

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461642

研究課題名(和文) 血中のsyndecan-4による新生児慢性肺疾患の予後

研究課題名(英文) Prediction of neonatal chronic lung disease by serum syndecan-4

研究代表者

池田 一成 (Ikeda, Kazushige)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00193194

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)：本研究では羊膜絨毛膜炎による早産児の肺胞での慢性肺疾患に対して、成人のようにsyndecan-4が上昇し、抗炎症作用を示す、すなわち、syndecan-4の発現の違いが慢性肺疾患の程度に影響を及ぼしている可能性がある。と考えた。

まず、正常産児症例のsyndecan-4の測定を行い、基準値の作成を行った。早産児でのsyndecan-4の測定を進めたが、臍帯血や検査での残余血清で行った研究であり、1年間の研究延長を経ても、経時的にフォローできる症例、早産であるものの慢性肺疾患に至らなかった症例などの数が不十分であった。

研究成果の概要(英文)：We made a hypothesis that syndecan-4 elevated in chronic lung disease infant after chorioamnionitis and that the difference in expression of syndecan-4 in early time after delivery could reflect degree of chronic lung disease in preterm infants.

First, we measured syndecan-4 in term infants for reference value. We tried the measurement of syndecan-4 in preterm infants, however, umbilical cord blood or residual serum for this study were too insufficient to analyze even after one year extension of the research.

研究分野：新生児学

キーワード：syndecan-4 慢性肺疾患 絨毛膜羊膜炎 臍帯血

1. 研究開始当初の背景

呼吸・循環管理の発展とともに超低出生体重児の生存率は上昇し、現在では90%以上の児は生存退院をしている。しかし、このような超低出生体重児のなかには人工換気療法に難渋し、酸素療法も長期間必要になる症例を経験する。このような慢性肺疾患の要因として絨毛膜羊膜炎などの子宮内感染が重要と考えられている。子宮内感染である羊膜絨毛膜炎に続発する肺胞マクロファージや多核白血球の異常な活性化、人工換気、早産に伴う未熟肺、肺の発達阻害、修復因子の欠乏などが加わって慢性肺疾患を引き起こされる(図1)。

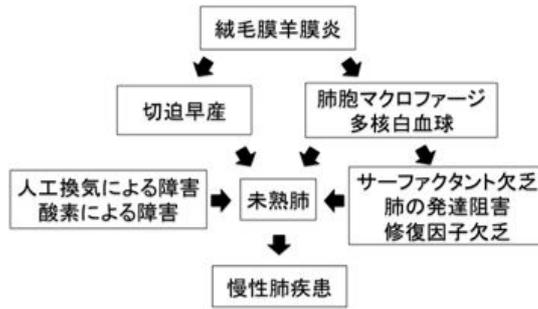


図1 慢性肺疾患の発症に関わる因子

慢性肺疾患は患者の予後、QOL を大きく低下させる。一旦慢性肺疾患が顕在化すれば、治療は難しく、早期の予測・発見が重要である。近年、胎児炎症 FIRS (Fetal inflammatory response syndrome) という概念が広まっており、子宮内の炎症の有無を迅速に判断することがより重要となってきた。しかし、絨毛膜羊膜炎のマーカーとしては新生児 CRP、IgM、羊水中 interleukin などが多く報告されているが、児の慢性肺疾患の発症との関連ははまだ推測の域を出ておらず、より子宮内の絨毛膜羊膜炎に特異的な炎症マーカーが求められている。

細胞表面に発現する膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)である syndecan は4つのアイソフォームが存在し、syndecan-1 は上皮細胞、syndecan-2 は血管内皮細胞と線維芽細胞、syndecan-3 は神経細胞、syndecan-4 は多種類の細胞に発現することが知られている。syndecan はマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)などによって細胞表面から切断され、細胞表面型としてのみではなく、可溶型としても存在し、S 側鎖は種々のサイトカイン・ケモカイン・増殖因子と結合し、その生物学的な活性を調節していると考えられている。syndecan-4 の責任遺伝子である sdc4 欠損マウスや LPS 気管内投与マウス肺障害モデルなどの報告から、syndecan-4 が側鎖であるヘパラン硫酸と種々のメディエーターとの結合を介して抗炎症作用や抗線維化作用を含む組織の修復に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、成人領域では特発性肺線維症などで syndecan-4 が肺線維化の抑制に作用したなどの報告はあるが、新生児領域では未だ世界でも報告がない。

syndecan-4 はコア蛋白の分子量が約 30kDa

で、細胞外ドメインに3つのグリコサミノグリカン付加部位を持っている。ヘパラン硫酸へのリガンド結合シグナルは、グリコサミノグリカンからコア蛋白の細胞質を通り、細胞内シグナル伝達系へと伝えられる。

成人領域の検討では syndecan-4 が炎症に対して細胞保護、抗炎症作用を持つ報告がある。

本研究では羊膜絨毛膜炎による早産児の肺胞での炎症、すなわち、慢性肺疾患に対しても、syndecan-4 が上昇し、抗炎症作用を示すとの仮説を立て、これを検証することを目的とした。同じような週数、状況で出生していても、慢性肺疾患の程度が異なることは臨床的に知られており、syndecan-4 の発現の違いが慢性肺疾患の程度に影響を及ぼしている可能性がある。新生児領域では syndecan-4 に関する報告はなく、慢性肺疾患に伴う研究も皆無である。

2. 研究の目的

syndecan-4 はコア蛋白の分子量が約 30kDa で、細胞外ドメインに3つのグリコサミノグリカン付加部位を持つ。ヘパラン硫酸鎖へのリガンドの結合シグナルは、コアタンパク質の細胞質ドメインを通して、細胞内シグナル伝達系に伝えられる(図2)。

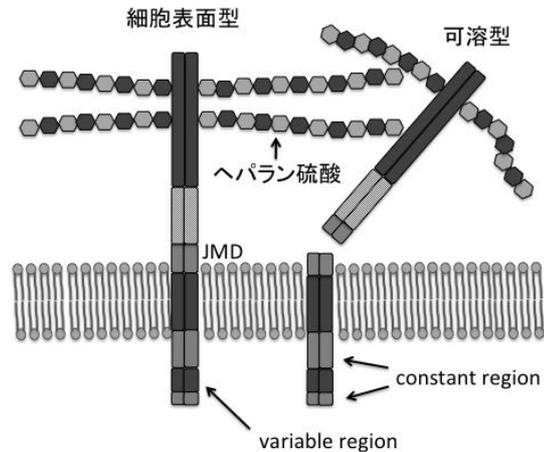


図2 細胞表面型と可溶型のSyndecanの構造

syndecan-4 の責任遺伝子である sdc4 欠損マウスはリポポリサッカライド(LPS)による敗血症、一カラゲナンによる腎障害、TGF- β による腎硬化症、オステオポンチンによる肝障害やプレオマイシンによる肺障害・線維症に感受性が高いことが報告され、syndecan-4 が炎症や修復に重要な役割を果たしていることが示唆されている。また、Tanino らは成人の特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)において IPF 患者の気管支肺胞洗浄液中では健常者と比較して syndecan-4 濃度が上昇し、IPF 肺組織においては上皮細胞とマクロファージに syndecan-4 の発現が充進していることを報告している。

成人の間質性肺炎・肺線維症の病態は collagen を主体とした細胞外マトリックスの過剰な肺構造の改築である一方、新生児の慢性肺疾患も肺胞レベルでの肺胞の破壊、繊維化、気腫化が混在

した病態であり、その原因として肺胞上皮細胞の直接損傷およびそれに伴うサイトカインや化学伝達物質を介した二次的障害がさらに増悪させると考えられている。

本研究では羊膜絨毛膜炎による早産児の肺胞での炎症、すなわち、慢性肺疾患の初期状態に対し、syndecan-4 が上昇し、炎症を抑制していると考え、これを検証する。早産児の子宮内での絨毛膜羊膜炎での syndecan-4 の検討の報告はない。

本研究は早産児にとって重篤な疾患である慢性肺疾患に対し、血清中の syndecan-4 を測定することにより、羊膜炎絨毛膜炎の存在を早期に予測・診断することにある。今まで新生児で syndecan-4 の測定を行った報告は海外を含めなく、本研究で得られる実験データにより羊膜絨毛膜炎のより精密な予測が初めて可能になると期待される。

近年、超早産児の生存率が上昇したものの、未熟児網膜症、呼吸窮迫症候群、早期産に伴う慢性肺疾患、脳室周囲軟化症などの後障害が存在する。とりわけ、早産児の肺では子宮内感染である羊膜絨毛膜炎に続発する肺胞マクロファージや多核白血球の異常な活性化、人工換気、早産に伴う未熟肺、肺の発達障害、修復因子の欠乏などが加わって慢性肺疾患が引き起こされ、児の成長、運動機能、精神運動発達に影響を及ぼす。本研究の臍帯血・児血中の syndecan-4 の測定による慢性肺疾患の早期診断は慢性肺疾患に対して早期治療介入でき、新生児の慢性肺疾患の予防、治療にも大変重要な意味を持つと考えられる。

3. 研究の方法

新生児の血液検査の残検体を使用し、慶應義塾大学小児科または福島県立医科大学呼吸器内科で syndecan-4 を測定し、下記の研究を行う。

- (1) 臍帯血による正期産児の新生児基準値の作成
- (2) 慢性肺疾患児の syndecan-4 を測定し、syndecan-4 の測定値と慢性肺疾患の程度との相関関係の検討
- (3) 慢性肺疾患児の syndecan-4 測定値と慢性肺疾患の程度の時間的経過に関する検討

臨床研究の対象は慶應義塾大学病院または荘病院で出生した新生児(正期産児・早産児)である。家族から本研究についての理解を求め、研究への参加の得られた新生児を対象として研究を実施する。肺の先天性異常、染色体異常や多発奇形などを認める児は除外する。患者の臍帯血・新生児血の残血清を用い、本研究のために新しい採血は行わない。

Syndecan-4 の測定まで慶應義塾大学病院小児科で血液検体を遠心分離し、エッペンドルフチューブに血清のみ移し、-20 で保存する。血清中の syndecan-4 は福島県立医科大学呼吸器内科で測定を行う。当院での体制ができ次第、

当院での syndecan-4 測定も行っていく予定である。福島県立医科大学への血清検体は匿名化したものを40検体毎に送付する。新生児の分析に必要な検体量は再検を含めて血清 200 μ l である。

実際の測定は Human Syndecan-4 Assay Kit (IBL, Gunma, JAPAN and R&D, Minneapolis, USA) を用いたサンドイッチ法 EIA (Enzyme Immuno Assay) で行う。一次抗体は、プレートに固相されているので、検体および標準物質を加えて一次反応を行い、洗浄後 HRP 標識された二次抗体を加えて二次反応を行う。反応後、過剰の二次抗体を洗浄除去し、Tetra Methyl benzidine (TMB) により発色させる。

正期産児の基準値作成のため男女各 50-100 名。比較対象となる早産児は在胎週数を 22 週 - 36 週まで各週男女 5 名、10 名を目標とする。

正期産児における syndecan-4 基準値の作成

syndecan-4 は海外を含めて小児・新生児領域で検討された報告がない。そのため、まずは新生児の基準値を作成する必要がある。正期産児の syndecan-4 の基準値作成のため、正期産児男女各 50-100 名の臍帯血・新生児血中の syndecan-4 を測定する。

対象および除外基準

慶應義塾大学病院または荘病院で出生した新生児の中で、臍帯血を採取した児または出生後に血液検査が必要になった児とする。ただし、肺の先天性異常、染色体異常や多発奇形などを認める児は除外する。血液検査の残血清で syndecan-4 の測定を行う。

慶應義塾大学小児科で血液検体を遠心分離し、エッペンドルフチューブに血清のみ移し、-20 で保存する。平成 26 年度は血清中の syndecan-4 は福島県立医科大学呼吸器内科で測定を行う。当院での体制ができ次第、当院でも syndecan-4 測定を行っていく予定である。福島県立医科大学への血清検体は匿名化したものを 40 検体毎に送付する。新生児の分析に必要な検体量は再検を含めて血清 200 μ l である。平成 26 年度は正期産児の出生時臍帯血または新生児血中の syndecan-4 測定データから統計解析を行い、新生児の syndecan-4 の基準値を作成する。

(1) 早産児における syndecan-4 測定値と正期産児の基準値との比較

平成 26 年度にまず新生児の基準値を作成し、平成 27 年度には 37 週未満の早産児の syndecan-4 の測定を行う。年間、当院で出生する早産児は 30 週以下約 30 人、31-36 週 60-70 人である。同意が得られる人数を 80%以上と考えている。最も少数である 30 週以下の早産児で年間約 25 人の研究協力者が得られ、各在胎週数での人数差はあるが 3 年で 70 名、週数毎に約 6 名の同意が得られると考えられる。これらの早産児の syndecan-4 測定結果を元に、週数による syndecan-4 測定値の変化を検討する。

(2) 早産児における syndecan-4 と慢性肺疾患の発症との比較検討

絨毛膜炎羊膜炎が切迫早産の主たる原因であることは周知の事実である。さらに絨毛膜羊膜炎は切迫早産に加えて、胎児炎症 FIRS を惹起し、慢性肺疾患を引き起こす。より未熟な児では切迫早産に対し子宮収縮抑制剤による治療も行われ、組織学的所見のみでは絨毛膜羊膜炎の診断が難しいことが多い。syndecan-4 が炎症や修復に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

本研究では早産児の絨毛膜羊膜炎の予測として早産児の臍帯血・新生児血中の syndecan-4 を測定し、その後の臨床的な慢性肺疾患の発症との連関を検討することで、syndecan-4 による慢性肺疾患の早期予測・発見を可能にする。

(3) 慢性肺疾患を発症した早産児の syndecan-4 の時間軸での検討

慢性肺疾患を発症した早産児では退院まで syndecan-4 の測定フォローを行う(各患者 3-4 か月の期間)。血液検体採取に関しては通常診療に際し必要な処置・検査を行うと同時に進行するため新生児に新たに侵襲を加えるものではない。慢性肺疾患の増悪・改善に対する血清中の syndecan-4 の推移を検討し、時間軸での慢性肺疾患の増悪・改善のマーカーとしての syndecan-4 の可能性を検証する。

本研究においては、新生児の血液検査の残検体を使用し、福島県立医科大学呼吸器内科または慶應義塾大学小児科で syndecan-4 を測定する。臍帯血による正期産新生児基準値の作成(50-100 例程度)、慢性肺疾患児の syndecan-4 測定、慢性肺疾患児の状態と syndecan-4 測定値の時間的連関を段階的に行い、検証する。分析に必要な検体量は血清 200 μ l である。検証の期間はまずは臍帯血や出生時の児の残血清で行う。その後、新生児慢性肺疾患児に関しては退院までフォローを行う(3-4 か月)。

4. 研究成果

平成 26 年、27 年度と正期産児症例の syndecan-4 の測定を行い、基準値の作成を行った。

Syndecan-4 は成人領域で抗炎症作用の報告があったことから、まず、正期産新生児(18 名)と成人(13 名)の比較を行った。新生児(18 名)の syndecan-4 の中央値は 3065 pg/ml と成人(13 名)の中央値 13861 pg/ml に比べ低い(図 3)。

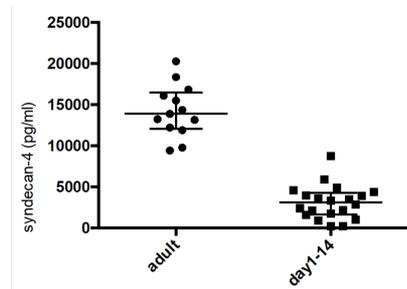


図3 新生児(日齢14以内)と成人のsyndecan-4の比較

次に正期産新生児を臍帯血群、日齢 1-7 群、日齢 8-21 群と 1 か月群の 4 群に分け、それぞれの群での syndecan-4 を比較した。各軍の出生時の CRP は 0.1 mg/dl 未満であった。

臍帯血群(男児 19 名、女児 26 名、計 45 名)、日齢 1-7 群(男児 20 名、女児 13 名、計 33 名)、日齢 8-21 群(男児 7 名、女児 7 名、計 14 名)、1 か月群(男児 11 名、女児 11 名、計 22 名)。各血清を ELIZA (IBL) により syndecan-4 を測定した。出生週数・出生体重の中央値は臍帯血群 39 週 0 日・3020g、日齢 1-7 群 38 週 6 日、3112g、日齢 8-21 群 38 週 3 日、3092g、1 か月群 38 週 6 日、2815g であった。

syndecan-4 の中央値は臍帯血群 8188 pg/ml、日齢 1-7 群 3491 pg/ml、日齢 8-21 群 2376pg/ml、1 か月群 4375pg/ml と各群間に有意差を認めた(図 4)。正期産新生児においては syndecan-4 濃度は臍帯血より日齢 1-7 と日齢 8-21 には低下し、その後は 1 か月へ向けて徐々に増加していた(図 4)。

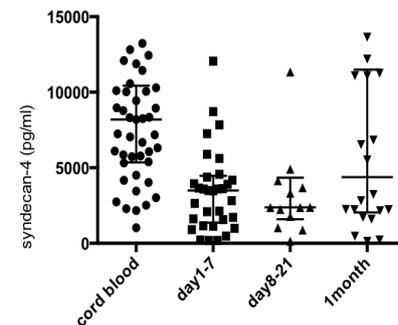


図4 臍帯血群、日齢 1-7 群、日齢 8-21 群、1 か月群の血清

27 年度以降、現在、早産児での syndecan-4 の測定を進めた。しかし、本研究は臍帯血や検査での残余血清を検体とした臨床研究であったため、1 年間の研究延長を経ても、経時的にフォローできる症例、早産症例、特に早産かつ慢性肺疾患に至らなかった症例などの数が不十分であった。今後、他施設を含めた規模の大きい検討が望まれる。

syndecan-4 と慢性肺疾患に負の連関を認めれば、syndecan-4 の早産児の慢性肺疾患での抗炎症作用を示すことが可能になる。さらには syndecan-4 を誘導できる薬剤が見つければ、新生児慢性肺疾患への新たな治療にもつながると

考える。

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 0 件)

(学会発表)(計 2 件)

1) 松崎陽平、池田一成、満期の早期新生児における血清 syndecan-4 の基準値の作成、日本周産期新生児医学会、2014.

2) 松崎陽平、池田一成、谷野功典、王新涛、棟方充、新生児 1 か月までの血清 syndecan-4 の変化、日本未熟児新生児学会、2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 一成(IKEDA, Kazushige)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師
研究者番号: 00193194

(2) 研究分担者

松崎 陽平(MATSUZAKI, Yohei)
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教
研究者番号: 60327583

谷野 功典(TANINO, Yoshinori)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10443863
(平成 27 年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし