICU における整腸剤などの予防投与が、その発症率と重症度を下げたと報告されている。しかし近年、経腸栄養が確立した後に消化管の前駆症状を伴わないで、極めて急速かつ広範囲に発症・進行する NEC 症例を経験するようになった。これは、細菌叢の異常のみならず、何かしらの血行性の mediator が関与しているものと考えられた。

一方我々の研究でも、NEC 症例の中に、穿孔に続く静脈栄養後の経腸栄養再開に耐えられない症例がある。これらは高度な線維化を伴う肝細胞壊死と偽性胆管の増生を伴うことが示された。これらの変化は、満期産児の静脈栄養に伴う胆汁鬱滞を特徴とする肝障害と大きく異なり、高度の肝細胞壊死を中心とするこの肝障害には、血行性 mediator の関与が強く示唆される。

近年、母乳中の抗炎症サイトカイン IL-10 の濃度が NEC を起こした新生児では対照児に比べて有意に低いという報告や、臍帯血の炎症性サイトカイン IL-6 の濃度が、NEC あるいは SIRS を起こした新生児では対照児に比べて有意に高いという報告がある。これらから、NEC の発症あるいは進行には、血行性 mediator が関与していることが強く示唆されている。

これは、従来 NEC の病因として考えられていた、胎児免疫の未熟性とは異なり、低出生体重児における免疫反応が、腸管細菌叢形成時における弱い炎症に対し過剰反応を起こし、一種のサイトカインストームを引き起こして発症させている可能性があることを示している。また、これらから従来行われている probiotics, prebiotics といった予防法、治療法に加え、抗サイトカイン抗体という新たな治療のアプローチが考えられる。

(2) 近年、前述した NEC 発症機序に加え、自然免疫に關与する Toll-like receptor4 (TLR4) が、NEC の発症に關与しているとの報告が散見される。TLR4 はグラム陰性桿菌が破壊された際に発生する lipopolysaccharide (LPS) の受容体で、その後の炎症反応を惹起するものとされる。TLR4 は胎児の発生過程においても重要な働きをしていることから、胎児腸管にはこの

TLR4 が多く発現していると考えられている。NEC は主に極・超低出生体重児に発生することから、胎児に近い低出生体重児における NEC の発現に關与しているものと考えられている。

2. 研究の目的

(1) NEC の発症機序におけるサイトカインストームの意義および關連性について検討し、今までとは異なる視点からの NEC の病態解明を目指す。また現在臨床ですでに使用されている抗サイトカイン抗体を使用し、即実現可能な新規治療法の開発を目指すことを目的とする。

(2) 今後の NEC 研究における簡便な研究材料としての、細胞株を作製する。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子を用いた胎盤機能不全マウスの作成および子宮内胎児発育遅延 (IUGR) モデルマウスの作成

NEC 発症の背景として、胎盤機能不全に伴うストレスが、胎児における細菌感染に対する IL-6 などの炎症性サイトカインの過剰発現を誘発しているものと考えた。nSP70 と呼ばれる直径 70nm の非結晶シリカを胎盤が形成され安定期に入った妊娠 16 日目のマウスの尾静脈に注射し、胎盤血流を低下せしめ、胎盤機能不全マウスを作成した。その後妊娠 18 日目にマウスを取り出し、このマウスが、上記処置を行わないコントロールマウスと比べ胎仔重量が低いことを確認し、IUGR モデルマウスとして使用した。またそれぞれの群において、出生時の IL-6 および TNF を測定し、胎児期のストレスがどのように炎症性サイトカインの発現に作用しているか確認した。

(2) 腸管結紮ループ起炎試験

胎生 18 日目の IUGR モデルマウス、および成熟新生仔マウスを用いて行った。それぞれリドカインにて局所麻酔した後、開腹し腸管を 1cm ほどに結紮し内部に LPS を 5 μ g 注入した。LPS 投与後、6 時間から 8 時間経過し生存しているマウスの消化管ループを摘出し、凍結処理を行った。凍結資料をホモゲナイザーにて細分粉碎し、SV total RNA Isolation System を使用し RNA を抽出した。PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis kit を使用し cDNA を合成した。合成された cDNA にて real-time RT-PCR を行い、炎症性サイトカインの発現量を測定した。

(3) 抗 IL-6 抗体、抗 TNF 抗体の投与

IUGR モデルマウスに、抗 IL-6 抗体：ヒト化したものは関節リウマチの治療に使用されている (トリシズマブ)、抗 TNF 抗体：マウスとのキメラ抗体は炎症性腸疾患の治療に使用されている (インフリキシマブ) をそれ

ぞれ 0.1mg 腹腔内投与し、2 時間後開腹して腸管結紮ループ起炎試験を行い LPS 投与した。また同時に抗 IL-6 抗体、抗 TNF 抗体を投与しない群を作成した。それぞれの腸管を採取し、一部分は凍結処理を行い、RNA を抽出、cDNA を合成し RT-PCR にて炎症性サイトカインの発現量を測定した。また残りの組織をホルマリン固定し、組織学的に炎症を抑制できたかの比較検討を試みた。

(4) ヒト胎盤病理と胎児臍帯血中サイトカインの相関

当施設倫理委員会の承認を得た後、同意を得られた当院分娩の新生児臍帯血と胎盤を用いて、胎盤の炎症と胎児臍帯血中のサイトカインの相関を調べた。

(5) NEC モデルとしての細胞株の作製

後述するように、(1)～(4)までの上記研究方法では結果的に十分な成果が出なかったため、追加実験として NEC モデルとしての細胞株の作製を行った。腸管由来細胞株に、血小板活性化因子 (PAF) を作用させると、TLR4 の発現が誘導されるとの報告がある。これに準じ、ヒト胎児腸管由来の細胞株である INT407 においても同様の効果があるか確認した。

INT407 を培養し、その過程で PAF $5\mu\text{M}$ を作用させ、20 時間後に上清を採取した。上清から mRNA を採取し cDNA を合成、RT-PCR にて TLR4 の発現の有無を確認した。また PAF にて TLR4 の発現を誘導した後に大腸菌由来の LPS を投与し、炎症性サイトカイン (今回は IL-8 を選択) の上昇を RT-PCR および ELISA 法にて確認した。

4. 研究成果

(1) 胎盤機能不全マウスおよび IUGR モデルマウスの作成

nSP70 を尾静脈より注射した後、妊娠マウスより在胎 18 日目のマウスを取り出す際に合わせて胎盤も摘出した。それにより、nSP70 の胎盤への集積が確認され、胎盤機能の低下を引き起こすことが確認された。またその際に取り出されたマウスは、成熟仔マウスと比べ優位に重量が小さいことが確認された。これを IUGR モデルマウスとして使用したが、重量が極めて小さく、また生存率が不良なため操作に難渋した。

腸管ループ起炎試験の前に、在胎中の胎盤機能不全がストレスの程度を IL-6 および TNF の測定で評価した。IUGR モデルマウスにおいて、成熟仔マウスと比べ有意に炎症性サイトカインが高く発現していることが確認された。

(2) 腸管ループ起炎試験

IUGR モデルマウスおよび成熟仔マウスそれぞれに腸管ループ起炎試験を行った。成熟仔

マウスにおいては、腸管ループ起炎試験を行わないものと比較して炎症性サイトカインの上昇を確認できたが、IUGR モデルマウスは極めて重量が小さく、ループ試験の操作でほとんどのマウスが死亡し、検体の採取が困難であった。また数少ない検体から測定したもので、不安定な測定結果しか得られず、腸管ループ試験を行わない IUGR モデルマウスと比べ、LPS によるストレスでの炎症性サイトカインの高発現は確認できなかった。今回サイトカイン高発現マウスを、NEC のモデルマウスとすることを試みたが、結果的にうまく作製できなかった。しかし今回の明らかにできなかった NEC 発現における炎症性サイトカインの関与については、手技的な問題が多く、実際の炎症性サイトカインの発現の関与については否定されたものではないと考えられる。背景からも、やはりサイトカインストームの関与の可能性が十分あると考えられ、別の研究デザインからのアプローチが望まれる。

(3) 抗 IL-6 抗体、抗 TNF 抗体の投与
腸管ループ起炎試験の時と合わせて抗 IL-6 抗体および抗 TNF 抗体の投与も行ったが、前述と同様に、死亡率が高く、十分な検体量を確保できず、有意な治療効果は同定できなかった。

(4) ヒト胎盤病理と胎児臍帯血中サイトカインの相関

同意を得られた当院分娩新生児臍帯血と胎盤を提供してもらい、胎盤の炎症と胎児臍帯血中のサイトカインの相関を調べた。臍帯血より採取した血清から、炎症性サイトカイン (IL-6、TNF) の mRNA を RT-PCR で測定した。この結果と胎盤炎症の程度とを比較検討したところ、0- 度のもものと比較し、 - 度のものでサイトカインが上昇している傾向が見られたが、得られた検体数が少なく、有意差を確認できなかった。

(5) NEC モデルとしての細胞株の作製

INT407 に PAF $5\mu\text{M}$ を作用させたのち、上清を採取し RT-PCR にて測定すると、非作用群に比較して有意に TLR4 が発現していることが確認された。他の濃度でも比較したが濃度依存的な発現の上昇は見られず、PAF の濃度は $5\mu\text{M}$ でよいと考えられた。これにより、実際の胎児腸管に近い細胞株を作製することができた。これに大腸菌由来の LPS を作用させると、炎症性サイトカイン (IL-8) が有意に上昇することが確認された。NEC と同様の炎症を細胞レベルで惹起させることができた。これで、*in vitro* での NEC モデルの細胞株を作製することができた。NEC における治療薬の開発において可能性が考えられる物質・薬剤の導入としての研究材料として、今後有効に利用できる可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

窪田 昭男 (KUBOTA, Akio)
和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教授
研究者番号：10161671

(2)研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE, Hiroki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20191190

三谷 泰之 (MITANI, Yasuyuki)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：40612106

柳原 格 (YANAGIHARA, Itaru)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
母子センター (研究所)・その他部局等・
免疫部門部長
研究者番号：60314415