

令和元年9月3日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10094

研究課題名(和文)壊死性腸炎に対するグルカゴンライクペプチド-2を用いた革新的新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the new therapy using glucagon like peptide -2 for the necrotising enterocolitis

研究代表者

中目 和彦 (Kazuhiko, Nakame)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：70448570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新生児壊死性腸炎(NEC)は、特に早産児に発症する緊急的腹部救急疾患である。グルカゴンライクペプチド-2(GLP-2)は、腸管増殖因子ホルモンである。我々は、GLP-2にはNECに対して予防・抗炎症効果があると仮定した。新生仔ラットNECモデルを使用し母乳群、NEC群、GLP-2低用量投与、GLP-2高用量投与群において腸管を材料に検討した。結果はGLP-2高用量群はNECラット活動性を改善し、組織障害と生存率を有意に改善した。GLP-2高用量投与群の回腸組織炎症性サイトカイン産生を抑制した。これらの結果は、NECに対する治療としてGLP-2の潜在的可能性を示していると結論づけられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

壊死性腸炎は新生児、特に低出生体重児に発症する腸管の壊死を伴う腸管不全であり、高率な死亡率(約40%)を有する疾患である。近年、早産児、低出生体重児の出生数が増加しており、それに伴い生存率を高めるだけでなく、intact survival(後遺症なき生存)が目指されている。一方、グルカゴンライクペプチド-2(GLP-2)は腸管に対する成長因子、抗炎症作用を有するペプチドであり、短腸症候群・炎症性腸疾患への臨床応用が期待されている。現在、日本でも短腸症候群に対して臨床試験が進行している。当研究は壊死性腸炎ラットモデルを用いてGLP-2の治療効果を証明した。壊死性腸炎への臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Necrotizing enterocolitis (NEC) is a devastating gastrointestinal disease, that affects premature infants. Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) is an intestinotrophic hormone and reduces the inflammation. We suspected that GLP-2 would have protective and anti-inflammatory effects in an experimental rat model of NEC. NEC was induced in newborn rats by enteral feeding with hyperosmolar formula, asphyxial stress and enteral administration of lipopolysaccharide (LPS). Rats were randomly divided into the following four groups: dam-fed, NEC, NEC+GLP-2(low dose), and NEC+GLP-2(high dose). The NEC score and the survival rate in the NEC+GLP-2(H) group was improved compared with those in the NEC and the NEC+GLP-2(L) groups. High dose GLP-2 administration improved the incidence and survival rate for NEC. It also decreased ileal mucosal inflammatory cytokine production. These results support a potential therapeutic role for GLP-2 in the treatment of NEC.

研究分野：新生児外科

キーワード：壊死性腸炎 新生児 低出生体重児 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

壊死性腸炎は新生児、特に低出生体重児に発症する腸管の未熟性、感染等を原因とする腸管の壊死を伴う腸管不全であり、発症すれば高率な死亡率(約 40%)を有する疾患である。また手術においては広範囲腸切除により短腸症候群を来す可能性が高い。近年、早産児、低出生体重児の出生数が増加しており、それに伴い生存率を高めるだけでなく、intact survival(後遺症なき生存)が目指されている。一方、グルカゴンライクペプチド-2 (GLP-2)は腸管に対する成長因子、抗炎症作用を有するペプチドであり、短腸症候群・炎症性腸疾患への臨床応用が期待されている。現在、本邦でも短腸症候群に対して第3相試験まで進行中である。

2. 研究の目的

当研究は壊死性腸炎ラットモデルを用いて GLP-2 の治療効果を証明し、壊死性腸炎への臨床応用を目指し、新生児の intact survival の改善、少子高齢化時代における貴重児の健全な成長を目的とした。

3. 研究の方法

壊死性腸炎(NEC)ラットモデルに対して各群で GLP-2 の効果を検討した。

A: 母乳群 (Dam-fed 群) C/S 後里親の下で母乳を自由哺乳

B: NEC + 生理食塩水投与群 (NEC 群)

低酸素刺激・人工乳前 1 時間前 1 回 5ml/kg を 6 時間毎に皮下投与(20ml/kg/日)

C: NEC + Glucagon like peptide -2 低用量投与群: GLP-2 (L) 群

低酸素刺激・人工乳前 1 時間前に 1 回 20 μ g /NS5ml/kg を 6 時間毎に皮下投与(80 μ g /NS20ml/kg/日)

D: NEC + Glucagon like peptide -2 高用量投与群: GLP-2 (H) 群

低酸素刺激・人工乳前 1 時間前に 1 回 200 μ g /NS5ml/kg を 6 時間毎に皮下投与(800 μ g /NS20ml/kg/日)

検討項目としては

- (1) 新生仔ラット Clinical sickness score (活動性の指標)
- (2) 生後 96 時間時生存率
- (3) 回腸組織 HE 染色を組織障害度をスコアリング (NEC スコア) し評価。
- (4) NEC 発症率 (NEC スコア 2 以上)
- (5) 回腸組織 Ki-67 免疫染色による crypt cell proliferation の評価
- (6) ELISA 法による回腸組織内サイトカイン測定 (IL-6/protein、TNF- α /protein)

上記を検討、評価を行った。

4. 研究成果

(1) 新生仔 Clinical sickness score: NEC+GLP-2(H)群は新生仔ラットのスコアを改善した。

GLP-2(H)群は有意差を持って NEC 群と比較して Clinical sickness score を改善した。

(2) 生後 96 時間時生存率; Dam-fed 群: 100%、NEC 群: 36.4%、NEC+GLP-2(L)群: 37.5% NEC+GLP-2(H)群: 65.0%であり GLP-2(H)群は有意差を持って、NEC 群、NEC+GLP-2(L)群と比較して生存率を改善した。NEC+GLP-2(L)群と NEC 群では生存率に有意差はなかった。

(3) 回腸組織 NEC スコア: NEC+GLP-2(H)群は NEC 群と NEC+GLP-2(L)群と比較し有意に NEC スコアを改善し NEC 重症度を改善した。

(4) NEC 発症率: NEC+GLP-2(H)群は NEC 群と NEC+GLP-2(L)群と比較し有意に NEC 発症を

抑制した。

(5) crypt cell proliferation : 各群で陰窩細胞増殖に有意差は認めなかった。

(6) 回腸組織中 TNF - α 、回腸組織中 IL - 6 :

NEC+GLP-2(H)群は炎症性サイトカイン TNF - α 、IL - 6 産生を抑制した。

壊死性腸炎ラットモデルにおいて高用量 GLP - 2 の投与は粘膜炎症サイトカインの産生を抑制することにより生存率を改善し、壊死性腸炎の重症度を改善したと考えられた。当初予定していた GLP-2 の投与開始時期による効果の検討は現在、母数が不十分で有り評価を継続している。また網羅的なサイトカインシグナリングの検討も動物モデルが小さいことによる検体量不足のため十分な検討ができなかったため測定法を含めて再検討を行っている。

GLP - 2 の投与は壊死性腸炎の予防・治療としての有効性が期待され、適正な量、投与方法についてさらに検討が必要である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Nakame K, Hamada R, Suzuhigashi M, Nanashima A, Ieiri S, A rare case of ectopic pancreas presenting with persistent umbilical discharge, *Pediatrics International*, 60, 2018, 891-892 査読有り DOI: 10.1111/ped.13637
2. Nakame K, Onishi S, Yano K, Murakami M, Kawano M, Baba T, Harumatsu T, Yamada K, Yamada W, Masuya R, Kawano T, Machigashira S, Mukai M, Kaji T, Ieiri S, Effectiveness of simulator training mimicking a patient's specific situation for neonatal congenital diaphragmatic hernia, *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques & Part B: Videoscopy*, 29, 2018, Videoscopy 査読有り doi.org/10.1089/vor.2018.0542
3. Machigashira S, Kaji T, Onishi S, Yamada W, Yano K, Yamada K, Masuya R, Kawano T, Nakame K, Mukai M, Ieiri S, The protective effect of fish oil lipid emulsions on intestinal failure-associated liver disease in a rat model of short bowel syndrome, *Pediatric Surgery International*, 34, 2018, 203-209 査読有り doi: 10.1007/s00383-017-4190-4
4. Onishi S, Kaji T, Yamada W, Nakame K, Machigashira S, Yano K, Kawano M, Yamada K, Masuya, R, Kawano T, Mukai M, Yoshioka T, D, Souda M, Hamada T, Tanimoto A, Ieiri S, Ghrelin Stimulates Intestinal Adaptation Following Massive Small Bowel Resection in Parenterally Fed Rats, *Peptides*, 106, 2018, 59-67 査読有り DOI: 10.1016/j.peptides.2018.06.009
5. Onishi S, Kaji T, Machigashira S, Yamada W, Masuya R, Nakame K, Kawano M, Yano K, Yamada K, Kawano T, Mukai M, Yoshioka T, Tanimoto A, Ieiri S, The effect of intravenous lipid emulsions and mucosal adaptation following massive bowel resection, *Journal of Pediatric Surgery*, 53, 2018, 2444 ~ 2448 査読有り DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2018.08.019
6. 中目和彦, 矢野圭輔, 大西 峻, 山田耕嗣, 山田和歌, 川野孝文, 町頭成郎, 向井 基, 加治 建, 家入里志, 当科における過去 30 年間の腹壁異常手術症例の検討, *日本小児外科学会雑誌*, 53, 2018, 1316-1323 査読なし https://doi.org/10.11164/jjsps.54.7_1316
7. 中目和彦, 山田耕嗣, 山田和歌, 榎屋隆太, 川野孝文, 町頭成郎, 向井 基, 加

治 建、野口啓幸、家入里志、呼吸障害を呈し新生児期に発症した梨状窩瘻の3例 自
験例を含む本邦報告37例集計の検討、日本小児外科学会雑誌、54、2018、1117-1123、
査読なし DOI:10.11164/jjsps.54.5_1117

8. Kaji T、Nakame K、Machigashira S、Kawano T、Masuya R、Yamada W、Yamada K、Onishi S、Moriguchi T、Sugita K、Mukai M、Ieiri S、Predictors of a successful outcome for infants with short bowel syndrome: a 30-year single-institution experience、Surgery Today、47、2018、1391-1396 査読有り DOI: 10.1007/s00595-017-1534-6
9. Shinyama S、Kaji T、Mukai M、Nakame K、Matsufuji H、Takamatsu H、Ieiri S、The novel preventive effect of Daikenchuto (TJ-100)、 a Japanese herbal drug、 against neonatal necrotizing enterocolitis in rats、 Pediatric Surgery International、 33、 2017、 1109-1114 査読有り DOI: 10.1007/s00383-017-4145-9
10. Onishi S、Nakame K、Kaji T、Kawano M、Moriguchi T、Sugita K、Yano K、Nomura M、Yamada K、Yamada W、Masuya R、Kawano T、Machigashira S、Mukai M、Ieiri S、The bowel function and quality of life of Hirschsprung's disease patients who have reached 18 years of age or older -The long-term outcomes after transabdominal Soave procedure -, Journal of Pediatric Surgery、 52、 2017、 2001-2005 査読有り DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2017.08.036
11. Nakame K、Kaji T、Mukai M、Shinyama S、Matsufuji H、The protective and anti-inflammatory effects of glucagon-like peptide-2 in an experimental rat model of necrotizing enterocolitis、 Peptides、 75、 2016、 1-7 査読有り doi: 10.1016/j.peptides.2015.07.025
12. Onishi S、Kaji T、Yamada W、Nakame K、Moriguchi T、Sugita K、Yamada K、Kawano T、Mukai M、Souda M、Yamada S、Yoshioka T、Tanimoto A、Ieiri S、The administration of ghrelin improved hepatocellular injury following parenteral feeding in a rat model of short bowel syndrome., Pediatric Surgery International、 32、 2016、 1165-1171 査読有り DOI 10.1007/s00383-016-3975-1
13. Kaji T、Kawano T、Yamada W、Yamada K、Onishi S、Nakame K、Mukai M、Ieiri S、Changing Profile of Safe Techniques for Inserting a Central Venous Catheter in Pediatric Patients - Improvement in Outcomes with the Experience of 500 Insertions in a Single Institution、 Journal of Pediatric Surgery、 51、 2016、 2044-2047 査読有り doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.037
14. Yamada W、Kaji T、Onishi S、Nakame K、Yamada K、Kawano T、Mukai M、Souda M、Yoshioka T、Tanimoto A、Ieiri S、Ghrelin Improves Intestinal Mucosal Atrophy During Parenteral Nutrition: An Experimental Study、 Journal of Pediatric Surgery、 51、 2016、 2039-204 査読有り DOI: doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.035

〔学会発表〕(計7件)

1. Nakame K、Murakami M、Yano K、Baba T、Harumatsu T、Onishi S、Yamada K、Yamada W、Masuya R、Kawano T、Machigashira S、Mukai M、Kaji T、Ieiri S、The optimum timing and surgical strategy for congenital cystic lung disease based、 20th Congress、 The Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies、 2018

2. 中目和彦、矢野圭輔、大西 峻、山田耕嗣、山田和歌、榊屋隆太、川野孝文、町頭成郎、向井 基、加治 建、家入里志、40例の経験からみた先天性嚢胞性肺疾患の外科治療の検討 胸腔鏡手術時代の出生前診断例に対する治療戦略、第118回日本外科学会定期学術集会、2018
3. 中目和彦、矢野圭輔、川野正人、大西 峻、山田耕嗣、山田和歌、榊屋隆太、町頭成郎、川野孝文、向井 基、加治 建、家入里志、新生児上気道狭窄に対する関連診療科との連携による治療戦略、第54回日本周産期・新生児医学会学術集会、2018
4. 中目和彦、杉田光士郎、森口智江、大西 峻、山田耕嗣、山田和歌、後藤倫子、鈴東昌也、武藤 充、榊屋隆太、川野 孝文、町頭 成朗、野口 啓幸、向井 基、加治 建、家入 里志、上気道閉塞をきたす救急疾患に対する治療 新生児上気道閉塞疾患に対する治療戦略、第31回日本小児救急医学会学術集会、2017
5. 中目和彦、杉田光士郎、森口智江、大西 峻、山田耕嗣、山田和歌、榊屋隆太、川野孝文、町頭成郎、向井 基、加治 建、家入里志、Vascular anomalyに対する治療戦略-40例 の治療経験からみた外科治療の再評価-、第54回日本小児外科学会学術集会、2017
6. Nakame K、Mukai M、Yamada K、Onishi S、Kawano T、Yamada Y、Sugita K、Moriguchi T、Kaji T、Ieiri S、The operative results and the outcomes of treatment for abdominal wall defects- A 30-year single institution experience.、WOFAPS WORLD CONGRESS OF PEDIATRIC SURGERY 2016(The World Federation of Associations of Pediatric Surgeons、2016
7. Nakame K、Mukai M、Yamada K、Onishi S、Kawano T、Kaji T、Ieiri S、The operative results and the outcomes of treatment for abdominal wall defects- A 30-year single institution experience.、The 19th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies、2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：家入 里志

ローマ字氏名：IEIRI, Satoshi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号(8桁): 00363359

研究分担者氏名：加治 建

ローマ字氏名：KAJI, Tatsuru

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：附属病院

職名：特例教授

研究者番号(8桁): 50315420

研究分担者氏名：向井 基

ローマ字氏名：MUKAI, Motoi

所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域医学系
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80468024

研究分担者氏名：川野 孝文
ローマ字氏名：KAWANO, Takafumi
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学総合研究科
職名：客員研究員
研究者番号（8桁）：40457651

研究分担者氏名：山田 和歌
ローマ字氏名：YAMADA, Waka
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：附属病院
職名：特任助教
研究者番号（8桁）：20457659

研究分担者氏名：山田 耕嗣
ローマ字氏名：YAMADA, Koji
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：附属病院
職名：特任助教
研究者番号（8桁）：80528042

研究分担者氏名：大西 峻
ローマ字氏名：ONISHI, Shun
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：附属病院
職名：特任助教
研究者番号（8桁）：10614638

研究分担者氏名：谷本 昭英
ローマ字氏名：TANIMOTO, Akihide
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域医学系
職名：教授
研究者番号（8桁）：10217151

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。