

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390215

研究課題名(和文) サイトカイン・遺伝子発現および遺伝子多型解析による新生児疾患の免疫学的病態解析

研究課題名(英文) Immunological analysis of neonatal diseases by profile assays of cytokines, cytokine-related genes and transcription factors

研究代表者

高橋 尚人 (Takahashi, Naoto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50197159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：新生児疾患の病態を検討するために、サイトカイン、転写因子のプロファイル等を解析し、また早産児疾患と遺伝子多型との関連を検討した。慢性肺疾患を発症した児では複数の血清サイトカインが高値で、吸入ステロイド療法により一部が低下した。遺伝子多型解析では、脳室周囲白質軟化症とVEGFA、未熟児網膜症とITPKC、酸素投与期間とVEGFAの各遺伝子多型の関連が示唆された。臍帯血中のTGF- β 1と β 2は著しく高値で周産期における生理的・病的意義が大きいと考えられた。また、その他の各種新生児疾患でサイトカインプロファイルの解析により多くの知見を得られたので、論文報告した。

研究成果の概要(英文)：To investigate immunological pathophysiology, we analyzed cytokine profiles, gene expressions and profiles of cytokine-related transcription factors in neonatal patients. We also investigated relationship between diseases and cytokine-related single gene nucleotide polymorphisms (SNP) in premature infants. The high serum levels of several cytokines were found in patients with chronic lung disease (CLD) and IL-6 and MCP-1 levels were decreased with inhalation corticosteroid. We did not find any significant difference in transcription profiles in peripheral white blood cells between groups of CLD and non-CLD. We found significant relationship between prevalence of PVL and VEGFA SNP, and prevalence of ROP and ITPKC SNP. We found TGF- β 1 and β 2 were at very high levels in cord blood and they showed significant relationship with clinical findings in neonatal patients. We investigated cytokine profiles in neonatal patients with several diseases and reported them as the case reports.

研究分野：新生児および早産児の各種病態についての免疫学および感染症学的解析

キーワード：免疫学 新生児 早産児 臍帯血 サイトカイン 遺伝子多型 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児疾患の病態にサイトカインが重要な役割を果たしているという報告が続いていた。先行研究として、1996年に Yoon らが IL-6 と脳室周囲白質軟化症 (PVL) の関係を報告していたが (Am J Obstet Gynecol 1996) Heep らも 2003 年に同様の結果を報告し (Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed) その後、Hansen-Pupp らは IFN α と PVL の関係を報告した (Pediatr Res 2005)。また、PVL と並んで、早産児の予後に大きく関わる慢性肺疾患 (CLD) についても、Huang らが IL-8 との関係を報告していた (Pediatr Res 2005)。以前は、採血量の制限から複数サイトカインの同時測定については、数種類程度が限界であったが、2004 年に Hodge らが suspension array 法を用いて合計 100 種類という微量検体による 12 種類のサイトカインプロファイルを報告し (Clin Exp Immunol 2004) その後、Matoba らが 27 種類の臍帯血サイトカインプロファイルを報告するようになっていた (Pediatrics 2009)。CLD についても 2009 年に、Abbalavanan らが 25 種類のサイトカインの検討から、IL-1 β 、IL-8、IL-6、IL-10、IFN α などの関与を報告していた (Pediatrics)。しかし、まだ経時的な解析についてはなされていなかった。

(2) このように、児自身の免疫応答と病態との関係が明らかになる中、サイトカイン分子の遺伝子多型と疾患発症頻度との関係も各国から報告されるようになっていた。Resch ら (Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2009) および Reiman らは (Ped Res 2009) IL-6 G(-174)C 多型が PVL と関係があるとし、CLD についても、Kwinta らが VEGF T(-460)C 多型がその発症に関係があるとした (Ped Res 2008)。しかし、まだ日本人における、そのような早産児・新生児疾患と遺伝子多型の関連の報告は全くない状況だった。

(3) 本研究の代表者も、新生児疾患の病態を免疫学的に明らかにする試みを続け、臍帯血好中球の Fc γ R の発現 (Takahashi N et al. Arch Dis Child; 70:F31-35,1994) や、腎移植後免疫抑制剤服薬母体における B 細胞の変化 (Takahashi N et al. Transplantation 57;1617-1621,1994) 臍帯血 T 細胞の免疫寛容の易誘導性 (Takahashi N et al. J Immunol 1995;155:5213-19) などを報告していた。この過程で、1990 年代に本邦に急速に蔓延した新しい新生児疾患を報告し (Takahashi N et al. Arch Dis Child 1995) その原因をスーパー抗原性外毒素 TSST-1 であると特定し (Takahashi N et al. Lancet 1998; 351:1614-19.)、病態を詳しく報告した (Takahashi N et al. J Clin Invest 2000; 106:1409-1415。)この疾患は現在、新生児 TSS 様発疹症 (NTED) と呼ばれている。我々も、サイトカインプロファイルについては、

suspension array 法の報告の当初から、早産児の病態解析における、その有用性を認識し、機器を購入し、微量検体によるサイトカインプロファイルの解析を開始していた。その結果として、早産児であってもセレウス菌感染症では cytokine storm が惹起されていることや NTED において抑制性サイトカイン IL-10 の特異的高値がみられることなどを論文として報告した。このように、我々はサイトカインのプロファイルによる免疫学的病態解析を始めている状況であったが、まだ、早産児・新生児の各種疾患におけるサイトカインの役割および免疫学的病態は不明のことが大変多い状況であった。

2. 研究の目的

(1) 早産児の主要な疾患について、免疫学的病態を明らかにする。

主な対象疾患は CLD、PVL、および NTED 等の感染症とし、これらの疾患を発症した児において、サイトカインプロファイルを経時的に測定し、その特徴を明らかにする。また、これらを調節する転写因子プロファイル及び遺伝子等の発現パターンも同時に測定し、実際に児の免疫細胞中でどのような分子メカニズムが働いているかを明らかにする。

(2) 日本人の早産児の各種疾患とサイトカイン遺伝子多型との関連を明らかにする。

早産児の退院前に DNA を保存し、サイトカインに関連する遺伝子の多型解析を行い、臨床像と多型との関係を統計学的に解析する。CLD については VEGF を、PVL については IL-6 の多型を検討する。感染症を発症した児でも同様の解析を行い、感染症の重症度と遺伝子多型の関係も検討する。

(3) 新生児における種々の疾患における、サイトカインの重要性を明らかにする。

適宜、新生児の血清を保存し、サイトカインのプロファイリングを行う。また、臍帯血のサイトカインのプロファイリングも行い、胎児期におけるサイトカインの重要性についても検討を行う。

以上により、新生児・早産児の種々の疾患の免疫学的病態を詳細に検討し、今後の治療に役立てるようにする。

3. 研究の方法

(1) 施設：研究は主に自治医大小児科学教室と東京大学医学部小児科で行った。検体採取は自治医大、東京大学、東京女子医大、獨協医大、都立墨東病院の各 NICU で行った。それぞれの施設で倫理委員会への申請を行い、保護者の同意を得て、検体採取と保存を行った。

(2) 対象：上記 5 施設の新生児・早産児において、CLD、PVL および NTED を含めた感染症など免疫応答が病態形成に重要な役割を果

たしていると考えられる疾患を研究対象とした。検体採取は1回につき末梢血 200 μ l で、臨床上、採血が必要と考えられる際に同時に採取するようにし、余分な痛みを加えないように配慮した。児の臨床経過にもよるが、早産児のCLDなどの場合は、急性期、増悪期、回復期の3回の検体採取を基本とした。これらの検体は保冷し、自治医大小児科に搬送し、血清を分離保存し、血球も凍結保存した。また、退院前に、遺伝子多型解析用に、末梢血 500 μ l を採取し凍結保存した。

(3) サイトカイン測定: assay および測定は、自治医大産科センターおよび東京大学小児科設置のBio-rad社のBio-plex systemを用いて行った。測定キットとして、代表者が比較対照データをもっている human 17-plex キットを用いた。17種類にはクラスI サイトカイン、クラスII サイトカイン、炎症性サイトカイン、造血因子、ケモカインなどが含まれる。

(4) 転写因子・遺伝子発現解析: 転写因子プロファイル、遺伝子発現プロファイルともに測定機器として上記のBio-plex systemを用いた。測定キットとして、転写因子については、Panomics社のProcarta Transcription Factor Kitを、遺伝子発現についてはPanomics社のQuantigene Plex 2.0を用いた。前者は白血球核抽出液と、転写因子の結合領域を含むDNAを反応させ、転写因子を回収、その後、溶出させる方法である。蛋白量を同時測定し、核抽出蛋白あたりの転写因子量で測定した。測定した転写因子はNF- κ B、STAT1, STAT3, STAT4, STAT5, GATA, SMAD, TFIIID, E2F1, CREB, HIF-1, MEF-2, NFAT, c-MYC, NeuroD1, IKAROSの16種類である。後者は内部コントロールをふくむ10種類の遺伝子発現をmRNA量として測定した。対象遺伝子として「目的」の項でも提示したサイトカインおよび転写因子の遺伝子を選択した。分離した末梢血血球から、whole cell lysateとし、mRNAを回収、凍結保存した。測定方法はbranched DNA法とxMAP法により、PCR増幅を行わず定量した。この方法は定量性に優れ、感度特異度とも高いとされていた(Canales et al. Nature biotechnology 2006)。

(5) 遺伝子多型解析: 対象児の退院前に採血した末梢血血球のLysateを用いた。当初、2つの遺伝子多型のみを対象とし遺伝子多型を含むDNA領域の制限酵素断片長多型または直接シーケンシングにより解析するとしていたが、計画を変更し、10種類の遺伝子多型をターゲットとし、解析法もより簡便なTaqMan sample-to-SNP kitを用いることとし、自治医大小児科設置のApplied Biosystem社の7500Fast SNPによるreal-time PCR法で解析した。

(6) 統計学的解析: 連携研究者の上原氏と共同で、解析ソフトSPSSにより、単変量、多変量解析ともに用いて行った。途中から、自治医大産婦人科高橋佳代氏にも参加してもらい、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 慢性肺疾患(CLD)とサイトカイン・転写因子の関連解析

CLDを発症した極低出生体重児(VLBW)19例と発症していないVLBW21例において、血清サイトカインを比較した。CLD群で、血清IL-6、IL-8、TNF、IL-1、MCP-1、IL-13、G-CSFが有意に高値となっていることを確認した。次に、CLD発症群において、吸入ステロイド療法を導入し、その前後でサイトカインを比較した。図1のように、吸入ステロイド療法により、IL-6とMCP-1が低下することが確認された。しかし、CLD児で上昇のみられた他の5種類のサイトカインは依然として高値のままだった。以上から、CLD発症には複数のサイトカインが関連していること、吸入ステロイドがIL-6とMCP-1抑制に働いていることが理解された。

次に、NF- κ Bを含めた16種類の末梢白血球核内転写因子をCLD発症群と非発症群の間および発症群では吸入ステロイド療法導入の前後で比較検討した。発症群と非発症群、吸入療法導入前後のいずれの比較でも、どの転写因子についても有意差はみられなかった。遺伝子発現解析についても、有意な結果は得られなかった。

以上から、ステロイド吸入療法の効果は肺に直接作用しており、末梢白血球には影響していないものと考えられた。これらの結果は2013年メルボルンで行われた世界小児科学会で発表した。

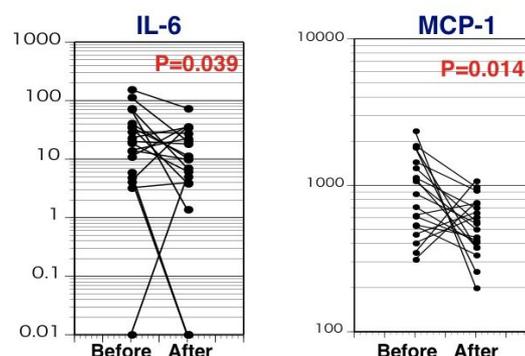


図1 ステロイド吸入療法導入前後での変化

(2) 早産児の各合併症と10の免疫関連遺伝子多型との関連

32例の極低出生体重児の末梢白血球のDNAを回収し、その臨床像と10種類のSNPの関連を解析した。表1のように、PVLではVEGFAのrs699947のAアレルが有意に発症に関わり、ROP(未熟児網膜症)ではITPKCのrs29493229のCアレルが発症に関連する傾向

がみられた。また、酸素投与期間と VEGFA(rs699947)の間では、A アレルが抑制的に働く可能性が示唆され、在宅酸素療法導入と IL-6R(rs6687726)および TNF 遺伝子(rs1800629)の多型が関連している可能性が示唆された。

これらの結果は第 59 回日本未熟児新生児学会で発表した。

合併症	Gene	SNP	Genotype	n/total	P
PVL	VEGFA	rs699947	AA	1/3	0.007
			AC	0/15	
			CC	0/14	
ROP	ITPKC	rs29493229	CC	1/1	0.055
			CG	2/12	
			GG	2/19	

呼吸管理	Gene	SNP	Genotype	n/total	P
酸素投与期間 (>30日)	VEGFA	rs699947	AA	0/3	0.007
			AC	12/15	
			CC	12/14	
在宅酸素療法	IL-6R	rs6687726	AA	4/11	0.059
			AG	1/13	
			GG	0/7	
	TNF	rs1800629	AA	1/1	0.054
			AG	0/2	
			GG	4/25	

表 1 早産児疾患と各種遺伝子多型の関連解析

(3) 新生児各疾患におけるサイトカインプロファイル解析

① リステリア感染症の早産児のサイトカインプロファイルについて、早産児でも非常に強い免疫応答があり、十分な感染抵抗性を示した例として Pediatrics Int に報告した。

② ミルクアレルギーの新生児例で特徴的な IL-5 のみの産生亢進を確認し、米国小児科学会誌 Pediatrics に報告した。

③ 早産児で胎内発症の Hemophagocytic Lymphohistiocytosis の症例において、臍帯血で必ずしも多種類の高サイトカイン血症にはなっておらず、IL-6、IL-8 を中心としたいくつかのサイトカインが重要な役割を果たしていることを J Pediatr Hematol Oncol に報告した。

④ 単純ヘルペスウイルス感染による Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH) の症例について、特徴的なサイトカイン経過を論文報告した。

⑤ 世界初例と考えられる母体SSA抗体陽性例でのHLH例のサイトカインプロファイルを J Perinatology に論文報告した。

⑥ 心嚢液貯留合併の21トリソミー児において、心嚢液中のサイトカインがIL-6、IL-8を中心に異常高値で、ステロイド療法で改善することを第50回日本周産期医学会で発表した。

⑦ 早産児のリステリア感染症における血清および髄液中のサイトカインプロファイルの特徴を第51回日本周産期・新生児医学会で報告予定である。

⑧ スーパー抗原性外毒素による新生児TSS様発疹症の免疫学的病態を Microbiol Immunol に Review として掲載した。また、新生児感染症とサイトカインの関係を和文の学会誌や周産期医学などの雑誌に総説として掲載した。

(4) 臍帯血中の TGF-

早産児・正期産児をふくめ 122 例の臍帯血を採取した。臍帯血中の TGF- の 3 つの isoform の測定・解析を行い、以前測定した 17 種類のサイトカインとの関係および臨床像との関係を検討した。臍帯血 TGF 1 と 2 は、図 2 のように、他のサイトカインと比較し著しく高値で、他のサイトカインとは相関関係がなかった。また、図 3 のように、TGF-

1 は在胎週数、出生体重、1 分後 Apgar score、血小板値と有意な関係があり、性差、胎児発育遅延(FGR)と関連が見られた。

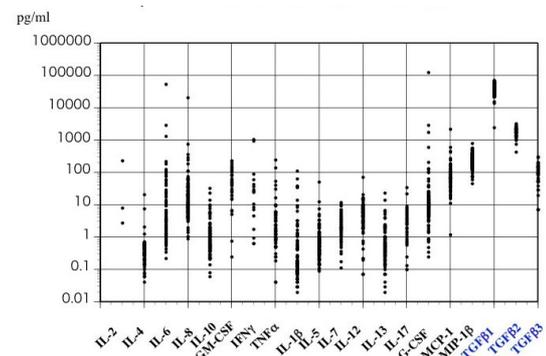


図 2 臍帯血における TGF isoform と他の 17 種類のサイトカインの血中濃度

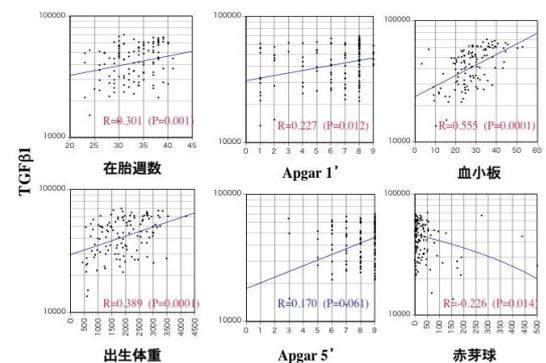


図 3 臍帯血 TGF 1 と臨床像との関連

一方、妊娠高血圧症候群 (PIH) や絨毛膜羊膜炎 (CAM) などの周産期所見の有無は TGF の血中濃度には有意な影響を与えていなかった。一方、早産児では臍帯血 TGF 1 低値が CLD 発症と (P=0.03)、TGF 1 高値が動脈管閉存症 (PDA) 発症と関連がある (P=0.014) 可

能性が示唆された。

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 13 件)

① Takahashi N, Takahashi K, Kobayashi M, Yada Y, Koike Y, Kono Y. Constitutively high-level expression of TGFbeta isoforms in cord blood and its relationship to perinatal findings. *Cytokine* 査読有、73、2015、101-107、
DOI:10.1016/j.cyto.2015.01.024

② 高橋尚人：新生児感染症とサイトカイン。周産期医学、査読なし、44 巻増刊号、2014、301-306

③ 高橋尚人：新生児 TSS 様発疹症。周産期医学、査読なし、44 増刊号、2014、597-601

④ Takahashi N, Imanishi K, Uchiyama T. Overall picture of an emerging neonatal infectious disease induced by a superantigenic exotoxin mainly produced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* 査読有、57、2013、737-745、
DOI:10.1016/j.immuni.2013.06.019

⑤ Suzuki Y, Takahashi N, Yada Y, Koike Y, Matano M, Kono Y. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in a newborn infant born to a mother with Sjogren syndrome antibodies. *J Perinatol* 査読有、33、2013、569-571。
DOI: 10.1038/jp.2012.147

⑥ 高橋尚人：新生児 TSS 様発疹症(NTED)。日本臨床 別冊「感染症症候群(第2版X下) 査読なし、No.25、2013、p717-720

⑦ 高橋尚人：新生児疾患とサイトカイン。日本小児科学会雑誌 査読なし、116、2012、509-515。

⑧ 高橋尚人、西巻滋：早産児の炎症性疾患への対応-CLDとHLHへの新たな戦略を求めて - 日本未熟児新生児学会雑誌 査読なし、24(2)、2012、237-240。

⑨ 高橋尚人：新生児感染症とサイトカイン。小児科診療 査読なし、75(9)、2012、1538-1540。

⑩ Kojima K, Takahashi N, Yada Y, Koike Y, Matano M, Kono Y, Momoi MY. White matter damage in a neonate of disseminated herpes simplex virus infection. *Pediatr Int* 査

読有 54(3)、2011、409-12。
DOI:10.1111/j.1442-200X.2011.03428.x

Maruyama A, Takahashi N, MD, Gunji Y, Morimoto A, Yada Y, Koike Y, Momoi MY. Congenital hemophagocytic lymphohistiocytosis in a preterm infant: Cytokine profile and a review of the disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 査読有、33、2011、e209-e212
DOI:10.1097/MPH.0b013e318219fd63

Kawamata R, Takahashi N, Yada Y, Koike Y, Kono Y, Momoi MY. Cytokine profile of a premature infant with early-onset listeriosis. *Pediatr Int* 査読有、53、2011、386-8
Doi:10.1111/j.1442-200X.2011.03375.x.

Koike Y, Takahashi N, Yada Y, Kawamata R, Sato Y, Momoi MY. Selectively high level of serum interleukin 5 in a newborn infant with cow's milk allergy. *Pediatrics*、査読有、127 巻、2011、231-234
DOI: 10.1542/peds.2009-2318

[学会発表](計 7 件)

① 野村智章、高橋尚人、高橋秀弘、畠中大輔、草刈倫子、中村利彦、蒲原孝。先天性リステリア感染による脳室炎を発症した超早産児の血清・髄液中サイトカインプロファイルの検討。第 51 回に本週産期・新生児医学会 2015 年 7 月、福岡

② 設楽佳彦、真船亮、伊藤淳、西村力、土田晋也、岡明、高橋尚人。好酸球性心嚢液貯留に対しステロイド療法が著効した TAM 合併 21 トリソミーの 1 例。第 50 回日本周産期・新生児医学会、2014 年 7 月、浦安市

③ 高橋尚人、矢田ゆかり、小池泰敬、俣野美雪、鈴木由芽、河野由美、渡部功之、鈴木宏：極低出生体重児の臨床像と免疫関連分子の遺伝子多型との関連の解析。第 58 回日本未熟児新生児学会 2014 年 11 月、松山市。

④ Takahashi N, Yada Y, Koike Y, Matano M, Suzuki Y, Nishimura H, Suzumura H, Watabe H, Kono Y. Changes in profiles of serum cytokines and nuclear transcription factors induced by corticosteroid inhalation treatment in very low birth weight infants with chronic lung disease. *International Congress of Pediatrics 2013*, Melbourne Australia, 24-29 August, 2013.

⑤ 高橋尚人、上原里程、矢田ゆかり、小池泰敬、俣野美雪、鈴木由芽、西村仁、河野由美。臍帯血 TGFβ isoform と周産期所見および他のサイトカインとの関係。第 116 回日

本小児科学会 2013年4月、広島市

⑥ 高橋尚人、上原里程、矢田ゆかり、小池泰敬、俣野美雪、鈴木由芽、西村仁、桃井真理子。第115回日本小児科学会、臍帯血TGF β isoform と周産期所見および他のサイトカインとの関係、福岡、2012年4月20日～22日

⑦ 高橋尚人、矢田ゆかり、小池泰敬、俣野美雪、鈴木由芽、西村仁、鈴木宏、渡部功之。慢性肺疾患発症の極低出生体重児における吸入ステロイド療法の血中サイトカインおよび核内転写因子プロファイルに与える影響の検討。熊本、11月25日、第57回日本未熟児新生児学会 2012;24:515.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nicu.umin.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋尚人 (TAKAHASHI, Naoto)
東京大学・医学部・准教授
研究者番号: 50197159

(3) 連携研究者

久米晃啓 (KUME, Akihiro)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10264293

上原里程 (UEHARA, Ritei)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90276999

今西健一 (IMANISHI, Kenichi)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20132920

楠田聡 (KUSUDA, Satoshi)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50372983

鈴木宏 (SUZUMURA, Hiroshi)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50216470

(4) 研究協力者

土田晋也 (TSUCHIDA, Shinya)
東京大学・医学部・講師

西村力 (NISHIMURA, Riki)
東京大学・医学部・助教

渡部功之 (WATABE, Hiroyuki)
獨協医科大学・医学部・助教

河野由美 (KONO, Yumi)
自治医科大学・医学部・教授

小池泰敬 (KOIKE, Yasunori)
自治医科大学・医学部・講師

矢田ゆかり (YADA, Yukari)
自治医科大学・医学部・准教授

俣野美雪 (MATANO, Miyuki)
自治医科大学・医学部・助教

鈴木由芽 (SUZUKI, Yume)
自治医科大学・医学部・助教

高橋佳代 (TAKAHASHI, Kayo)
自治医科大学・医学部・非常勤講師