

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462781

研究課題名(和文) 低出生体重児の腸管機能不全と消化管サーファクタントの関連性に関する研究

研究課題名(英文) Intestinal surfactant protein in the intestinal failure of low birth weight children

研究代表者

奥山 宏臣 (Okuyama, Hiroomi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30252670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：サーファクタント蛋白(SP)-A, Dは自然免疫に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、これまでの研究は呼吸器系に限られており、消化管におけるSPの働きは知られていない。まず、マウスの胎児消化管の検討を行うことでSPは胎児期後半から発現が認められた。早産児に好発する壊死性腸炎(NEC)は、未だに治療成績も不良である。NECにおいて腸管のSP欠乏が病態に影響を与える可能性がある。NECの状態を模したTLR4発現を亢進させた胎児腸管由来細胞株におけるLPS由来の炎症反応をSP-Dが抑制しうることを示した。これにより、NECの予防および重症化防止にSP-Dが有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Surfactant protein (SP)-A and -D is member of collectin, which plays an important role in innate immunity. The function of SP-A and -D has been studied mainly in the airway. We confirmed the expression of SP-A and -D in the murine fetal intestines and pancreas from the latter of the pregnancy. In human beings, SP-A is localized to airway, so we studied the function of SP-D in the human intestine. Necrotizing enterocolitis (NEC) remains life-threatening disease in the premature infants. NEC may depend on the TLR-4 overexpression in the immature (premature) intestines. Platelet activating factor (PAF) induced TLR-4 overexpression in human intestinal cell line INT407, originally derived from human embryonal intestines. The TLR-4 agonist lipopolysaccharide (LPS) induced IL-8 elevation in TLR-4 overexpressed INT407. Recombinant SP-D (full-length) significantly attenuated the inflammation in the above model. SP-D may have a protective effect in the development of NEC in preterm infants.

研究分野：小児外科

キーワード：SP-D 壊死性腸炎

1. 研究開始当初の背景

サーファクタント蛋白 (SP) は呼吸器系における自然免疫に重要な役割を果たすことが知られている。一方、SPは肺外にも存在しており、消化管にも認められることが知られていた。しかし、その生理学的意義は全く不明であった。

2. 研究の目的

新生児消化管疾患のなかでも特に重要な壊死性腸炎 (NEC) は自然免疫の破綻により発症すると考えられるため、SPが NEC 発症に果たす役割を検討し、その臨床的応用の可能性を検討する。

また、消化管自然免疫が重要な役割を果たす疾患の中に、胆道閉鎖症術後の胆管炎がある。繰り返す胆管炎は肝不全への進行をまねき、肝移植を必要とする患者も多い。胆道閉鎖症をふくめ、胆汁鬱滞性疾患における SP の局在を検討する。

3. 研究の方法

①マウス胎児および新生児の小腸・膵臓における SP-A および SP-D の発現を時系列で、免疫染色および Western blotting, RT-PCR をもちいて検討した。

②胆汁鬱滞性疾患として胆道閉鎖症、肝内胆管減少症および新生児肝炎の患者から得られた肝生検検体を使用した。(兵庫医科大学および大阪府立母子保健総合医療センター倫理委員会認可済) 対象として新生児・乳児の剖検例の肝臓標本を用いた。

SP-D の局在を免疫染色で検討し、その臨床像との相関を検討した。

③早産児における TLR4 の発現亢進が NEC の発症に重要な役割を果たすことから、NEC の細胞モデルとして、胎児腸管由来の INT407 に血小板活性化因子 (PAF) および LPS を作用させたモデルを作成した。これに SP-D を作用させることで炎症抑制効果を判定した。

4. 研究成果

① 胎生 15-18 日の timed-pregnant ICR マウス (正常妊娠期間 19-21 日) 胎児小腸と膵臓を用いた。対照として、成体のマウスを用いた。Day18 の胎児と成体の肺・膵臓・小腸を用い、蛋白量を肺 5 μ g, 膵臓・小腸 30 μ g と設定、SP-A, D の polyclonal 抗体を用いて Western blotting を行った。SP-A は成体の肺のみで、SP-D は成体の肺・小腸、胎児の肺・膵臓・小腸で発現が認められた。(Figure1)

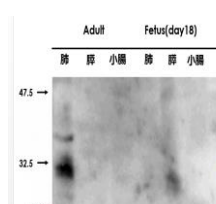


Figure 1A

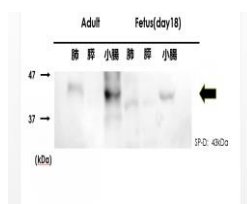
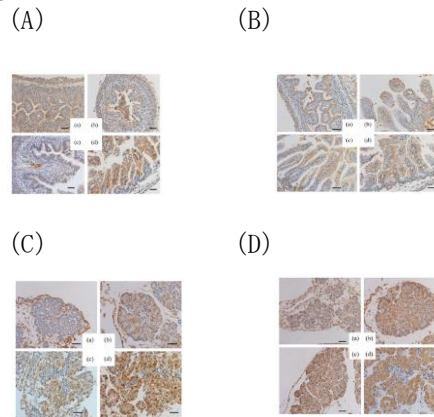


Figure 1B

垂鉛固定を行い、抗 SP-A/D 抗体を用いて免疫染色を行った。

胎生 16 日以降の小腸および膵臓の外分泌腺には SP-A および D が認められた。(Figure2)

Figure2 胎児組織免疫染色

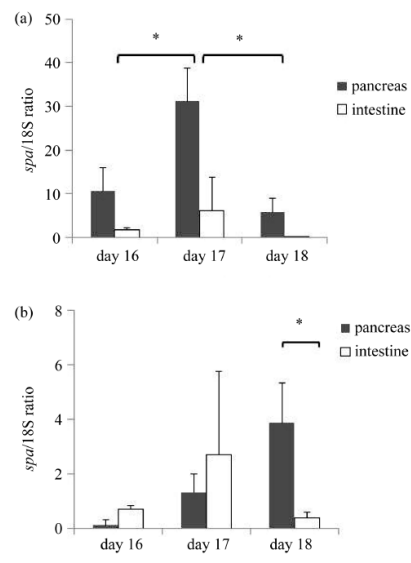


胎児小腸 (A) SP-A, (B) SP-D) および胎児膵臓 (C) SP-A, (D) SP-D) いずれも (a) day15, (b) day16, (c) day17, (d) day18.

RT-PCR では膵臓での SP-A, SP-D 産生が胎生期後半に多く認められることが示唆された。

(Figure3)

Figure 3 RT-PCR ((a) SP-A, (b) SP-D)



胎児期後半から新生児期にかけては腸管内の SP は膵臓からの分泌によるものも寄与していると考えられた。実際の新生児消化管における SP の研究に有用であると考えられた。

②患者背景を Table 1 に示す。正常の肝臓では SP-D は肝内胆管の内皮に認められるが、肝細胞では染色を受けなかった。(Figure4) 一方、胆汁鬱滞性疾患では肝細胞が強く染色された。新生児肝炎 (Figure5) では肝内胆管も染色を受けたが、胆道閉鎖症 (Figure6) と肝内胆管減少症 (Figure7) では染色はほとんど受けなかった。

Table 1

Demographics of infants with cholestatic liver diseases.			
	BA (n = 7)	NH (n = 2)	PIBD (n = 4)
Age (day)	62 (16-90)	63, 70	49 (24-68)
T-Bil (mg/dl)	7.8 (7.4-11.1)	3.4, 9.0	6.2 (5.4-8.5)
D-Bil (mg/dl)	4.9 (3.9-7.9)	1.5, 6.1	4.9 (3.5-5.6)
AST (IU/L)	150 (83-263)	109, 110	104 (84-123)
ALT (IU/L)	58 (41-193)	70, 141	88 (54-103)

The data are expressed as the median (range), except for the NH group.
BA: biliary atresia, NH: neonatal hepatitis, PIBD: paucity of intrahepatic bile duct.

Figure 4 剖検例

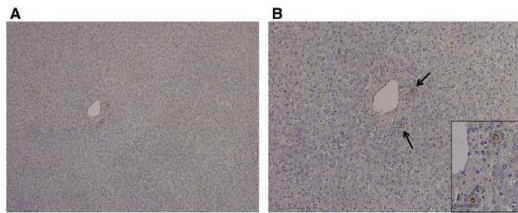


Figure 5 新生児（乳児）肝炎

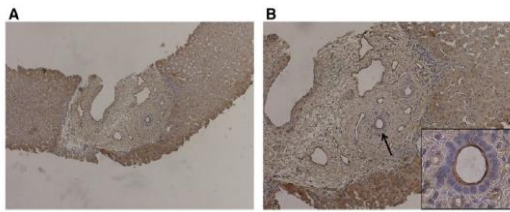


Figure 6 胆道閉鎖症

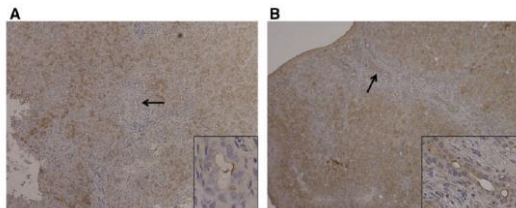


Figure 7 肝内胆管減少症

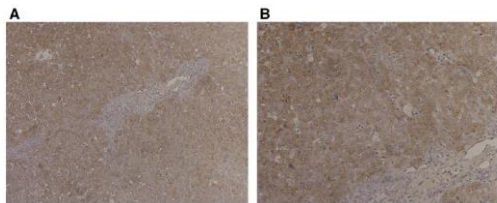
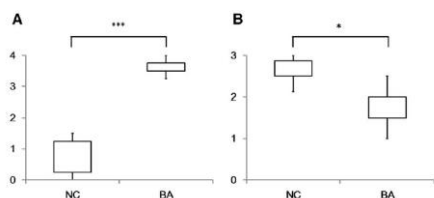


Figure 8 免疫染色スコア

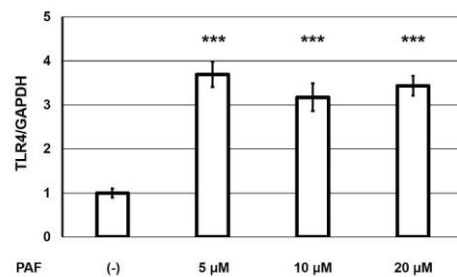


比較検討のために免疫染色スコアとして、独立した二人の評価者によるスコアリングを行った。肝細胞では0：陰性，1：門脈周囲がわずかに染色を受ける，2：局所的あるいはびまん性に門脈周囲が染色される，3：さらに周辺まで染色される，4：ほぼすべての肝細胞が染色される。胆管では，肝内胆管もしくは増生した細胆管において，染色を受けている胆管を0：なし，1：<25%，2：25-50%，3：>50%とした。Figure 8に示すように，肝細胞では胆道閉鎖症で強く染色され，胆管では弱く染色された。

これらの知見から，SP-D は肝臓においては，肝細胞で産生され胆管へと排泄されることが示唆された。今後の胆管炎の発症メカニズム探究に有用であると思われる。

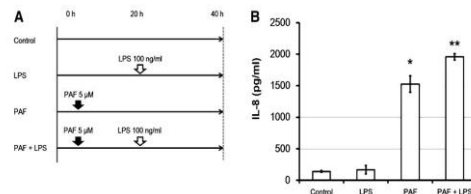
③胎児腸管由来の細胞株である INT407 を用いた。胎児腸管の特徴である TLR4 発現亢進を引き起こすために，血小板活性化因子 (PAF) を用いた。(Figure9)

Figure 9 PAF による TLR4 発現亢進



PAF 5 μM で TLR4 の発現は有意に上昇し，それ以上の濃度では濃度依存性の効果は見られなかった。TLR4 の発現を亢進させた INT407 に LPS を投与することで壊死性腸炎 (NEC) モデルを作成した。(Figure10)コントロール，LPS のみ，PAF のみ，PAF+LPS の 4 群で比較を行った。炎症の評価は NEC で高値を示す IL-8 を用い，ELISA で測定した。PAF+LPS 群は他 3 群に比べて有意な IL-8 の上昇を認め，NEC モデルとした。

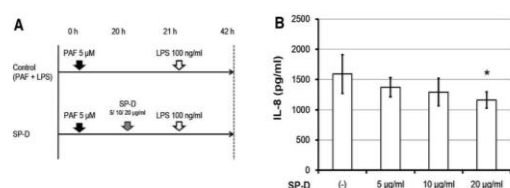
Figure 10 壊死性腸炎モデル



この炎症反応を SP-D が抑制しうるか検討を行った。SP-D はリコンビナント SP-D を用いた。SP-A はヒト腸管内には認められないことから，検討を行わなかった。SP-D を各種濃度

で前投与し、IL-8の変動を検討した。(Figure11)

Figure 1 1 SP-Dの炎症抑制効果



SP-Dの濃度を上げるに従いIL-8は低下し、20 μg/mlでコントロールに比べて有意な低下を示した。

SP-Dは生体内に広く存在し、ヒト消化管内にも認められる。このことから毒性は考えにくく、また、自己消化も受けにくいと推察される。SP-DによるNECの予防、重症化防止の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3件)

① The Expression of Surfactant Proteins A and D in the Intestines and Pancreas of Murine Fetuses

Saka R, Okuyama H, Uchida K, Nakahira K, Sasaki T, Nose S, Nakayama S, Fukuzawa M, Yanagihara I. *Open J Pediatr*. 2014 Mar;4(1):12-20.

② Immunolocalization of surfactant protein D in the liver from infants with cholestatic liver disease.

Saka R, Yanagihara I, Sasaki T, Nose S, Takeuchi M, Nakayama M, Okuyama H. *J Pediatr Surg*. 2015 Feb;50(2):297-300. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.11.020. Epub 2014 Nov 10.

③ Surfactant protein-D attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammation in human intestinal cells overexpressing toll-like receptor 4.

Saka R, Wakimoto T, Nishiumi F, Sasaki T, Nose S, Fukuzawa M, Oue T,

Yanagihara I, Okuyama H. *Pediatr Surg Int*, Vol 32, Issue 1, 59-63, 2016

[学会発表] (計5件)

① 乳児期胆汁鬱滞性疾患における肝内 surfactant protein Dの検討. 第50回日本小児外科学会学術集会, 東京. 2013. 5. 30-6. 1. 阪龍太, 奥山宏臣, 佐々木隆士, 野瀬聡子, 柳原格, 中山雅弘

② Immunolocalization of surfactant protein D in the liver from infants with cholestatic liver disease. 61th International Conference, British Association of Pediatric Surgeons, Edinburgh, UK. 2014. 7. 23-25. Okuyama H, Saka R, Sasaki T, Nose S, Tsukada R, Yoneyama C, Yanagihara I, Nakayama M.

③ Surgical intestinal disorders in Very-Low-Birth-Weight infants. Royal College of Surgeons of Thailand (39), Pattaya, Thailand. 2014. 7. 10-7. 13. Okuyama H.

④ サーファクタント蛋白Dによるヒト腸管細胞におけるLPSによる炎症の制御. 第52回日本小児外科学会学術集会, 神戸. 2015. 5. 28-5. 30. 阪龍太, 奥山宏臣, 佐々木隆士, 野瀬聡子, 大植孝治

⑤ Surfactant protein-D attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammation in human intestinal cells overexpressing toll-like receptor 4. The 28th International Symposium on Paediatric Surgical Research, Dublin, Ireland. 2015. 9. 24-26. Okuyama H, Saka R, Wakimoto T, Nishiumi F, Sasaki T, Nose S, Fukuzawa M, Yanagihara I.

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 宏臣 (Okuyama Hiroomi)
大阪大学 大学院医学系研究科教授
研究者番号: 30252670

(2) 研究分担者

阪 龍太 (Saka Ryuta)
大阪大学 大学院医学系研究科 助教
研究者番号: 00459190

久保 秀司 (Kubo Syuji)
兵庫医科大学 医学部 教授
研究者番号: 10441320

佐々木 隆士 (Sasaki Takashi)

兵庫医科大学 医学部 講師
研究者番号： 20388573

柳原 格 (Yanagihara Itaru)
大阪府立母子保健総合医療センター
研究所 部長
研究者番号： 60314415

(3) 連携研究者
()

研究者番号：