

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591203

研究課題名（和文） 小児炎症性腸疾患の病態解析および栄養療法の検討

研究課題名（英文） The mechanical and nutritional analysis of inflammatory bowel diseases in children

研究代表者

大塚 宜一 (OHTSUKA YOSHIKAZU)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90338335

研究成果の概要：

小児期に認められる炎症性腸疾患の病態を検討する目的で、新生児期の仔ラット消化管の炎症性シグナル分子の発現を検討した。また、n-3系多価不飽和脂肪酸(n-3PUFA)や Probiotics の新生児期における役割や抗炎症効果を検討する目的で、まず、未熟児ラットを用いた新生児壊死性腸炎(NEC)モデルを用い n-3PUFA の消化管粘膜に与える効果を確認した。DHA や EPA などの n-3PUFA 投与群で NEC 発症の頻度が抑えられ、IkB- $\alpha/\beta$  の発現の減弱との関わりが確認された一方、抗炎症性分子である PPAR- $\gamma$  の発現の増強を確認した。さらに、母ラットに n-3PUFA を投与することで炎症性分子である IkB- $\alpha/\beta$  の発現が減弱する一方、アポトーシスと関連のある caspase1, caspase12, granzyme B などの発現の増強を認めた。また、炎症性プロスタグランジン産生に関わる PLA2 の発現の低下、炎症作用の強い PGD2 のレセプター分子である DP2 の発現の低下を認める一方、抗炎症作用のある PGE2 のレセプター分子である EP3 の発現が増強するなど n-3PUFA の抗炎症作用が確認され、n-3PUFA 投与により小児炎症性腸疾患を制御できる可能性が示唆された。同様に新生児期の仔ラットに Probiotics (*B.breve*)を投与した検討では glutathione peroxidase 2, lipopolysaccharide binding protein, lipoprotein lipase などの炎症関連分子の発現の抑制を確認し、その抗炎症効果が示唆された。潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患を対象とした臨床検討では、急性期に Th2 サイトカインが著増すること、特に小児潰瘍性大腸炎の粘膜において、Th2 サイトカインに対しては GATA-3 が、また、Th1 サイトカインに対しては STAT4 の発現が増強しており、それぞれのシグナル分子が病勢の増悪に深く関与している可能性が示唆された。

今回の検討より、小児期炎症性腸疾患において、新生児期より特定の炎症性シグナル分子の発現が、その病態に関与していることが示唆された一方、その発現を n-3PUFA や Probiotics を用いて制御できる可能性があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：新生児壊死性腸炎、n-3 系多価不飽和脂肪酸、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B- $\alpha/\beta$ 、PPAR- $\gamma$ 、microarray、probiotics

### 1. 研究開始当初の背景

食物の消化活動をつかさどる小腸は、新生児期に約 270cm を有し、生後急速に成長し 4 歳までに全長約 450~550cm と成人の長さに達する。小腸粘膜には多数のリンパ球が存在することから、小腸が免疫臓器であることが知られている。消化管粘膜の表面は円柱上皮細胞で覆われており、腸内細菌叢の助けをかり、上皮細胞は消化管粘膜の防御能を高めたり、炎症性腸疾患においては炎症性ケモカインを産生して粘膜内リンパ球を刺激し粘膜障害を誘導したりと多彩な役割を演じている。特に昨今は、Toll like receptor (TLR) の解析が進み、腸内細菌叢とのクロストークの解析が進められている。胎児期の腸管は無菌状態であることから、新生児期・乳児期から小児期にかけ、腸内細菌叢の変化にともない、粘膜免疫機能にダイナミックな変化が起こっていると考えられるが十分な検討はなされていない。

同様に、粘膜上皮細胞の機能と栄養との関わりが指摘されている。n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3PUFA) は、関節リウマチや炎症性腸疾患などの慢性炎症性疾患の予防や治療にも利用されるようになってきているが、その新生児期における役割や分子生物学的な検討は十分にはなされていない。また、Probiotics は、炎症性腸疾患などの慢性炎症性疾患の予防や治療に利用されるようになってきているが、その新生児期における役割や分子生物学的な検討も十分にはなされていない。

そこで本研究では、まず新生児期から小児

期にかけての粘膜免疫の発達を解析する目的で、未熟仔ラットの腸管における各種シグナル分子の発現を検討した。また、それらの発現を、新生児壊死性腸炎 (NEC) のモデルラットを作成し、炎症の有無による変化を検討する一方、その系を用い n-3PUFA や Probiotics の粘膜免疫に与える影響を検討した。

さらに、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患を対象に臨床検討を行い、小児科の立場から炎症性腸疾患の病態を検討した。

### 2. 研究の目的

- (1) 未熟仔ラットの腸管を用い各種炎症性および抗炎症性シグナル伝達分子の発現を解析する。また、未熟仔ラットを用いた NEC のモデルを用い、前述の各分子の発現を、正常と炎症を誘導した際とで比較し、NEC の発症機序・病態を検討する。
- (2) 前述の分子に n-3PUFA や Probiotics などが与える効果を解析し、その役割を検討する。
- (3) 小児期炎症性腸疾患として潰瘍性大腸炎 (UC)、クローン病 (CD) などを対象に、前述の各種シグナル分子の発現を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) 未熟仔ラットを用いた検討：

NEC モデルの作成：通常、未熟仔ラットは 21 日満期で出生するが、本研究においては胎 20 日の未熟仔ラットを用いる。未熟仔ラットは妊娠ラットを麻酔下で帝王切開し出

生させる。出生後、呼吸および体温管理を行いつつ胃ゾンデを用いミルク注入を開始する。未熟仔ラットは温浴槽を用い、保温・保湿に努め保育する。未熟仔ラットに強制栄養を行う事で、生後 12 時間から 24 時間に血便を認め、NEC の際に呈する症状を発現させる事に成功した。この未熟仔ラットを用いた NEC モデルを用い、下記のごとく組織学的、免疫学的、分子生物学的解析を行い NEC の病態を解析した。

(2) 同時に n-3PUFA を用い、栄養学的影響を検討する。

(3) 同様に Probiotics (*B.breve*)を用い、その効果を検討する。

(4) 小児期炎症性腸疾患として潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) を対象に、活動期と非活動期の血清サイトカイン値を確認するとともに、粘膜における炎症性シグナル分子の発現を前述の各種シグナル分子を中心に real time PCR 法を用い検討した。

① 組織学的検討：未熟仔ラットから腸管を取り出し、ホルマリン固定後、HE 染色を行い、病理学的解析を行う。

② 免疫・分子生物学的解析：未熟仔ラットから腸管を取り出し、mRNA を抽出し、cDNA を作成した後、real time PCR 法を用い、PPAR- $\gamma$  および NF $\kappa$ B のインヒビターである I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$  の発現を検討する。また、DNA microarray assay を用い、炎症性・抗炎症性シグナル分子の発現を多角的に捉える。さらに、DNA microarray assay により強く関与が示唆された分子に対し、real time PCR 法を用いその発現を検証する。同様の検討を臨床検体においても行った。

③ 栄養学的解析：大豆を用いた通常の飼料、DHA および EPA などの n-3PUFA を多く含んだ飼料で妊娠ラットを飼育し (Table 1)、そこから生まれた未熟仔ラットを用い、脂肪酸組成の変化を分析し、その影響を確認する一方、前述の解析を行い、母ラットに投与した n-3PUFA の仔ラットにおける効果を検証する。

Table 1. Composition of test diet

Group	Control	DHA	EPA
Casein	20	20	20
L-Cystein	0.3	0.3	0.3
$\alpha$ -Cornstarch	13.2	13.2	13.2
$\beta$ -Cornstarch	39.8	39.8	39.8
Sucrose	10	10	10
Soybean oil	7	3.6	3.6
DHA	0	3.4	0
EPA	0	0	3.4
Cellulose	5	5	5
Mineral mixture*	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture**	1	1	1
Total amount (g)	100	100	100

\*following AIN-93G-MX. \*\* AIN-93-VX

AIN: American Institute of Nutrition

#### 4. 研究成果

(1) 未熟仔ラットを用いた検討：

NEC モデルの作成：在胎 20 日 (21 日が満期) に帝王切開にて出生させた仔ラットを用いた。出生直後に 0.15ml のミルクを胃に注入したところ、生後 24 時間後に肉眼的な消化管出血を約 50%に確認した(Figure 1a, b)。病的には、粘膜の充血、杯細胞の増加、炎症細胞浸潤などを確認した(Figure 2b, c, d)。

Figure 1. 肉眼的所見 a & b: コントロール、c & d: NEC 様所見

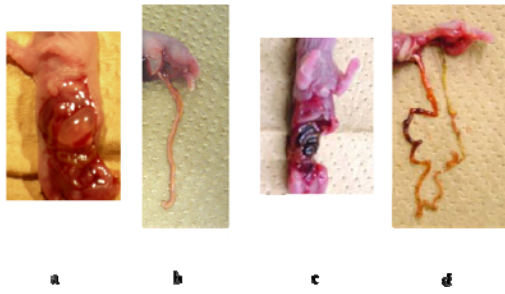
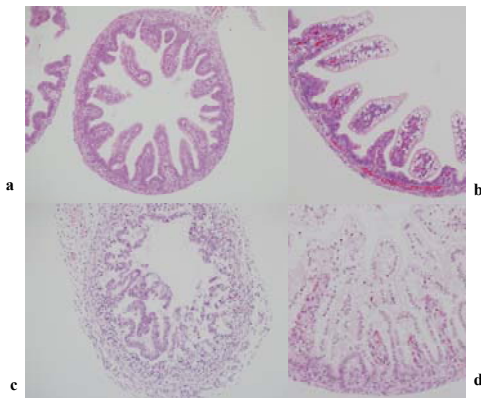


Figure 2. 病理所見 a: コントロール、b: 充血および浮腫、c & d: 炎症細胞浸潤、杯細胞の増加



これらの炎症性変化を認めた腸管では、NF- $\kappa$ B 関連因子の I $\kappa$ B- $\alpha/\beta$ -mRNA および抗炎症性因子の PPAR- $\gamma$ -mRNA の発現が増強していた。

(2) n-3PUFA の影響の検討:

n-3PUFA の効果を検討する目的で、妊娠 7~20 日の母ラットに、前述の大豆 (コントロール)、DHA、EPA をそれぞれ付加した餌を与え、出生した仔ラットの消化管粘膜の変化を検証した。その結果、DHA および EPA 群で NEC 発症の頻度が抑えられ (Figure 3)、炎症性分子である I $\kappa$ B- $\alpha/\beta$  の発現が減弱する一方、抗炎症性分子である PPAR- $\gamma$  の発現がさらに増強していた (Figure 4)。

Figure 3. NEC モデルにおける DHA および EPA の効果 (発症頻度の比較)

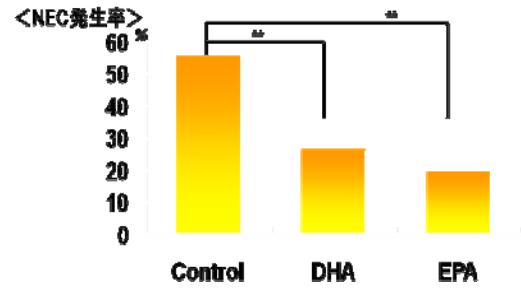


Figure 4. NEC モデルにおける DHA および EPA の効果 (PPAR- $\gamma$  および I $\kappa$ B- $\alpha/\beta$  の発現の比較)

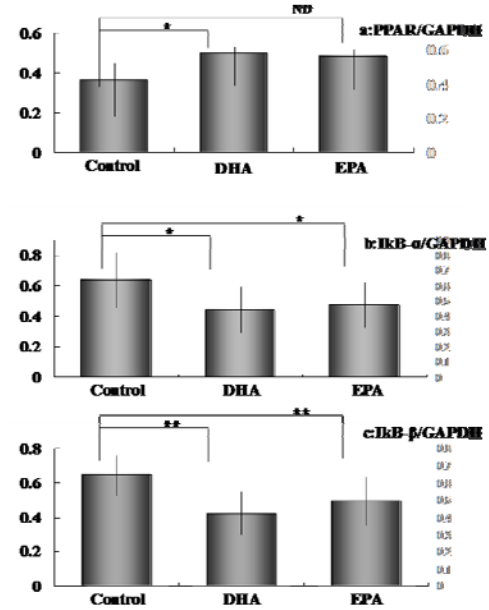


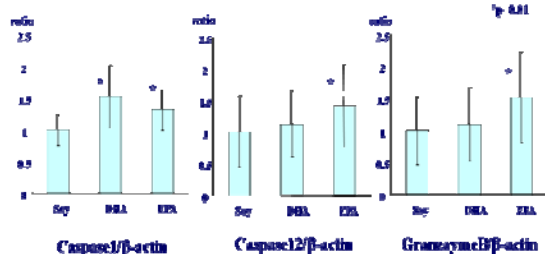
Figure 5. Comparison of Expression of signals in n-3 PUFA supplementation study. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ND: not difference.

また、出生直後の各群の仔ラット小腸粘膜における炎症関連分子の遺伝子発現を microarray を用いて網羅的に解析した。その結果、n-3PUFA 投与により炎症性分子である I $\kappa$ B- $\alpha/\beta$  の発現が減弱する一方、アポトーシスと関連のある caspase1, caspase12, granzyme B などの発現の増強を認めた (Figure 5)。

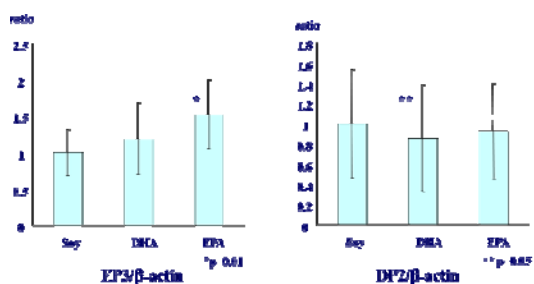
すなわち n-3PUFA は、非炎症時には I $\kappa$ B- $\alpha/\beta$  の発現を減弱させる一方、炎症細胞にアポトーシスを誘導することで、また、炎症が生じた際には PPAR- $\gamma$  などの抗炎症性分子の発現を促し、未熟児ラット小腸粘膜を炎症性変化

から保護している可能性が示唆された。

**Figure 5.** NEC モデルにおける DHA および EPA の効果 (Caspase 1, 12, granzyme B 発現の比較)



**Figure 6.** NEC モデルにおける DHA および EPA の効果 (EP3 および DP2 発現の比較)



また、炎症に重要なエイコサノイドの産生に関わる PLA2 の発現の低下、炎症作用の強い PGD2 のレセプターである DP2 の発現の低下を認める一方、抗炎症作用のある PGE2 のレセプターである EP3 の発現が増強するなど n-3PUFA の抗炎症作用が確認された(Figure 6)。

以上の検討から、n-3PUFA を用いることで、生体内の細胞は特定のシグナル伝達分子の発現を調節し免疫応答を変化させていることが証明された。特に n-3PUFA には、抗炎症効果が期待され、小児炎症性腸疾患における免疫応答を制御できる可能性が示唆された。

### (3) Probiotics による効果の検討：

Probiotics の新生児期における役割を検討する目的で、出生直後の仔ラットに Probiotics である *B.breve* を投与した際の、消化管粘膜

における炎症性シグナル分子の発現を検討した。出生直後から 2 週間、継続的に *B.breve* を投与したものと投与していないものの腸管粘膜より mRNA を抽出し、cDNA を作成後、microarray を用い、その遺伝子発現を網羅的に検討した。その結果、下記表のごとく、各種シグナル伝達分子の発現が抑制されることを確認し、Probiotics が持つ抗炎症効果との関連が示唆された (Table 2)。

**Table 2.** Probiotics の効果 (Fold change)

Fold Change	gene description
-1.50	lipoprotein lipase
-1.65	tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1
-2.07	glutathione peroxidase 2
-2.31	chloride channel, calcium activated, family member 4 (CLCA4)
-3.62	lipopolysaccharide binding protein

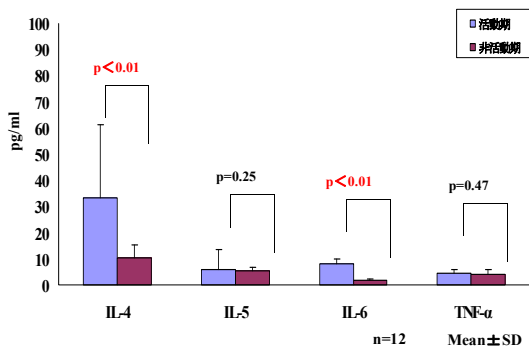
### (4) 小児期炎症性腸疾患を対象とした臨床検討：

炎症性腸疾患を対象とした臨床検討では、Th1 サイトカインと Th2 サイトカインのシグナル伝達分子の発現をそれぞれ検討した。炎症性腸疾患の急性期に Th2 サイトカインが著増することをしばしば経験する。まず、血清サイトカイン値を測定したところ、活動期に IL-4 や IL-6 値が更新しており、Th2 サイトカインが活動期の炎症性腸疾患に深く関与している可能性が示唆された(Figure 7)。特に小児潰瘍性大腸炎 (UC) においては IL-4 のシグナル分子である GATA-3 および Th1 サイトカインのシグナル分子である STAT-4 の発現が増強していることが確認された(Figure 8)。一方、小児クローン病 (CD) においては、GATA-3、T-bet、STAT-4、STAT-3 などの発現

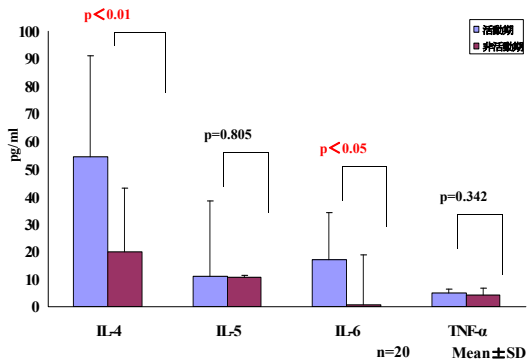
には有意差が認められなかったものの、IL-23R の発現の有意な低下を確認しており、特に小児 CD での Th17 などの関与が示唆された。

**Figure 7.** 血清サイトカイン値 CD および UC では、非活動期に比べ活動期に血清 IL-4 および IL-6 値が有意に増加していた。

### 血清サイトカイン値の比較(CD)

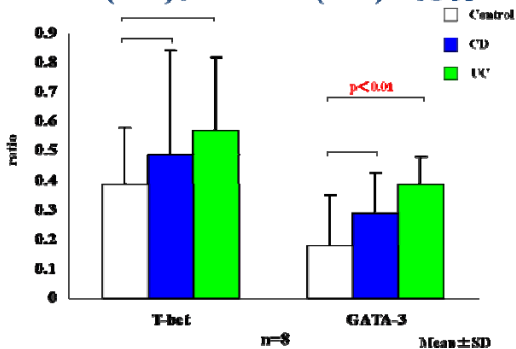


### 血清サイトカイン値の比較(UC)

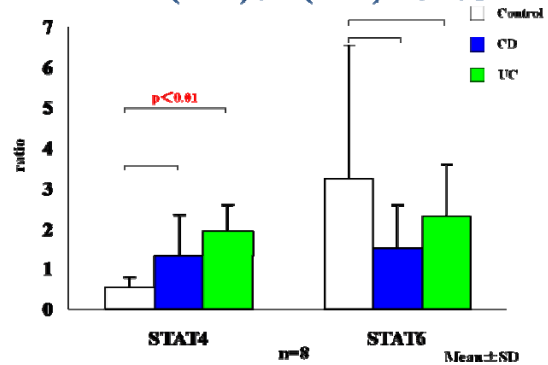


**Figure 8.** シグナル伝達分子の発現 UC では GATA-3 および STAT-4 の発現が増強していた。

### T-bet(Th1)、GATA-3(Th2)の発現



### STAT4(Th1)、6(Th2)の発現



### (5) まとめ

今回の検討より、正常および炎症性腸疾患の消化管粘膜において、すでに新生児期より特定の炎症性シグナル分子の発現が認められること、その発現が NEC など、特定の疾患の病態に関与していることが示唆された。さらに、それらの発現を n-3PUFA や Probiotics を用いて制御し、炎症性腸疾患を制御できる可能性があることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Okada K, Fujii T, Ohtsuka Y, Yamakawa Y, Izumi H, Yamashiro Y, Shimizu T. Overfeeding Can Cause NEC Like Enterocolitis in Premature Rat Pups. Neonatology 2009, in press

2. Ohtsuka Y, Shimizu T, Shoji H, Kudo T, Fujii T, Wada M, Nagata S, Yamashiro Y. Neonatal transient eosinophilic colitis causes rectal bleeding in early infancy. J Pediatr Gastro Hepato Nutr 44:501-505,2007

3. Wang C, Shoji H, Sato H, Nagata S, Ohtsuka Y, Shimizu T, Yamashiro Y. Effects of oral administration of *Bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low-birth-weight infants. J Pediatr Gastro Hepato Nutr 44:252-7,2007

4. Fujii T, Ohtsuka Y, Lee T, Kudo T, Shoji H, Sato H, Nagata S, Shimizu T, Yamashiro Y. *Bifidobacterium breve* enhances TGF- $\beta$  signaling by regulating SMAD7 expression in preterm infants. J Pediatr Gastro Hepato Nutr 43:83-8,2006

[学会発表] (計 13 件)

1. 大塚宜一、藤井徹、岡田卿、山川陽子、和泉裕久、清水俊明、山城雄一郎. 新生児壊死性腸炎の予防を見据えた Probiotics および n-3 系多価不飽和脂肪酸投与について-消化管粘膜に与える影響を中心に-. 周産期シンポジウム 2008/1/19 高崎

2. 大塚宜一. 炎症予防を見据えた n-3 系多価不飽和脂肪酸投与について. 第 17 回日本脂質栄養学会 2008/9/5 大阪

3. Ohtsuka Y, Yamakawa Y, Fujii T, Okada K, Izumi H, Nagata S, Shimizu T, Yamashiro Y.

Anti-inflammatory effects of DHA and EPA on premature rats' intestine. ASPR 2008/5/3 Hawaii

4. 大谷清孝, 大塚宜一, 幾瀬圭, 山川陽子, 藤井徹, 工藤孝広, 永田智, 清水俊明. 炎症性腸疾患における血清サイトカイン値と局所粘膜でのシグナル伝達物質の発現の検討. 第 35 回小児栄養消化器肝臓学会 東京. 2008/10/11-12.

5. 幾瀬圭, 大塚宜一, 山川陽子, 吉川尚美, 鈴木光幸, 藤井徹, 東海林宏道, 佐藤洋明, 永田智, 清水俊明. 新生児・乳児期における消化管アレルギーの病態の検討. 第 35 回日本小児栄養消化器肝臓学会, 東京. 2008/10/11-12.

6. 大塚宜一、藤井徹、岡田卿、山川陽子、和泉裕久、清水俊明、山城雄一郎. 新生児壊死性腸炎の予防を見据えた Probiotics および n-3 系多価不飽和脂肪酸投与について-消化管粘膜に与える影響を中心に-. 周産期シンポジウム. 2007/1/19 大阪

7. Ohtsuka Y, Yamakawa Y, Okada K, Fujii T, Izumi H, Kuko T, Nagata S, Shimizu T,

Yamashiro Y. Preventive effects of n-3 LCPUFA on inflammatory gene expression in premature rats' intestine. ESPGHAN 2007/5/10 Barcelona

8. Ohtsuka Y, Yamakawa Y, Okada K, Fujii T, Izumi H, Kuko T, Nagata S, Shimizu T,

Yamashiro Y. Effects of DHA and EPA on inflammatory gene expression in premature rats' intestine. 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology. 2007/7/11 Tokyo

9. Y. Ohtsuka. Effects of Probiotics on the Immunological Development and Short Chain Fatty Acids in ELBW and VLBW infants. Pediatric Academic Societies' Annual Meeting. 2006/4/30 San Francisco

10. Kudo T, Aoyagi Y, Nagata S, Fujii T, Wada M, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 mutation may cause a subset of ulcerative colitis. 39th ESPGHAN Annual meeting, Dresden, Germany. 2006

11. Okada K, Fujii T, Ohtsuka Y, Izumi H, Oshida K, Shimizu T, Yamashiro Y. N-3 PUFA can attenuate inflammation in NEC using Premature rat infants. Pediatric Academic Societies Annual Meeting. San Francisco. 2006

12. Yamakawa Y, Ohtsuka Y, Okada K, Fujii T, Izumi H, Shimizu T, Yamashiro Y. Effects of n-3 LCPUFA on inflammatory gene expression in premature rats' intestine. 2nd ASPR, Yokohama. 2006

13. 山川陽子, 大塚宜一, 藤井徹, 大谷清孝, 工藤孝広, 永田智, 清水俊明. クロウン病における Th2 サイトカインとシグナル伝達の検討. 第 33 回日本小児栄養消化器肝臓学会. 大阪. 2006.10

〔図書〕（計 3 件）

1. 大塚宜一, 清水俊明. 新生児壊死性腸炎の予防を見据えた Probiotics および n-3 系多価不飽和脂肪酸投与について -消化管粘膜に与える影響を中心に-. 周産期学シンポジウム 26:89-96, 2008
2. 大塚宜一, 藤井徹, 山城雄一郎. アレルギー疾患. 機能性食品素材 プロバイオテイクス・プレバイオテイクス・バイオジェニクス 腸内細菌の関わりを中心としたその研究と意義. 光岡知足編集 日本ビフィズス菌センター監修 248-251, 2006
3. 藤井徹, 大塚宜一, 山城雄一郎. 未熟児（新生児）の重症感染、壊死性腸炎の予防. 機能性食品素材 プロバイオテイクス・プレバイオテイクス・バイオジェニクス 腸内細菌の関わりを中心としたその研究と意義. 光岡知足編集 日本ビフィズス菌センター監修 267-269, 2006

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 宜一 (OHTSUKA YOSHIKAZU)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90338335

### (2) 研究分担者

清水 俊明 (SHIMIZU TOSHIAKI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30260889

永田 智 (NAGATA SATORU)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70266055

藤井 徹 (FUJII THORU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30420855