

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 5 年 6 月 1 1 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22591211
研究課題名（和文）	胎内肺傷害後の重症新生児慢性肺疾患患児における細胞外酸化還元環境の破綻
研究課題名（英文）	The redox environment surrounding lung epithelia is collapsed in the infants exposed antenatally to placental infection with subsequent bronchopulmonary dysplasia
研究代表者	
荻原 享	(Ogihara Tohru)
	大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：	00211128

## 研究成果の概要（和文）：

胎盤感染が先行した場合の、新生児慢性肺疾患重症化の要因の一つに、肺内酸化還元環境の破綻を想定し、在胎 32 週未満の早産児の、肺胞上皮被覆液中の低分子抗酸化物質の酸化還元状態を測定した。その結果、胎盤感染を伴い、臍帯血の IgM、KL-6 が高い例では、出生後 4-8 日目の肺胞上皮被覆液中の dehydroascorbic acid / ascorbic acid 比、および、GSSG / GSH 比が、共に高値を示すことが明らかとなった。特に、dehydroascorbic acid / ascorbic acid 比は、臍帯血の IgM、KL-6 と強い相関関係にあった。

## 研究成果の概要（英文）：

Although there is little clinical evidence about whether or not lung injury practically occurs in fetuses with chorioamnionitis, this possibly means that some of the infants with BPD had already suffered parenchymal lung injury while in utero. We have previously shown that, in most of moderate/severe BPD infants, the plasma KL-6 level was already increased in the cord blood plasma, especially when the infants were exposed to chorioamnionitis. Therefore, it seems likely that prenatal lung injury associated with chorioamnionitis usually has a priming effect that predisposes fetal lungs to become more susceptible to subsequent toxic agents, rather than lung injury being directly induced by intrauterine infection. Recently, it is gradually known that the redox environment surrounding cells / tissues possibly influence the cellular viability such as growth, differentiation, or apoptosis. We hypothesized that the redox environment of pulmonary epithelial lining fluids may be collapsed when the infants were exposed to placental infections, and may lead to the development of severe BPD because of impaired growth / differentiation of their lungs. We measured the oxidized to reduced ratio of major small-molecular antioxidants in pulmonary epithelial lining fluids such as ascorbic acid, glutathione, and uric acid in the preterm infants born before 28 week gestation. As a result, both of the ratios of dehydroascorbic acid / reduced ascorbic acid and glutathione disulfide / reduced glutathione were increased in the infants with placental infections subsequently developed BPD. Especially, dehydroascorbic acid / reduced ascorbic acid ratio was in good correlation with the values of IgM and KL-6 in cord blood plasma. Therefore, it was clearly shown that the redox environment of pulmonary epithelial lining fluids was dysregulated in the infants with placental infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：新生児慢性肺疾患、グルタチオン、アスコルビン酸、レドックス、酸化還元電位

1. 研究開始当初の背景

背景

1). 最先端の新生児医療は、在胎 22 週、出生体重 400 g という、おそらく現時点で人類が提供しうる strategy の範囲内での、救命限界点にまで達しているが、本質的に、胎外生活に順応するための準備期間を、完全にスキップしているため、超早産児の肺は極めて未熟で、最大限の呼吸補助によって、かろうじて生命を維持できるのであって、たとえ新生児早期を乗り切っても、高濃度酸素や人工呼吸器による陽圧に暴露され、肺胞発育の停止や間質の線維化を招くに至る。つまり、本来、水系で発育すべき胎児肺を大気に晒すという極めて‘不自然’な過程の集大成こそが新生児慢性肺疾患 (CLD) の本質であり、換言すれば 100% 人為的な超早産児治療の宿命ともいべき疾患であって、その克服は新生児医療最大の課題の一つである。実際、呼吸管理の進歩によって、圧損傷を主な原因とする古典的な CLD は減少しているが、早産児の救命率の向上と共に、重症 CLD は決して減っておらず、今でも主要な死亡原因の一つであり、さらに、長期的な神経発達に及ぼす影響も甚大である。

2). 胎盤感染や、絨毛膜下血腫など、胎児環境の悪化を伴った場合-いわゆる antenatal priming (出生前の発症誘導)-に、CLD が重症化しやすいことは、すでに良く知られているが、その mechanism はまだ全く解明されていない。我々は、肺組織特異的な傷害マーカーである、KL-6 を用いて、CLD 患児の血中 KL-6 が上昇すること、中でも antenatal priming のあとで重症化した例では著明な高値をとること、さらに、これらの症例では、臍帯血でも KL-6 がすでに上昇していることを見出した (Pediatric Research 2006)。この結果より、antenatal priming 例では直接肺胞上皮が胎内で傷害され、出生後の傷害因子に対する感受性を高め、CLD の重症化、遷延化を招くのではないかと考えた

3). 細胞内は、通常、高度に還元された環境にあるが、この細胞内酸化還元環境が、還元状態から酸化状態へと移行するにつれて、細胞の活動も、静止状態から、増殖、分化を経てアポトーシス、ネクローシスへと変化する。つまり細胞の活動状態は細胞内の酸化還元環境に大きく左右されるのである。細胞内酸化還元環境を主に規定しているのは、細胞内で圧倒的に多い glutathione であるが、量的にははるかに少ないものの regulator として極めて重要な、thioredoxin、glutaredoxin、peroxiredoxin などの thiol peptides も含めた、多彩な thiol 分子種も、細胞の活動状態に大きな影響を及ぼす。そして、細胞内の酸化還元環境は、細胞に接する体液中の thiol 分子 (主に Cysteine/Cystine couple) と密接に関連し、質的にも、量的にも、細胞内と、お互いにある種の‘不均衡な平衡状態’を保っていることが解明されてきた。

2. 研究の目的

Antenatal priming に、出生後傷害因子が加わって、肺胞上皮細胞内の酸化還元環境が変動すれば、その程度に応じて、細胞の活動状態は、分化増殖の抑制から、最終的には細胞死に至るまで、様々な障害を受ける可能性がある。出生後に、その状態を修復するためには、肺胞上皮細胞は、肺胞上皮被覆液 (epithelial lining fluid, ELF) 中の thiol 分子を取り込んで、細胞内で、新たな glutathione pool や thiol peptide を合成し、ELF との間の‘正常な’平衡状態を取り戻す必要がある。ELF の glutathione 濃度は他の体液に比べて異常に高く血漿中の数十倍に達する。従来報告では、CLD 患児の ELF 中 glutathione 濃度は control に比し有意に低下していることが知られている。以上の研究結果を踏まえ、我々は、antenatal priming 例では、ELF 中 glutathione 濃度の低下のみならず、肺胞上皮や、肺毛細血管内皮細胞自身と、それを取り巻く細胞外環境の、

広範な redox balance の破綻—cystine pool の枯渇、酸化ストレス過剰など—が根底にあるのではないかと推論し、まずは実際の臨床の場で検証するため、肺胞上皮細胞の細胞外環境、すなわち ELF と、肺毛細血管内皮細胞の細胞外環境、すなわち血漿を用いて、酸化還元環境を規定する glutathione、glutathione disulfide、cysteine、cystine、thioredoxin (S-S、SH) の濃度と、酸化ストレスマーカーを同時に測定し、CLD における肺内酸化還元環境の破綻—酸化傾向—を総合的に判定しようと考えた。また、glutathione と同様に、ascorbic acid と uric acid も、ELF 中の水溶性抗酸化物質とし極めて重要である。特に ascorbic acid は、glutathione と同様に ELF 中濃度が際立って高く、さらに、その酸化体である dehydroascorbic acid は、glutathione によって、元の還元型 ascorbic acid に還元されるので、この両者は、ある平衡状態でバランスを保って、気道内の抗酸化能の恒常性を維持している可能性がある。そこで、上記に加え、ascorbic acid と uric acid およびその酸化体である dehydroascorbic acid と allantoin も測定項目に加えることとした。

### 3. 研究の方法

#### 検体採取方法

ELF および血漿は、在胎 32 週未満のすべての気管内挿管患児より、出生当日(日令 0)、日令 3—5、および日令 7-10 の 3 ポイントを target として余剰検体を利用し、直ちに窒素充填後遠心分離、また ELF の一部は NICU 内で sulfosalicylic acid で除タンパクと酸性化を行い、窒素充填下で抗酸化物質を安定化させ研究室へ移送する。

#### 測定項目および測定方法

① glutathione / glutathione disulfide (GSH/GSSG)

我々の開発した HPLC-ECD (電気化学検出器) method(ref. Free Radic Biol Med 2005) を用いる。この方法は NEM trap と DTT 還元法を組み合わせた極めて高感度 (limit 10 picomol) かつ特異的な GSH 測定法である。

② ascorbic acid、dehydroascorbic acid および uric acid

HPLC-ECD (電気化学検出器) を用い、dehydroascorbic acid は、新しい還元剤である Tris[2-carboxyethyl]phosphine Hydrochloride (TCEP) を用いて還元する。

③allantoin

Anion exchange precolumn (SPELCO Discovery DSC-SAX) を通して精製した後、N-methyl-N-(tert-butyl)dimethylsilyl trifluoroacetamide (MTBSTFA) で誘導体化し、negative ion chemical ionization mode の GC/MS で測定する。

### ④ 酸化ストレスマーカー

#### A. アミノ酸酸化生成物

1). ortho-Tyrosine および meta-Tyrosine : Phenylalanine が hydroxyl radical の攻撃を受けると、通常の水酸化酵素による生成物 para-tyrosine (一般的なチロシン) ではなく、ortho あるいは meta の位置が水酸化された安定異性体を生じ、生体内での hydroxyl radical 生成のマーカーとして利用されている。

2). Di-tyrosine : para-Tyrosine が hydroxyl radical などで酸化されて生じる tyrosine dimer。タンパク酸化の最も信頼できるマーカーの一つである。

これらは、C18 前処理カラム (SUPELCO Discovery DSC-18) を通して精製した後、methyl-pentafluoroacetic acid derivative に誘導体化して negative ion chemical ionization mode の GC/MS で測定する。

#### B. 脂質過酸化生成物

1). ヒドロキシリノール酸

(hydroxy-octadecadienoic acid, HODE) : リノール酸の酸化物

2). イソプロスタン (8-iso-PGF2 $\alpha$ ) : アラキドン酸の酸化物。脂質酸化の最も信頼できるマーカーの一つである。

これらは、Sodium borohydride によりまず還元した後 KOH でケン化し、固層抽出を繰り返してサンプルをクリーンアップ、さらに BSTFA derivatization を行い、EI mode の GC/MS で測定する。

### ⑤ KL-6

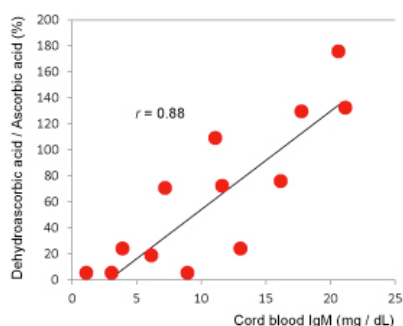
肺胞上皮特異的な肺傷害マーカーである。

ELISA 法を用いる。

⑥ ③ ④ の ELF 中濃度を算出するため、urea を、血中は BUN Kit 法で、また、ELF 中は negative ion chemical ionization mode の GC/MS で測定する。

### 4. 研究成果

当初は、GC/MS 法による cysteine /cystine 測定も含める予定であった。しかしながら、authentic な sample では、再現率、回収率とも満足の行くレベルであったが、実際の BALF では測定困難であったため計画を変更した。そのため、まだ、例数は、十分な統計学的検討を行うには不十分であるが、特に、胎盤感染を伴い、臍帯血の IgM、KL-6 が高い例では、出生後 4-8 日目の BALF 中 dehydroascorbic acid /ascorbic acid 比、および、GSSG / GSH



比が共に高値を示すことが明らかとなった。特に、dehydroascorbic acid / ascorbic acid 比は、臍帯血の IgM、KL-6 と強い相関関係にあった。今後は、allantoin / uric acid 比も加えて、urea 補正を行い、Nernst equation によって ELF 全体の half-cell redox potential を計算し、CLD との関連を迫及する予定である。

#### 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 3 件)

① Inatomi T, Oue S, Ogihara T, Hira S, Hasegawa M, Yamaoka S, Yasui M, Tamai H. Antenatal exposure to Ureaplasma species exacerbates bronchopulmonary dysplasia synergistically with subsequent prolonged mechanical ventilation in preterm infants. *Pediatr Res.* 査読有 71:267-73, 2012

② Ban R, Ogihara T, Mori Y, Oue S, Ogawa S, Tamai H. Meconium aspiration delays normal decline of pulmonary vascular resistance shortly after birth through lung parenchymal injury. *Neonatology.* 査読有 99:272-9, 2011.

③ 荻原 享 カルボニル化蛋白 *日本臨床* 68 Suppl 7 広範囲 血液・尿化学検査 査読無 第7版 p. 843-8, 2010.

[学会発表] (計 2 件)

① 近畿新生児研究会 招待講演  
Non-resolving inflammation としての CLD ~  
新たな視点から、次世代の予防・治療法を考  
える~2013 年 03 月 02 日 大阪

② 日本未熟児新生児学会 ワークショップ招  
待講演「早産児の炎症性疾患への対応」  
2011 年 11 月 13 日 東京  
荻原 享 「炎症性疾患としての CLD ー 視点  
を変えれば、新たな可能性が見えてくる」

[図書] (計 1 件)

① 荻原 享 新生児慢性肺疾患 今日の小児治  
療指針 第 15 版 p.153-4, 2012. 医学書院

[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

大阪医科大学周産期センター

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/nicu/shinseiji/aim/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

荻原 享 (Ogihara Tohru)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：00211128

##### (2) 研究分担者

大植 慎也 (Oue Shinya)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：40399085