

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10067

研究課題名(和文) 小児重症心臓・肺疾患におけるストレス応答の評価と新規治療法・予防法の開発

研究課題名(英文) Stress response evaluation and novel therapy development in advanced cardiac and pulmonary diseases in children

研究代表者

塚原 宏一 (TSUKAHARA, Hirokazu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90207340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：岡山大学病院の高度な研究力と分析技術を背景にして臨床研究およびトランスレーション研究を行いながら、血管内皮機能、酸化・ニトロ化ストレス(レドックス制御)、一酸化窒素(NO)生成、レドックス制御と密接なアルギニン代謝を綿密に評価することで、小児心臓・肺領域の危急・難治疾患の適正管理の方向付けと新規の効果的治療法・予防法の開発を目指した研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果に基づいてさらに知見を深めることによって、小児心臓・肺領域の急速進行性病態では進行抑制、完全治癒、慢性遷延性病態では寛解導入、合併症抑止が導かれ、ひいては、患児の日常生活、学校生活、将来生活を含めたQuality of Life(QOL)を向上させる方略が開発されることが期待された。さらに、小児医療の質の向上と医療費の節減に貢献することも期待された。

研究成果の概要(英文)：We performed clinical and translation studies related to advanced cardiac and pulmonary pathologies on the high-class clinical and experimental research backgrounds in Okayama University Hospital. Especially, we took special attention to vascular endothelial function/dysfunction, oxidative/nitrosative stress (redox regulation/dysregulation), nitric oxide production and arginine metabolism in the present work. Thus, we sought to develop adequate management strategies and novel therapeutic approaches for advanced cardiac and pulmonary diseases in children.

研究分野：ストレス応答学

キーワード：アルギニン代謝 一酸化窒素 川崎病 血管内皮機能 酸化ストレス シトリン欠損症 生体マーカー  
レドックス制御

## 1. 研究開始当初の背景

近年、危急・難治の病態、疾患の管理においては基礎病態による障害作用だけでなく、それにより攪乱された「生体応答」による有害作用を制御することも重要と考えられるようになった。このような方策により、急速進行性病態では進行抑制、完全治癒、慢性遷延性病態では寛解導入、合併症抑止も期待されるようになった(参考文献:「レドックス UPDATE - ストレス制御の臨床医学・健康科学」2015)。

小児科(小児循環器科を含む)においては、先天性心疾患、炎症性疾患、肺高血圧症を有する患者で心肺機能が急性増悪して、あるいは慢性遷延化して多臓器障害を起こし、生命予後、機能予後が不良の事態に至ることが少なくない(参考文献: Husain-Syed F, et al.

Cardio-pulmonary-renal interactions. J Am Coll Cardiol 2015)。早期のうちに、増悪や予後を判定できる特異的「生体マーカー」が設定され、それらが簡便に計測できるならば、患児の管理もテイラーメイドで侵襲度の低いものになり、その機能予後も改善し、医療資源の適正配分(外来通院 or 入院加療、通常入院 or 集中管理の的確な見極め)も可能になると期待される。

岡山大学病院小児科は全重症領域をカバーした小児医療を実践し、中国四国の拠点病院の1つとして機能している。研究面では、「生体応答」において本質的な血管内皮機能保持・再生、レドックス制御、NO生成、レドックス制御と密接なアルギニン代謝に関連する生体マーカーの研究を精力的に行っている。最近、心臓組織幹細胞を用いた左心低形成症候群患児への再生医療で顕著な成果を挙げている。

本申請者(塚原)は、上記領域の臨床研究および基礎研究の成果によって、2005年に太田敬三記念賞、2007年に小児医学川野賞(小児基礎医学研究)、2012年に日本小児科学会学術研究賞を受賞した。また、2014年出版の「Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice: Studies on Pediatric Disorders (Springer社)」のChief Editor、2015年の「レドックス UPDATE - ストレス制御の臨床医学・健康科学」のEditorを務めた。

## 2. 研究の目的

上記疾患へのこれまでの薬物治療(例: アンジオテンシン阻害薬、エンドテリン阻害薬、ホスホジエステラーゼ阻害薬、利尿薬、血管拡張薬、強心薬)は、心機能低下、後負荷上昇、前負荷過不足、組織灌流障害、静脈血流うっ滞の改善を目指すものである。

本申請者は、さらなる補助療法(adjunctive therapy)の開発が必要であると考えている。このような患者においては、血管内皮機能、酸化・ニトロ化ストレス(レドックス制御)

アルギニン代謝が原病あるいは合併症によって障害を受けており、その病態生理の解明と継続的な数値評価が新たな治療方略につながると考えられる(参考文献: Tham YK, et al.

Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure. Arch Toxicol 2015)。特に、再生医療については血管内皮機能保持、血管再生促進が必須である。そのための有力な方略の1つが生体マーカー計測である(参考文献: Pezzuto B, et al. Circulating biomarkers in pulmonary arterial hypertension. J Heart Lung Transplant 2015)。

## 3. 研究の方法

本研究では、少量の血液、尿検体を用いて上記 ~ の3群の「生体マーカー」を継続的に解析し、生化学的に臨床容態、代謝環境、治療効果、予後判定をプロファイリングする方策を追究した。本研究でkey pointsになる「生体マーカー」の計測、評価、応用の独創性と新規性を列挙する。

- ・低～非侵襲的に繰り返し検査できるので、特に小児医学・医療に適している。
- ・In vivoにて「生体応答」の観点より病因・病態を解析できるので、危急・難治疾患を生化学的に評価し、新しい疾患・病態を発見するのに役立つ。
- ・ヒト患者で長期に継続してモニターできるので、新規の効果的な治療法・予防法を開発するのに役立つ。
- ・動物モデルで同様の生体マーカーを計測して、ヒトでの結果と直接に比較検討できるので(マーカーを共用できる; サイトカインなどの蛋白の計測とは異なる“利点”である)ヒト患者で病因・病態をより深く理解すること、効果的治療法を開発することが容易である。

・患者体液で生体応答レベルを評価できる迅速キットが臨床応用されれば、入院加療、集中管理、ICU 収容の的確な見極めに役立ち、医療経済での費用対効果比を改善できる。

本研究では、このような独創性と新規性を生かして危急・難治の心疾患、肺疾患を対象に、また、動物モデルを用いたトランスレーション研究を行いながら、小児医学・医療分野で新しい研究領域を開拓したいと考えた。日本から世界への学術的提言を重視しながら、小児医療の質の向上と医療費の節減にも貢献したいと考えた。

#### 4. 研究成果

本研究の成果を以下に列挙する。

(1) 全身性血管炎の代表的疾患で、血管内皮障害、酸化ストレス亢進を特徴とする「川崎病」の発症に、新生児期の母乳摂取が抑止因子であること (Yorifuji T, et al. *Pediatrics* 2016)、乳児期の大気汚染曝露が危険因子であることを示した (Yorifuji T, et al. *J Pediatr* 2018)、「川崎病」発症に乳児期早期に受ける母体喫煙が危険因子であることも示した (Yorifuji T, et al. *Sci Total Environ* 2019)。

(2) 「川崎病」のBCG痕変化の病態学的意義を示した (Araki T, et al. *J Int Med Res* 2018)。

(3) エネルギー産生障害、肝障害、酸化ストレス亢進を特徴とする「シトリン欠損症」へのピルビン酸ナトリウム補充療法の生化学的有効性を示した (Nagasaka H, et al. *Mol Genet Metab* 2017)。「シトリン欠損症」における乳幼児期のアミノ酸代謝異常の詳細を示した (Miyazaki T, et al. *JIMD Rep* 2019)。

(4) 成長障害、酸化ストレス亢進を呈する不当軽量児 (SFD児) のコレステロール代謝、アミノ酸代謝、NO生成の特徴を示した (Nagasaka H, et al. *J Int Med Res* 2018)。「SFD児」が幼児時入院の危険因子であることも示した (Yoshimoto J, et al. *Acta Paediatr* 2019)。

(5) 出生順位と気管支喘息など各種アレルギー疾患の発症との関連性を示した (Kikkawa T, et al. *Clin Exp Allergy* 2018)。

(6) マウス重症急性肺炎モデルにおける免疫・炎症応答プロファイルを示した (Nagaoka Y, et al. *Dis Markers* 2017)。マウス重症急性肺炎モデルで抗HMGB-1抗体と抗インフルエンザ薬の併用治療の有効性を示した (Hatayama K, et al. *J Med Virol* 2019)。

(7) マウス重症急性脳症モデルで抗HMGB-1抗体を用いた分子標的治療の有効性を示した (Nosaka N, et al. *J Med Virol* 2018)。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 20 件)

1. Yoshimoto J, Yorifuji T, Washio Y, Okamura T, Watanabe H, Doi H, Tsukahara H. Population-based longitudinal study showed that children born small for gestational age faced a higher risk of hospitalisation during early childhood.

*Acta Paediatr*. 2019 Mar;108(3):473-478. doi: 10.1111/apa.14507. Epub 2018 Aug 17. PubMed PMID: 30028538. 査読あり

2. Hatayama K, Nosaka N, Yamada M, Yashiro M, Fujii Y, Tsukahara H, Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T.

Combined effect of anti-high-mobility group box-1 monoclonal antibody and peramivir against influenza A virus-induced pneumonia in mice.

*J Med Virol*. 2019 Mar;91(3):361-369. doi: 10.1002/jmv.25330. Epub 2018 Oct 22. PubMed PMID: 30281823. 査読あり

3. Yorifuji T, Tsukahara H, Doi H.

Early childhood exposure to maternal smoking and Kawasaki Disease: A longitudinal survey in Japan.

*Sci Total Environ*. 2019 Mar 10;655:141-146. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.194. Epub 2018 Nov 14. PubMed PMID: 30469059. 査読あり

4. Nagasaka H, Morioka I, Takawa M, Nakacho M, Yoshida M, Ishida A, Hirayama S, Miida T, Tsukahara H, Yorifuji T, Iijima K.

Blood asymmetric dimethylarginine and nitrite/nitrate concentrations in short-stature children born small for gestational age with and without growth hormone therapy.

- J Int Med Res.** 2018 Feb;46(2):761-772. doi: 10.1177/0300060517723183. Epub 2017 Oct 4. PubMed PMID: 28974136. 査読あり
5. Yorifuji T, Tsukahara H, Kashima S, Doi H.  
Intrauterine and Early Postnatal Exposure to Particulate Air Pollution and Kawasaki Disease: A Nationwide Longitudinal Survey in Japan.
- J Pediatr.** 2018 Feb;193:147-154.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.10.012. Epub 2017 Dec 6. PubMed PMID: 29212623. 査読あり
6. Miyazaki T, Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Morioka I, Tsukahara H, Kaji S, Hirayama S, Miida T, Kondou H, Ihara K, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kodama T, Iijima K, Yorifuji T, Matsuzaki Y, Honda A.  
Serum Amino Acid Profiling in Citrin-Deficient Children Exhibiting Normal Liver Function During the Apparently Healthy Period.
- JIMD Rep.** 2018;43:53-61. doi: 10.1007/8904\_2018\_99. Epub 2018 Apr 14. PubMed PMID: 29654547; PubMed Central PMCID: PMC6323014. 査読あり
7. Araki T, Kodera A, Kitada K, Fujiwara M, Muraoka M, Abe Y, Ikeda M, Tsukahara H.  
Analysis of factors associated with development of Bacille Calmette-Guerin inoculation site change in patients with Kawasaki disease.
- J Int Med Res.** 2018 Apr;46(4):1640-1648. doi: 10.1177/0300060518760462. Epub 2018 Mar 7. PubMed PMID: 29512398. 査読あり
8. Kikkawa T, Yorifuji T, Fujii Y, Yashiro M, Okada A, Ikeda M, Doi H, Tsukahara H.  
Birth order and paediatric allergic disease: A nationwide longitudinal survey.
- CI in Exp Allergy.** 2018 May;48(5):577-585. doi: 10.1111/cea.13100. Epub 2018 Feb 27. PubMed PMID: 29368358. 査読あり
9. Hirayama S, Nagasaka H, Honda A, Komatsu H, Kodama T, Inui A, Morioka I, Kaji S, Ueno T, Ihara K, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kondou H, Yorifuji T, Tsukahara H, Iijima K, Miida T.  
Cholesterol Metabolism is Enhanced in the Liver and Brain of Children with Citrin Deficiency.
- J Clin Endocrinol Metab.** 2018 Jul 1;103(7):2488-2497. doi: 10.1210/jc.2017-02664. PubMed PMID: 29659898. 査読あり
10. Nosaka N, Hatayama K, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Wake H, Tsukahara H, Nishibori M, Morishima T.  
Anti-High Mobility Group Box-1 Monoclonal Antibody Treatment of Brain Edema Induced by Influenza Infection and Lipopolysaccharide.
- J Med Virol.** 2018 Jul;90(7):1192-1198. doi: 10.1002/jmv.25076. Epub 2018 Mar 31. PubMed PMID: 29573352. 査読あり
11. Nosaka N, Okada A, Tsukahara H.  
Effects of Therapeutic Hypothermia for Neuroprotection from the Viewpoint of Redox Regulation.
- Acta Med Okayama.** 2017 Feb;71(1):1-9. doi: 10.18926/AMO/54819. Review. PubMed PMID: 28238004. 査読あり
12. Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Nakacho M, Morioka I, Tsukahara H, Kaji S, Hirayama S, Miida T, Kondou H, Ihara K, Yagi M, Kizaki Z, Bessho K, Kodama T, Iijima K, Saheki T, Yorifuji T, Honda A.  
Circulating tricarboxylic acid cycle metabolite levels in citrin-deficient children with metabolic adaptation, with and without sodium pyruvate treatment.
- Mol Genet Metab.** 2017 Mar;120(3):207-212. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.12.011. Epub 2016 Dec 24. PubMed PMID: 28041819. 査読あり
13. Hirayama S, Nagasaka H, Nakagawa S, Takuwa M, Nakacho M, Yorifuji T, Kondou H, Tsukahara H, Morioka I, Ishida A, Yamato S, Miida T. Growth hormone activates hepatic and cerebral cholesterol metabolism in small-for-gestational age children without catch-up growth.
- J Clin Lipidol.** 2017 Jul - Aug;11(4):1032-1042. doi: 10.1016/j.jacl.2017.05.010. Epub 2017 Jun 3. PubMed PMID: 28826566. 査読あり
14. Nagaoka Y, Nosaka N, Yamada M, Yashiro M, Washio Y, Baba K, Morishima T, Tsukahara H.  
Local and Systemic Immune Responses to Influenza A Virus Infection in Pneumonia and Encephalitis Mouse Models.

**Dis Markers.** 2017;2017:2594231. doi: 10.1155/2017/2594231. Epub 2017 Aug 24. PubMed PMID: 28912622; PubMed Central PMCID: PMC5587948. 査読あり

15. Yamashita N, Yashiro M, Ogawa H, Namba H, Nosaka N, Fujii Y, Morishima T, Tsukahara H, Yamada M.

Metabolic pathway catalyzed by Vanin-1 pantetheinase plays a suppressive role in influenza virus replication in human alveolar epithelial A549 cells.

**Biochem Biophys Res Commun.** 2017 Aug 5;489(4):466-471. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.172. Epub 2017 May 30. PubMed PMID: 28576495. 査読あり.

#### 〔学会発表〕(計 17 件)

1. 塚原宏一.「小児感染症の最新の話」第 31 回北野小児科学術講演会, 大阪, 2018 年 12 月.
2. 塚原宏一.「小児疾患と酸化ストレス ~ 生体マーカーを基軸にして」第 55 回日本小児アレルギー学会学術集会, 岡山, 2018 年 10 月.
3. 塚原宏一.「腎炎の発症病態と炎症の進展機序 ~ 小児腎臓疾患と酸化ストレス」第 53 回日本小児アレルギー学会学術集会, 福島, 2018 年 6 月.
4. 塚原宏一.「酸化ストレス制御と小児疾患治療」第 34 回中国四国小児腎臓病学会, 山口, 2017 年 10 月.
5. 塚原宏一.「小児尿路感染症と水電解質の管理」第 100 回山陰小児科学会, 米子, 2017 年 10 月.
6. 塚原宏一.「小児尿路感染症と水電解質管理」第 48 回日本小児感染症学会学術集会, 岡山, 2016 年 11 月.
7. 塚原宏一.「酸化ストレス制御と小児疾患治療」第 119 回日本小児科学会学術集会, 札幌, 2016 年 5 月.

#### 〔図書〕(計 1 件)

1. Oohashi T, Tsukahara H, Ramirez F, Barber CL, Otsuka F (Editors). Human Pathobiochemistry: From Clinical Studies to Molecular Mechanisms. Springer 社. 2019 年 総ページ数 349, 査読あり

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

1. 研究分担者氏名: 馬場 健児

ローマ字氏名: BABA, Kenji

所属研究機関名: 岡山大学

部局名: 大学病院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40721767

2. 研究分担者氏名: 大月 審一

ローマ字氏名: OHTSUKI, Shinichi

所属研究機関名: 岡山大学

部局名: 大学病院

職名: 教授

研究者番号(8桁): 90294454

### (2)研究協力者

1. 研協力者氏名: 宮原 宏幸

ローマ字氏名: MIYAHARA, Hiroyuki

2. 研究協力者氏名: 鷲尾 洋介

ローマ字氏名: WASHIO, Yosuke

3. 研究協力者氏名: 吉本 順子

ローマ字氏名: Yoshimoto, Junko

4. 研究協力者氏名: 八代 将登

ローマ字氏名: Yashiro, Masato