

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 10 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462710

研究課題名(和文)壊死性腸炎発症の解明：microchimerism可視化ラットを用いたアプローチ

研究課題名(英文)Elucidation of the development of necrotizing enterocolitis: an approach using microchimerism visualized rats.

研究代表者

渡邊 高士 (Watanabe, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70508019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：壊死性腸炎を発症した男児症例の消化管組織を免疫染色したところ、本来存在しないはずの性染色体XXをもつ細胞が認められた。このことは、超低出生体重児における壊死性腸炎発症の原因の一つとして、妊娠中に母体から胎児に移行した母親細胞が関わっている可能性がある。これらの結果をもとにラットを用いたE-GFP transgenicラットを交配させ、microchimerism可視化ラットを作成した。このラットの体内ではmaternal cellでは蛍光下に緑色蛍光を呈する細胞として確認できる。しかしmaternal cellが生体内で果たす役割については依然不明な点が多く、引き続き解明を行っていく。

研究成果の概要(英文)：We immunostained the gastrointestinal tissue of a case (males) who developed necrotizing enterocolitis, and cells with sex chromosome XX were observed. This suggests that maternal cells transferred from mother to fetus during pregnancy may be involved in onset as one of the causes of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. Based on these results, rats were crossed with E-GFP transgenic rats to create microchimerism visualized rats. In the body of this rat, it can be confirmed as cells exhibiting green fluorescence under fluorescence in maternal cell. However, the role that maternal cell plays in vivo is still unclear and we will continue to elucidate.

研究分野：小児外科

キーワード：microchimerism maternal cell necrotizing enterocolitis

### 1. 研究開始当初の背景

周産期医療の充実によって超低出生体重児の生存率は飛躍的に向上し、多くの周産期センターで妊娠24週でも80%以上の生存率が得られるようになってきた。しかしながら、超低出生体重児の管理する機会が増えるに伴い超低出生体重児特有の疾患、消化管穿孔を合併する頻度が増加する。ひとたび超低出生体重児に消化管穿孔が合併すると、重篤な病態になり、その死亡率は上昇傾向にあるというジレンマに直面している。超低出生体重児に特異的に発症する消化管穿孔の1つとして壊死性腸炎 (necrotizing enterocolitis:NEC) がある。その病因については早期産児の未熟な消化管に病原性微生物のコロニーが形成されることや、インドメタシンの使用などによる腸間膜の血流低下や、低酸素血症などが感染症を助長し本症の発症に関与していると考えられている。しかし現在考えられているこれらの原因はNICUで管理される超低出生体重児すべてに当てはまる条件であるが、NECの本邦における発生頻度は超低出生体重児の約2%であり、同じような状況下(消化管機能が未熟、免疫機能が未熟)におかれた超低出生体重児においても高頻度におきるわけではなく、単に消化管の未熟性のみでは説明できない。このため我々は、NECを誘発する別の病因があるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

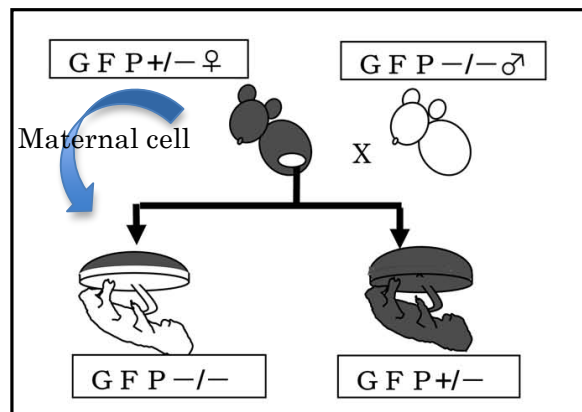
壊死性腸炎は発症すると予後の極めて悪い疾患である。この壊死性腸炎の消化管は消化管の壊死や壁内気腫を伴い、一見すると重症のGVHDを発症した際の消化管像と酷似している。一方で、以前より母児間のmicrochimerismが原因と考えられている疾患はいくつか報告されているが因果関係を明らかにした報告は無い。妊娠中には母児間で免疫寛容が成立しており、microchimerismも成立することは既に報告されている。この状態が早期に出生する超低出生体重児で破綻することが壊死性腸炎の原因ではないかと考え、Maternal cell microchimerism可視化ラットを作成しMaternal cellの臓器親和性、炎症による臓器への再分布を観察することで壊死性腸炎の発症メカニズムや予防、治療を解明、開発することが目的であり、さらにはMaternal cell microchimerismの生物学的意義を明らかにすることが目的である。

### 3. 研究の方法

(1)胎盤炎症と壊死性腸炎発症の関係について、当施設での臨床データをもとに解析を行った。超低出生体重児の胎盤を病理学的に評価し、炎症所見の高い群と低い群に分類し、壊死性腸炎の発症リスクを検討した。  
 (2)壊死性腸炎を発症した男児症例9例のホルマリン固定された消化管病変部検体を用いて、FISH法によりX、Y性染色体シグナ

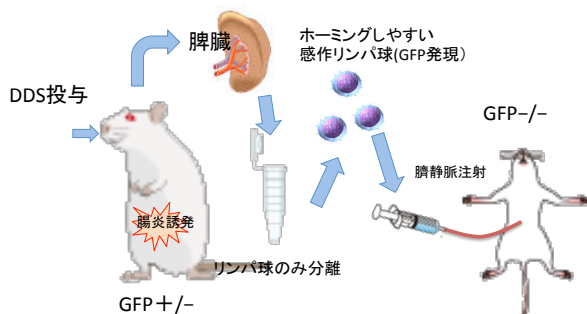
ルを分析し病変部局所でのmaternal microchimerismのNECへの影響を検討した。また同時にXXシグナルを有する細胞が腸管壁のどの部位に局在するのか、HE染色の連続切片との比較により粘膜上皮内か粘膜下組織の血管周囲か等を明らかにする。またcontrolの設定として同じ在胎週数で消化管穿孔を起こす限局性消化管穿孔(focal intestinal perforation:FIP)との比較と、さらに同一個体でNECの炎症の強い部分と炎症の少ない部位での比較をHE染色の連続切片と比較し検討する事とした。

### (3)maternal cell microchimerismモデルの作成



E(enhanced)GFP transgenicラットとwild typeラットを交配させEGFP+/-のメスを得る。このラットとwild typeオスラットを交配させEGFP-/-ラットとEGFP+/-ラットの2系統を得ることができる。この内、EGFP+/-ラットを母親にもつEGFP-/-ラットはmaternal cell microchimerismモデルとなり、maternal cellはEGFP-/-ラット体内では蛍光下に緑色蛍光を呈する細胞として確認できる。

### (4) maternal microchimerismの誘導



前回までの研究でmaternal microchimerismの細胞数が少ないため、より、maternal microchimerismが成立しやすい条件での実験をおこなう。炎症性超疾患モデルラットで現在使用されているDDSをラットに投与する。5%DDSをラットに5日間

自由摂取させる事で消化管粘膜に炎症をおこさせる事ができ現在多くの炎症性超疾患モデルと使用されている。この感作された maternal cell リンパ球を胎児ラットに投与することで microchimerism の頻度がより多くなるかを検討する。

(5) 消化管に見られる maternal cell リンパ球のサブセットの解析を FACS を用いて試みた

#### 4. 研究成果

(1) 当施設で出生した超低出生体重児のデータを解析することで、壊死性腸炎の発症リスクは母体の炎症反応が高い事、また胎盤炎症所見が強いことが判明した。このことは胎盤機能不全(胎盤の炎症による)により、母体の炎症により活性化された母親リンパ球(maternal cell)が胎児に移行しやすい可能性を示唆していると思われる。

(2) 壊死性腸炎の男児症例 9 例を FISH 法を用いて X,Y シグナルを確認した。対照とした男児限局性消化管穿孔症例 4 例では XX 染色体をもつ細胞は 1 例も認めなかった。また壊死性腸炎症例の非病変部(炎症の少ない部位も含む)での観察でも XX を有する細胞は確認できなかった。壊死性腸炎の男児症例の病変部では XX が近接する所見が得られたが、壊死性腸炎発症下ではリンパ球や壊死組織が混在しており、同一細胞内に XX 染色体が存在するのか、隣接する XY 染色体の X 染色体が他の細胞の X 染色体と隣接し、同一細胞内の XX 染色体として誤認されている可能性があった。そのため、蛍光観察されたイメージを 3D 構築を行い、再度観察を行ったが、XX が隣接する領域は 7 例の検体全てに確認できたが、壊死性腸炎の病変部での観察は背景の炎症が強く、細胞(リンパ球)が密集しており、なおかつ壊死を伴う編成が強い事から XX が同一細胞内であるか、隣接する他の細胞の染色体が観察されているだけなのかの同定には至らなかった。

(3) maternal cell microchimerism モデルの作成をおこなった。E(enhanced)GFP transgenic ラットと wild type ラット EGFP<sup>-/-</sup>を交配させ EGFP<sup>+/-</sup>のメスを得る。このラットと wild type オスラットを交配させ EGFP<sup>-/-</sup>ラットと EGFP<sup>+/-</sup>ラットの 2 系統を得ることができる。この内、EGFP<sup>+/-</sup>ラットを母親にもつ EGFP<sup>-/-</sup>ラットは maternal cell microchimerism モデルとなり、maternal cell は EGFP<sup>-/-</sup>ラット体内では蛍光下に緑色蛍光を呈する細胞として確認することができる。しかし、当初想定されていた maternal microchimerism の頻度より実際の maternal microchimerism の頻度が低い場合、消化管とその他の免疫に関係すると考えられる臓器:骨髄、胸腺、肝臓、脾臓における maternal microchimerism cell を同定することとはできなかった。

(4) maternal microchimerism の誘導  
胎生 21 日の maternal cell microchimerism モデルラットの臍帯静脈にカニューレシオンを

行い、母親と同系統のラットの脾臓より抽出したリンパ球を経静脈的に投与に関しては、臍帯静脈カニューレシオンの手技の安定に時間を要した。また誘導した maternal cell microchimerism をフローサイトメトリーを用いて FL1 チャンネルにより発現率と GFP 発現細胞数を定量的に評価を試みるが、やはり maternal microchimerism の細胞数が少なく検出できなかった。

(5) 消化管に見られる maternal cell リンパ球のサブセットの解析

最終年度は消化管に見られる maternal cell リンパ球のサブセットの解析を試みた。この解析により消化管にホーミングしてくる maternal cell リンパ球が Tcell また NK 細胞であれば、壊死性腸炎の発症に maternal cell microchimerism が大きく関わっている証明となる。また maternal microchimerism がホーミングにより特異的臓器に再分布するかを研究する事で壊死性腸炎が回盲部付近の回腸に、より症状が局在化し、重症化をきたしやすいかという、同一組織内での発症部位特異性の問題も解明される事になる。また腸炎誘発により消化管に誘導された maternal cell をフローサイトメトリーにて分析しリンパ球の属性を調べ、その後 FACS Calibur(Becton Dickinson)にて測定を行う予定であった。しかし炎症を人工的に誘発し、maternal cell が脾臓、肝臓、小腸にホーミングし再分布してくるか施行錯誤しているが、maternal cell microchimerism の発現頻度が、予想された頻度より少ないためか、Real time PCR で、プライマーに GFP primer を用いても検出に難渋している。この問題を解決するため、当施設において購入したデジタル PCR を用いる事を検討している。デジタル PCR は従来の Real time PCR よりも検出感度が高く、絶対的定量が可能な点で優れており、想定された頻度より少ない現象で起っている maternal microchimerism をとらえる事ができると考えており、maternal cell microchimerism が生体内で起っている働きの解明に役立つと考えられる。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

Takashi Watanabe :Is chorioamnionitis a risk factor of necrotizing enterocolitis? Pacific Association of Pediatric Surgeons 47<sup>th</sup> Annual Meeting May, 29, 2014 Banff, Canada

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 高士 (Watanabe Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70508019

(2)研究分担者

柳原 格 (Yanagihara Itaru )  
大阪府立母子医療センター・研究所・免疫部  
門部長  
研究者番号：60314415

(3)連携研究者

窪田 昭男 (Kubota Akio)  
和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教授  
研究者番号：10161671

(4)研究協力者

三谷 泰之 (Mitani Yasuyuki)  
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教  
研究者番号：40612106

(5)研究協力者

山上 裕機 (Yamaue Hiroki)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20191190