

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10183

研究課題名(和文)壊死性腸炎に対するグレリンを用いた発症メカニズム解明と革新的新規予防治療法の開発

研究課題名(英文)The onset mechanism elucidation using the ghrelin and development of the innovative new preventive treatment for the necrotizing enterocolitis.

研究代表者

町頭 成郎 (MACHIGASHIRA, Seiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80404523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：死亡率の高い新生児外科疾患である壊死性腸炎に対し、腸管における粘膜損傷予防や炎症抑制効果が報告されているグレリンを投与し新たな発症予防や治療法を探った。コントロール群である母乳群と低酸素環境とLPS刺激で誘導した壊死性腸炎モデルマウス群、壊死性腸炎モデルマウスにグレリンを投与した3群の比較を行った。

グレリン投与群は壊死性腸炎群より回腸組織像において絨毛の萎縮が軽減し、粘膜下層と固有筋層の乖離が改善傾向であった。また回腸組織のNECスコアと炎症性サイトカイン発現が低い傾向を認めたが有意差は示せなかった。今後高用量のグレリン投与を追加検討することで壊死性腸炎に対する予防効果の証明が期待出来る。

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外科領域で未だに高い死亡率を有する疾患であるが、現時点では明確な予防的治療法はなく発症後の外科的治療が主である。壊死性腸炎に対する予防法を確立出来れば、少子化が進む現在において後遺症なき生命予後を向上でき、また医療費削減等の社会的貢献度は非常に大きい。グレリンは成長ホルモン代謝やエネルギー代謝調整等に関わる内因性リガンドとして知られており、腸管においては炎症の誘導抑制や粘膜損傷の予防と治療促進が報告されている。グレリンはNECに対しても予防、治療効果が期待でき、新たな治療法確立の可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Necrotizing enteritis(NEC), which is a neonatal surgical disease with a high mortality rate. Ghrelin has been reported to prevent mucosal damage in the intestinal tract and suppress inflammation. we investigated a new preventive method. We compared the following 3 mice groups; Control group: breastfeeding group, NEC group: we let NEC develop in hypoxia stimulation and LPS, Ghrelin group: ghrelin was administered to necrotic enteritis model mice. The Ghrelin group showed less atrophy of the villi in the ileal histology than the NEC group, and the dissociation between the submucosal layer and the proper muscle layer tended to improve. The NEC scores of ileal tissues and the expression of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6) tended to be low, but no significant difference was shown. By further investigation high-dose ghrelin administration, it is expected that the preventive effect against necrotic enteritis will be proved.

研究分野：小児外科

キーワード：新生児 壊死性腸炎 グレリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

壊死性腸炎 (Necrotising enterocolitis: NEC) は患児の未熟性や低酸素刺激、感染等を誘因に発症する緊急度の高い新生児疾患である。新生児外科疾患の生命予後が改善傾向にある現在でも未だに高い死亡率を有する。NEC を発症すれば壊死腸管は切除せざるを得ず、腸管大量切除となれば結果的に短腸症候群に陥るためその後の生活が大幅に制限される。また発症後の治療介入が遅れば汎発性腹膜炎に至り、その後敗血症や播種性血管内凝固症候群を発症することもあり生命予後にも直結する。よって発症予防や治療法の開発は社会的にも非常に大きな意義を有する。一方でグレリンは成長ホルモン代謝やエネルギー代謝調整等に関わる内因性リガンドとして知られており、腸管においては炎症の誘導抑制や粘膜損傷の予防と治癒促進効果が報告されている¹⁻³⁾。壊死性腸炎に対してもグレリンは発症予防や治療効果が期待でき、またグレリンの作用効果を分子生物学的に解析することで、NEC の発症機序を解明する一助となる可能性もある。

2. 研究の目的

本実験では壊死性腸炎モデルマウスを作成しグレリンを投与し、NEC 発症の予防効果や腸管粘膜修復効果を検討することで、壊死性腸炎に対する新たな治療戦略を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

環境馴化させた妊娠マウスより出生した新生仔マウスを生後 4 生日までは母仔一緒に母乳保育で育成する。生後 5 日に新生仔マウスを無作為に次の 3 群に振り分ける。

- (1) コントロール群：コントロール群は 5 生日以降も母親マウスと一緒に同一環境で母乳保育を継続する。
- (2) NEC 群：NEC 群は 5 生日より母親マウスから隔離し温度、湿度調整可能なインキュベータ内で飼育を行う。母乳保育に代わり体重当たり 50 μ l/g の人工ミルクを 6 時間毎に 1 日 4 回、経管的に投与する。NEC の病態を誘導するためミルク投与前に低酸素 (5%酸素 + 95%窒素環境) 刺激を 10 分間行い、加えて 5 生日、6 生日は人口ミルクに Lipopolisaccharide: LPS 4mg/kg/day を混入して投与を行う。
- (3) NEC + グレリン群：NEC+グレリン群は栄養管理、低酸素刺激、LPS 投与は NEC 群と同様であるが、5 生日から 9 生日までグレリン 10 μ g/kg/day の皮下投与を行う。グレリン投与は NEC 誘導刺激 8 時間前に皮下投与開始し、24 時間毎に皮下投与する。いずれの群のマウスも生後 9 日目に犠死せしめ、消化管、血液を検体として摘出し組織学的、免疫組織学的、生化学的に検討を行い評価する。

検討項目として 1. NEC スコアを用いた NEC 発症率、2. HE 染色像と Ki-67 免疫染色による回腸の crypt cell proliferation の評価、3. 回腸組織内の炎症性サイトカイン (IL-6、TNF-) 測定を行った。

4. 研究成果

当初海外文献⁴⁾に報告される上記方法で NEC モデルマウスの作成を行ったが、手技的な問題もあり生命率が極端に低かった。NEC の基礎研究で多くの研究報告を行っているトロント小児病院・Professor Agostino Pierro の Lab にも相談して飼育器具や環境要因の調整を行った。ただある程度実験手技の習得が進んだ後も生存率の改善が思うように得られないため、低酸素刺激が過度に加わり重度の NEC を発症することで、生命予後が改善していない可能性を危惧した。そのため至適低酸素刺激時間を検討するための追加実験を行い、低酸素刺激 7 分でも NEC が発症していることを確認した。こうして作成した NEC マウスを用いて検体を採取し、上記検討項目を評価すると以下の結果となった。

- (1) 回腸組織における NEC スコアで、Ghrelin 群は NEC 群と比較し有意差は伴わないものの NEC

スコアが低い傾向を認め、NECの発症及び重症化を改善する可能性を示唆した。

- (2) グレリンを投与された壊死性腸炎ラットモデルでは回腸 HE 染色像において、絨毛の萎縮、及び粘膜下層と固有筋層の乖離が改善傾向にあった。このことはグレリンが NEC の重症化を予防する可能性を示唆すると考えた。ただ Ki-67 染色による陰窩細胞増殖に有意差は認めなかった。
- (3) 回腸組織内の炎症性サイトカイン測定でも有意差は得られておらず、グレリン投与の有効性を証明することは出来ていない。

本研究では NEC に対するグレリンの予防効果が有意差を持って示すことは出来なかった。ただグレリン投与群は腸管の損傷の程度が軽減されており、またグレリンは容量依存的に効果発現を示す報告も認めるため、⁵⁻⁷⁾高用量のグレリン投与が粘膜炎症性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することが期待出来る。今後はグレリンの至適投与量の検討を継続する予定である。

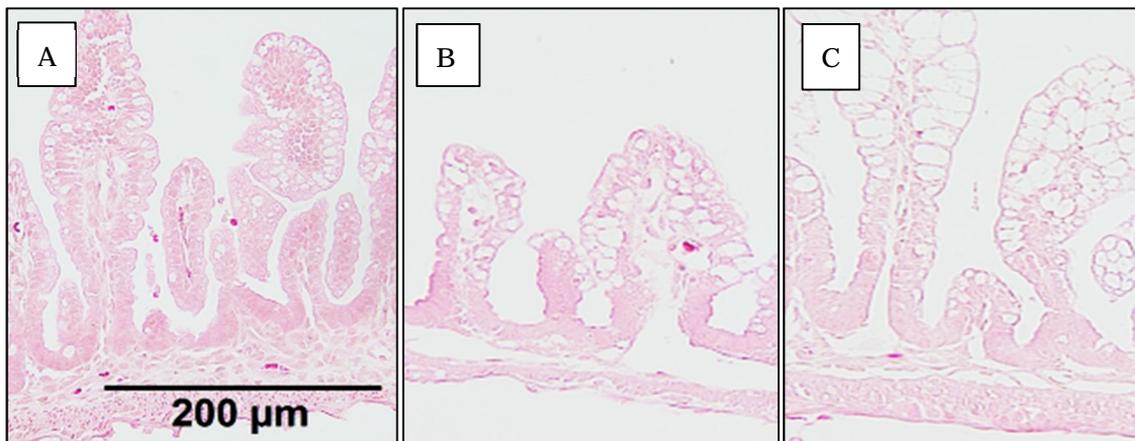


図 回腸 HE 染色像 (A: コントロール群、B: NEC 群、C: グレリン投与群)

コントロール群に比べ NEC 群の粘膜所見は絨毛高が短縮し粘膜下層の剥離が増強している。NEC 群にグレリン投与を行った群では NEC 群と比較し、絨毛高の萎縮が改善し粘膜下層の剥離も軽度である。

参考文献

- 1) Kojima M. , Kangawa K. Ghrelin: structure and function *Physiol Rev*200585495-522
- 2) Yu H. , Xu G. , Fan X. The effect of ghrelin on cell proliferation in small intestinal IEC-6 cells *Biomed Pharmacother*2013673235-9
- 3) Yamada W. , Kaji T. , Onishi S.ほか Ghrelin improves intestinal mucosal atrophy during parenteral nutrition: An experimental study *J Pediatr Surg*201651122039-43
- 4) Zani A. , Eaton S. , Leon F. F.ほか Captopril reduces the severity of bowel damage in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis *J Pediatr Surg*2008432308-14
- 5) Thidar Myint H. , Yoshida H. , Ito T.ほか Dose-dependent response of plasma ghrelin and growth hormone concentrations to bovine ghrelin in Holstein heifers *The Journal of endocrinology*20061893655-64
- 6) Cao S. G. , Wu H. , Cai Z. Z. Dose-dependent effect of ghrelin on gastric emptying in rats and the related mechanism of action *Kaohsiung J Med Sci*2016323113-7
- 7) Kim J. N. , Kim B. J. The Mechanism of Action of Ghrelin and Motilin in the Pacemaker Potentials of Interstitial Cells of Cajal from the Murine Small Intestine *Mol Cells*2019426470-9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yano Keisuke, Kaji Tatsuru, Onishi Shun, Machigashira Seiro, Nagai Taichiro, Harumatsu Toshio, Yamada Koji, Yamada Waka, Muto Mitsuru, Nakame Kazuhiko, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Novel effect of glucagon-like peptide-2 for hepatocellular injury in a parenterally fed rat model of short bowel syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1345 ~ 1351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04560-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Machigashira S, Kaji T, Onishi S, Yamada W, Yano K, Yamada K, Masuya R, Kawano T, Nakame K, Mukai M, Ieiri S	4. 巻 34
2. 論文標題 The protective effect of fish oil lipid emulsions on intestinal failure-associated	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 203-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4190-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onishi S, Kaji T, Yamada W, Nakame K, Machigashira S, Yano K, Kawano M, Harumatsu T, Masuya R, Kawano T, Mukai M, Yoshioka T, Souda M, Hamada T, Tanimoto A, Ieiri S	4. 巻 106
2. 論文標題 Ghrelin Stimulates Intestinal Adaptation Following Massive Small Bowel Resection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptide	6. 最初と最後の頁 264 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.06.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onishi Shun, Kaji Tatsuru, Machigashira Seiro, Yamada Waka, Masuya Ryuta, Nakame Kazuhiko, Kawano Masato, Yano Keisuke, Yamada Koji, Kawano Takafumi, Mukai Motoi, Yoshioka Takako, Tanimoto Akihide, Ieiri Satoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 The effect of intravenous lipid emulsions and mucosal adaptation following massive bowel resection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 2444 ~ 2448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2018.08.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Machigashira Seiro, Kaji Tatsuru, Onishi Shun, Yamada Waka, Yano Keisuke, Yamada Koji, Masuya Ryuta, Kawano Takafumi, Nakame Kazuhiko, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 The protective effect of fish oil lipid emulsions on intestinal failure-associated liver disease in a rat model of short-bowel syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 203 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4190-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaji Tatsuru, Nakame Kazuhiko, Machigashira Seiro, Kawano Takafumi, Masuya Ryuta, Yamada Waka, Yamada Koji, Onishi Shun, Moriguchi Tomoe, Sugita Koshiro, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Predictors of a successful outcome for infants with short bowel syndrome: a 30-year single-institution experience	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-017-1534-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Machigashira S, Kaji T, Onishi S, Murakami M, Yano K, Baba T, Harumatsu T, Yamada K, Yamada W, Masuya R, Kawano T, Nakame K, Mukai M, Ieiri S
2. 発表標題 The efficiency and mechanism of 3 fatty acid on improving intestinal failure-associated liver disease in a rat model of short bowel syndrome
3. 学会等名 The 52nd Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町頭 成郎、加治 建、大西 峻、村上雅一、矢野圭輔、馬場徳朗、春松敏夫、山田耕嗣、山田和歌、榎屋隆太、中目和彦、向井基、家入里志
2. 発表標題 3系脂肪乳剤の腸管不全合併肝障害に対する肝予防効果
3. 学会等名 第34回日本静脈経腸栄養学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町頭 成郎、加治 建、大西峻、村上雅一、矢野圭輔、馬場徳朗、春松敏夫、山田耕嗣、山田和歌、榊屋隆太、中目和彦、向井 基、家入里志
2. 発表標題 短腸ラットモデルにおける腸管不全合併肝障害 (IFALD) に対する 3系脂肪乳剤の予防効果の検討
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 町頭 成郎、加治 建、大西 俊、川野正人、矢野圭輔、山田耕嗣、山田和歌、榊屋隆太、川野孝文、中目和彦、向井 基、家入里志
2. 発表標題 短腸ラットモデルを用いた腸管不全合併肝障害(IFALD)に対する魚油由来脂肪乳剤の肝保護効果の検討
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 町頭 成郎、加治 建、矢野圭輔、川野正人、大西 俊、山田耕嗣、山田和歌、榊屋隆太、川野孝文、中目和彦、向井 基、家入里志
2. 発表標題 短腸症候群モデルラットを用いた腸管不全合併肝障害(IFALD)に対する 3系脂肪乳剤の肝障害予防効果の検討
3. 学会等名 第55回日本外科代謝栄養学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Machigashira S、 Kaji T、 Onishi S、 Masuya R、 Nakame K、 Ieiri S
2. 発表標題 Does the fish oil lipid emulsion affect intestinal mucosal adaptation after massive small bowel resection in rats?
3. 学会等名 The 30th International Symposium on Pediatric Surgical Research and Update on New born (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	家入 里志 (IEIRI Satoshi) (00363359)	鹿児島大学・歯学部医学系・教授 (17701)	
研究分担者	大西 峻 (ONISHI Shun) (10614638)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教 (17701)	
研究分担者	山田 和歌 (YAMADA Waka) (20457659)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教 (17701)	
研究分担者	川野 孝文 (KAWANO Takafumi) (40457651)	鹿児島大学・歯学部総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	加治 建 (KAJI Tatsuru) (50315420)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任教授 (17701)	
研究分担者	武藤 充 (MUTO Mitsuru) (70404522)	鹿児島大学・歯学部鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	中目 和彦 (NAKAME Kazuhiko) (70448570)	鹿児島大学・歯学部鹿児島大学病院・講師 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	向井 基 (MUKAI Motoi) (80468024)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	榊屋 隆太 (MASUYA Ryuta) (90448572)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教 (17701)	
研究分担者	矢野 圭輔 (YANO Keisuke) (30757919)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	