

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06971

研究課題名(和文)ヘムオキシゲナーゼ-1制御を介した早産児敗血症の新規治療法の開発

研究課題名(英文)The role of Heme Oxygenase-1 in neonatal sepsis using preterm mouse model

研究代表者

藤岡 一路 (FUJIOKA, KAZUMICHI)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20568810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、申請者が独自に確立した糞便懸濁液(Cecal slurry, CS)を腹腔内投与する早産児マウス敗血症モデル作成技術を用いて、早産児敗血症における部分的HO-1欠損の影響、薬物的HO-1誘導の有効性を検証し、その機序を解明することであった。本研究の結果、早産児マウス敗血症モデルにおいて、ヘムを用いたHO-1誘導は敗血症重症度の改善に加え、炎症性サイトカイン発現を抑制する一方、HO-1誘導不全(HO-1ヘテロ欠損マウス)は早産児マウス敗血症モデルを重症化させることが明らかになった。以上より、予防的HO-1誘導により、これら感受性個体を救済できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To induce sepsis, the cecal slurry (CS) model was applied to 4d-old mouse pups. In brief, adult cecums were harvested, and their contents were diluted with PBS-glycerol for CS stock preparations. HO-1 heterozygote (Het, HO-1+/-) and wild-type (WT) mice were administered CS IP at a dose of 2.0-mg/g (LD40 for WT mice, Fujioka et al, Shock 47:242, 2017), and then monitored for survival. To study the protective role of HO-1 induction, 30-micro mol heme/kg was given to 3d-old pups of both genotypes 24h prior to sepsis induction. Treatment with 2.0-mg CS/g caused a significantly higher mortality in Het (85.0%) than WT (40.9%, $p < 0.01$) pups. Most importantly, induction of HO-1 by heme significantly reduced mortality in both WT (6.3%) and Het (23.5%) pups. In addition, expression profiles measured using PCR arrays showed significant increases in cytokines in both genotypes 6h post-sepsis induction. This increase was generally attenuated in pups of both genotypes pre-treated with heme.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：neonatal sepsis Heme oxygenase-1 早産児マウス敗血症モデル mouse model preterm sepsis cytokine immunity inflammation

1. 研究開始当初の背景

新生児敗血症は、全身性の細菌感染と続発する多臓器不全を本態とする致死性疾患である。とりわけ、宿主防御機構が正常産児と比して未熟な早産児においては、高い致死率を認め、また生存し得たとしても脳機能に重篤な障害を残すことが多い。早産児敗血症の病因は、感染侵襲に対する免疫応答の破綻に由来する全身性炎症反応に加え、酸化ストレス、アポトーシスなどの複数の侵襲因子の関与が示唆されている。しかし、近年まで至適な動物モデルの作成が困難であったことから、その病態生理は十分解明されていない。また、成人領域においては血液浄化療法などの新たな敗血症治療が導入されつつあるが、早産児においては未だ抗菌薬を中心とした支持療法が主体であり、この難治性疾患の病態解明と新規治療法開発は喫緊の課題である。

以前より、敗血症研究においては盲腸結紮穿孔 (Cecal ligation puncture, CLP) モデルが標準モデルとして用いられてきた。しかし、手術を要し高侵襲のため新生児マウスへの応用は困難であった。一方、2007年に Wynn らにより成獣マウスから摘出した虫垂内容物から糞便懸濁液 (Cecal slurry, CS) を作成し、対象マウスに腹腔内投与することで腹膜炎性敗血症を誘導する CS モデルが開発され、新生児マウス (1週齢: ヒト正常産相当) を用いた新生児敗血症モデルの作成が可能となった。更に、2014年に Starr らにより新たな CS 保存法が報告され、長期間 (-6か月) の冷凍保存が可能となったため、全ての実験において同一起源の CS を使用することが可能となり、術者間誤差が問題となる CLP と比して高い精度の実験再現性が達成可能となった。

ヘムオキシゲナーゼ (Heme Oxygenase, HO) は、ビリルビン代謝の律速段階酵素である一方で、その誘導型アイソフォームである HO-1 はストレス応答蛋白であり、ストレス環境下においてピリベルジン (抗酸化作用) CO (抗

アポトーシス・抗炎症作用) 産生を介して、多様な組織保護作用を発揮する。また、生体内での HO-1 発現は胎児・新生児期に組織特異的に大きく変動することがわかっており、HO-1 は新生児疾患発症における重要な制御因子と目されており、現在までに新生児慢性肺疾患、新生児壊死性腸炎などの動物モデルにおいてその保護作用が報告されている。

2. 研究の目的

しかし、現在まで新生児および早産児敗血症における HO-1 の働きに関する報告はない。一方、小児敗血症患者において、HO-1 誘導性の HO-1 遺伝子多型が防御的に作用するとの報告がある。そこで我々は、CS 法を用いて早産児マウス敗血症モデルを作成し、早産児敗血症における HO-1 誘導の防御効果を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

本研究課題はスタンフォード大学および神戸大学の動物実験委員会の承認のもと行われた。

(1) CS 保存液の作成

既報(3)に基づき、成獣マウスから虫垂を摘出し、その内容物を 15% glycerol-PBS に溶解して CS (100mg/mL) を作成し、1mL 毎に分注し -80 で保存した。

(2) 早産児マウス敗血症モデルの作成

異なる用量の CS 保存液 (1.0-4.0mg/g body weight, BW) を免疫学的にヒト早産相当である 4 日齢の FVB/n マウスに腹腔内投与し、投与後 7 日間の死亡率を検討し、ヒト早産児敗血症の致死率が約 40% であることから、40% 致死量を決定した。

(3) 早産児マウス敗血症モデルにおける敗血症重症度の検討

敗血症重症度を評価する目的で、CS 2.0mg/g BW 投与 (CS) 群と Vehicle (Veh) 群において、体重増加、組織細菌数、血液学的異常、血液生化学異常、組織学的異常、免疫関連遺伝子発現を

比較検討した。

(4) Hemeを用いた薬物的H0-1誘導モデルマウスの作成

次に、確立されたH0-1誘導薬であるHeme (30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) またはVehicle (Veh) を、3日齢の野生型マウスに皮下投与し、24時間後(4日齢)に、肝臓H0活性を測定した。

(5) 早産児敗血症における薬物的H0-1誘導の保護効果の検討

ついで、早産児敗血症におけるH0-1誘導効果を検討する目的で、Heme投与後24時間(4日齢)にCS(2.0mg/g BW)を腹腔内投与し敗血症を誘導し(H-CS群)敗血症重症度をCS群と比較検討した。

4. 研究成果

(1) **死亡率**: CS群では用量依存性の死亡率増加(1.0mg/g 0%, 1.5mg/g 8%, 2.0mg/g 41%, 3.0mg/g 75%, 4.0mg/g 100%)を認め、40%致死量(LD40)は2.0mg/g BWであった。

(2) **体重変化率**: CS投与24時間後の体重変化を比較すると、CS群はVeh群と比して、有意な体重増加の停滞を認めた(-2.1 \pm 6.2, vs. 21.5 \pm 8.2, $n>20$, $P<0.01$)。

(3) **組織細菌量**: CS投与24時間後に肝臓、肺、脾臓を採取し、ホモジネートを作成し、Brain Heart Infusion培地を用いて37度で24時間培養し組織細菌量を測定した。その結果、肝・肺・脾臓の全臓器において、全例で細菌定着を認めた。

(4) **全血算所見**: CS投与24時間後に血液を採取し、全血算を測定した。その結果、CS群においてVeh群と比して、有意な白血球(2821 \pm 931 vs. 6298 \pm 1806 per μL , $P<0.01$)、血小板(204 \pm 82 $\times 10^3$ vs. 613 \pm 118 $\times 10^3$ per μL , $P<0.01$)、好中球(751 \pm 511 vs. 2891 \pm 910 per μL , $P<0.01$)、リンパ球減少(1854 \pm 849 vs. 2937 \pm 1232 per μL , $P<0.05$)を認めた。

(5) **血液生化学所見**: CS投与24時間後に血液を採取し、血清分離後に、AST、BUNを測定した。

その結果、CS群とVeh群の二群間で、

AST(229 \pm 95 vs. 71 \pm 52 U/L, $P=0.12$)およびBUN(65.5 \pm 26.8 vs. 52.0 \pm 5.4 mg/dL, $P=0.56$)に有意差を認めなかった。

(6) **組織所見**: CS投与24時間後に、敗血症における主要障害臓器である肝臓、肺を採取し、HE染色で組織学的に検討した。肝障害の指標として肝細胞空胞化を、肺障害の指標として肺胞隔壁の菲薄化を比較検討したが、CS群とVeh群の二群間で、組織学的肝障害および肺障害に有意差を認めなかった。

(7) **免疫関連遺伝子発現**: CS投与6時間後に安楽死し、肝臓を採取しRNAを抽出した。抽出したRNAを用いてPCRアレイ(RT² ProfilerTM PCRアレイ(PAMM-052ZA-12))を行い、網羅的にInnate/Adaptive Immune Responses関連遺伝子発現を解析し、CS群とVeh群で比較検討した。結果として、CS群の肝臓ではVeh群と比較して、サイトカイン(Ccl5, Cxcl10, IL-1a, IL-1b, Tnf, Ifng)パターン認識受容体(Cd14, Nod2, Tlr2, Nlrp3)免疫調節遺伝子(Cd40, Icam1, Mx1, Myd88, Nfkb1a)発現の有意な増加を認めた。

(8) **薬物的H0-1誘導モデル**: HemeによるH0-1誘導効果を確認する目的で、ガスクロマトグラフィーにより肝臓H0活性を測定した。結果として、Heme投与24時間後の肝臓H0活性(496 \pm 85, $n=10$)はVeh群(302 \pm 41, $n=23$, $P<0.001$)と比して64%増加していた。

(9) **薬物的H0-1誘導の敗血症死亡率への影響**: H-CS群では、CS群と比較して有意な死亡率の改善(41.6%, $p<0.005$)を認めた。

(10) **薬物的H0-1誘導の組織細菌数への影響**: H-CS群では、CS群と比較して肝臓・肺の組織細菌数には差を認めなかったが、脾臓においてはH-CS群で有意な細菌数の減少を認めた。

(11) **薬物的H0-1誘導の体重増加への影響**: H-CS群では、CS群と比較して有意な体重増加の改善を認めた(7.0 \pm 10.0, vs. -2.1 \pm 6.2,

n>20, P<0.001)。

(12) **薬物的H0-1誘導の免疫関連遺伝子発現への影響**:H-CS群では、CS群と比較して肝臓における炎症性サイトカイン遺伝子(Ccl5,Cxcl10,IL-1b,Ifng)および免疫調節遺伝子(Mx1,Nod2)発現の有意な減少を認めた。

以上より、我々の作成した早産児マウス敗血症モデルでは、CS用量依存性の死亡率増加、体重減少、白血球・血小板減少、肝臓における炎症性サイトカイン遺伝子の発現増加を認め、ヒト早産児敗血症の病態をよく反映しており、その病態解析に有用であると考えられた。Hemeによる薬物的H0-1誘導は、敗血症死亡率を改善させ、末梢血好中球を増加し、体重増加を改善し、脾臓細菌数を減少させた。また、薬物的にH0-1を誘導することで、敗血症により誘導される炎症性サイトカインおよび免疫関連遺伝子発現を抑制することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

(1) Maeyama K, Morioka I, Iwatani S, Fukushima S, Kurokawa D, Yamana K, Nishida K, Ohyama S, Fujioka K, Awano H, Taniguchi-Ikeda M, Nozu K, Nagase H, Nishimura N, Shirai C, Iijima K. Gestational age-dependency of height and body mass index trajectories during the first 3 years in Japanese small-for-gestational age children. *Sci Rep*. 2016;6:38659.

(2) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, Lu S, Wong S, Wong RJ, Stevenson DK. Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates the Severity of Sepsis in a Non-Surgical Preterm Mouse Model. *Shock*. 2017;47(2):242-50.

(3) Fujioka K, Kuroda J, Yamana K, Iijima K, Morioka I. Loss of Surfacten(R) During Bolus

Administration Using a Feeding Catheter. *Pediatr Int*. 2017.

(4) Fujioka K, Morioka I, Nishida K, Morizane M, Tanimura K, Deguchi M, Iijima K, Yamada H. Pulmonary Hypoplasia Caused by Fetal Ascites in Congenital Cytomegalovirus Infection Despite Fetal Therapy. *Front Pediatr*. 2017;5:241.

(5) Iwatani S, Harahap NIF, Nurputra DK, Tairaku S, Shono A, Kurokawa D, Yamana K, Thwin KKM, Yoshida M, Mizobuchi M, Koda T, Fujioka K, Taniguchi-Ikeda M, Yamada H, Morioka I, Iijima K, Nishio H, Nishimura N. Gestational Age-Dependent Increase of Survival Motor Neuron Protein in Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Front Pediatr*. 2017;5:194.

(6) Iwatani S, Shono A, Yoshida M, Yamana K, Thwin KKM, Kuroda J, Kurokawa D, Koda T, Nishida K, Ikuta T, Fujioka K, Mizobuchi M, Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Iijima K, Nishimura N. Involvement of WNT Signaling in the Regulation of Gestational Age-Dependent Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation. *Stem Cells Int*. 2017;2017:8749751.

(7) Fujioka K, Fukushima S, Nishida K, Iijima K, Morioka I. Intraventricular Hemorrhage Due to Coagulopathy After Vitamin K Administration in a Preterm Infant With Maternal Crohn Disease. *Jpn Clin Med*. 2017;8(1179670717746333):1179670717746333.

(8) OKUBO S, FUJIOKA K, YAMANE M, ASHINA M, FUKUSHIMA S, IKUTA T, OHYAMA S, YAMANA K, KOBAYASHI A, IJIMA K, MORIOKA I. Nontypeable Haemophilus Influenzae Sepsis in a Term Neonate. *Kobe J Med Sci*. 2017;63(4):105-8.

(9) IKUTA T, FUJIOKA K, SATO Y, ASHINA M,

FUKUSHIMA S, OHYAMA S, OKUBO S, YAMANA K, MORIZANE M, TANIMURA K, DEGUCHI M, IIJIMA K, MORIOKA I, YAMADA H. A Case of Congenital Complete Atrioventricular Block Treated with Transdermal Tulobuterol. Kobe J Med Sci. 2017;63(4):109-12.

(10) Fujioka K, Kalish F, Zhao H, Wong RJ, Stevenson DK. Heme oxygenase-1 deficiency promotes severity of sepsis in a non-surgical preterm mouse model.

Pediatr Res. 2018 May 23. doi:10.1038/s41390-018-0028-6. [Epub ahead of print]

(11) 藤岡一路. 早産児マウス敗血症モデルの作成. Shock. 2017;31(2):17-21.

(12) 藤岡一路. 早産児敗血症においてヘムオキシゲナーゼ-1が果たす役割の解明. 神緑会学術誌. 2017;33:61-4.

(13) 芦名満理子, 藤岡一路, 福嶋祥代, 生田寿彦, 大山正平, 大久保沙紀, 山名啓司, 飯島一誠, 森岡一朗. 重症small for gestational age児における尿道下裂合併症例とその出生時臨床像の検討. 小児科臨床. 2018;71(2):180-4.

〔学会発表〕(計10件)

(1) Fujioka K, Wong RJ, Morioka I, Iijima K, Stevenson DK. 非外科的早産児マウスモデルを用いた新生仔敗血症におけるヘムオキシゲナーゼ-1の役割 (The Role of heme oxygenase-1 in neonatal sepsis using a non-surgical preterm mouse model). 日本新生児成育医学会雑誌. 2016;28(3):513.

(2) 大久保沙紀, 藤岡一路, 芦名満理子, 生田寿彦, 福嶋祥代, 大山正平, 山名啓司, 飯島一誠, 森岡一朗. 早産児マウス敗血症モデルにおけるストレス誘導性高血糖の検討. 日本新生児成育医学会雑誌. 2017;29(3):643.

(3) 大久保沙紀, 西田浩輔, 藤岡一路. 早産児マウス敗血症モデルにおけるストレス誘導性高血糖の検討. Shock: 日本Shock学会雑誌.

2017;32(1):59.

(4) 芦名満理子, 藤岡一路, 戸津五月, 東海林宏道, 宮沢篤生, 和田和子, 飯島一誠, 森岡一朗. 極低出生体重児の初期経腸栄養管理に関する全国調査. 日本新生児成育医学会雑誌. 2017;29(3):624.

(5) 藤岡一路. 早産児マウス敗血症モデルにおけるヘムオキシゲナーゼ-1の保護効果. Shock: 日本Shock学会雑誌. 2016;31(1):46.

(6) 藤岡一路. 新生児分野で臨床応用が期待される基礎研究 Cecal slurry法を用いた早産児マウス敗血症モデルの作成と臨床応用. 日本小児科学会雑誌. 2018;122(2):195.

(7) 藤岡一路, Wong RJ, Stevenson DK. 非外科的敗血症モデル(Cecal slurry model)を用いた早産児敗血症モデルマウスの作成. 日本周産期・新生児医学会雑誌. 2016;52(2):573.

(8) 藤岡一路, 前山花織, 西田浩輔, 大山正平, 福嶋祥代, 山名啓司, 黒川大輔, 岩谷壮太, 西村範行, 飯島一誠, 森岡一朗. SGA児の長期予後 SGA児の胎盤における胎盤形成遺伝子Retrotransposon-like1 (Rtl1)メチル化異常の検討. 日本周産期・新生児医学会雑誌. 2017;53(2):476.

(9) 西田浩輔, 大久保沙紀, 藤岡一路. 早産児マウス敗血症モデルを用いたヒトリコンビナントロンボモジュリン(rh-TM)の敗血症防御効果の検討. Shock: 日本Shock学会雑誌. 2017;32(1):54.

(10) 西田浩輔, 藤岡一路, 芦名満理子, 生田寿彦, 福嶋祥代, 大山正平, 大久保沙紀, 山名啓司, 飯島一誠, 森岡一朗. 早産児マウス敗血症モデルにおけるヒトリコンビナントロンボモジュリン(rh-TM)の保護効果の検討. 日本新生児成育医学会雑誌. 2017;29(3):642.

〔図書〕(計2件)

(1) 西田浩輔, 藤岡一路. Q7「使用するモニタはどのように決めますか?」. ステップアップ新生児呼吸管理: Q&A で違いが分かる・説

明できる. メディカ出版. 2017 :37-39.

(2) 土屋健介,西田浩輔,藤岡一路. Q8 「心電
図モニタで呼吸数が出るのはなぜです
か?」. ステップアップ新生児呼吸管理: Q&A
で違いが分かる・説明できる. メディカ出版.
2017 :40-42.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤岡 一路 (FUJIOKA, Kazumichi)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 20568810