

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10089

研究課題名(和文)壊死性腸炎(NEC)に対する補体系制御による治療法の開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic methods for necrotizing enterocolitis (NEC) by controlling the complement system

研究代表者

高間 勇一 (TAKAMA, Yuichi)

近畿大学・大学病院・講師

研究者番号：50467560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、壊死性腸炎(NEC)モデルにおいて組み換えヒト可溶性トロンボモジュリン(rTM)の効果を検討した。NECモデルは、高浸透圧の経管強制栄養、lipopolysaccharideの胃内投与、低酸素ストレスにより作成した。治療群では、rTMを皮下投与した。組織学的にNEC様の腸管傷害は、NEC群(73.5%)にくらべ、治療群(36%)で有意に少なかった。組織のTNF- $\alpha$ 、IL-6、HMGB1は、NEC群では有意に上昇していたが、rTM治療群では減少していた。本研究で、rTMによる治療は、NECの重症度を軽減させることが示された。rTMはNEC治療の選択肢の一つになる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

壊死性腸炎(NEC)は、低出生体重児・早産児の死亡原因となる重篤な疾患である。周産期管理の向上により生存率は改善しているがさらなる生存率および予後の改善が望まれている。新しい治療法の開発のため実験的研究を行った。抗炎症効果および抗凝固効果のある可溶性トロンボモジュリン(rTM)に着目し実験的NECモデルにおいて治療効果を検討した。長官の組織傷害は治療群において改善し、腸管における炎症性サイトカインのTNF- $\alpha$ 、IL-6のmRNA発現は低下した。rTMによる治療はNECの発症や重症度を軽減し治療選択肢の一つとなりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：NEC remains the leading cause of death in preterm infants. The aim of this study was to evaluate the effect of Recombinant human soluble thrombomodulin (rTM) in a NEC model. NEC was induced by enteral feeding with hyperosmolar formula, gavage administration of lipopolysaccharide and asphyxia stress. In the treatment group, rTM was administered subcutaneously twice. The ileum was harvested for a histological evaluation and the measurement of the mRNA and protein expression. The rate of NEC-like intestinal injury in the treatment group (36%) was significantly lower than in the NEC group (73.5%). Tissue levels of TNF-alpha, IL-6 and HMGB1 were significantly elevated in the NEC group, whereas those in the treatment group were decreased to similar values as in the control group. Our experimental study showed that rTM is able to reduce the severity and incidence of NEC. It may be an alternative option for the treatment of NEC.

研究分野：小児外科

キーワード：壊死性腸炎 新生児 補体 治療 低出生体重児 可溶性トロンボモジュリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の出生数の減少にも関わらず、低出生体重児の出生数は増加傾向にある。壊死性腸炎は増加傾向にある低出生体重児の 2-5%に発症するとされ、手術例の死亡率は 20-50%と高い重篤な消化管合併症である。また救命されても身体、精神運動発達遅延や短腸症候群等重篤な合併症を高頻度に合併する。しかし、その病因や発症機序はほとんど解明されておらず、治療法も消化管穿孔に対する対症療法に限られている。低出生体重児にみられる壊死性腸炎(NEC)は、しばしば重症化して、その予後は極めて不良である。しかし、NEC の発症や重症化の機序は依然として不明であり、治療は絶食、抗生剤投与、壊死腸管切除などの対症療法に限られている。近年、NEC の腸管組織において、自然免疫系のトリガーとなる Toll like receptor 4 (TLR4)の高発現や、抑制性 T リンパ球(Treg)の減少が報告され、腸管での過剰な炎症反応が NEC の発症や重症化の一因であることが明らかとなってきた。我々はこれまでに、肺の生体防御因子の一つであるサーファクタント蛋白(SP)が腸管にも存在することに着目し、新生児の腸管や胆道系に SP が発現していることや、SP が腸管上皮細胞の炎症反応を抑制することを報告してきた(文献 1-2)。SP が所属するコレクチンファミリーは、生体防御を担う自然免疫の重要な因子でもあり、レクチン経路を介して補体系の活性化にも関与している。補体系は血液中に存在するタンパク質であり、一旦活性化されると、中間代謝物である C3a, C5a は強力なアナフィラトキシンとなり、炎症を惹起する。また最終的に膜侵襲複合体(MAC)を形成して細胞溶解を引き起こし、侵入病原体に対する強い殺傷作用を発現する。一方過剰な補体系の活性化は、宿主細胞にも極めて強い傷害作用を与える可能性があり、NEC における腸管壊死の進展や敗血症への移行に関与していることが推測される。しかしこれまでに、補体系と NEC との関連性についての報告は見られない。また、NEC 重症化の原因となる過剰な免疫反応を直接制御する方法は明らかにはなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、自然免疫系の一員であり、強い細胞障害性を持つ補体系に着目して、NEC の発症や重症化の機序を明らかにすること目的とした。本研究により、NEC と補体系の関連性が明らかになれば、新たな治療法の開発が期待できる。

以上の臨床的・学術的背景ならびにこれまでの研究結果を踏まえて、以下の仮説をたてた。

- (1) 補体系の活性化 (C3a, C5a あるいは MAC)が NEC の発症や重症化の原因となっている。
- (2) 補体系の抑制が、NEC の治療や重症度の軽減に有効である。

この仮説を証明するために、本研究では以下を主目的として計画を遂行した。

- (1) 新生仔ラットを用いて NEC モデルを作成する
- (2) NEC モデルにおける補体系活性化ならびに免疫学的機序を明らかにする
- (3) 補体系の抑制が、NEC の発症や重症化に及ぼす影響を明らかにする

### 3. 研究の方法

実験的 NEC モデルは、Sprague-Dawley 新生仔ラットに高浸透圧の経管強制栄養と低酸素ストレス(1日3回、10分、4日間)と lipopolysaccharide (LPS) の胃内投与(1日目および2日目に2回)によって作成した。対照群(control 群)には母乳が自由に与えられた。治療群(NEC-rTM 群)では、rTM を1日目および2日目に LPS の胃内投与の30分前に各1回、10 mg/kg/日の容量で皮下投与した。NEC 群では rTM の代わりに生理食塩水を皮下注射した。96時間以上生存した全ての動物、並びに瀕死状態の動物は安楽死させた。回腸を組織学的評価(NEC スコア: 0~4)のため採取した。また、採取した回腸における TNF- $\alpha$ 、IL-6 の mRNA 発現を評価した。

### 4. 研究成果

Sprague-Dawley 新生仔ラットの出生体重に差はなく、control 群に対して、NEC 誘発グループ(NEC 群, NEC+rTM 群)では、経過中の低体重を認めた(Fig.1)。

96時間の生存率は NEC 群 23.5%に対して、NEC+rTM 群 64%であり、有意( $p < 0.001$ )に NEC+rTM 群での生存率の改善を認めた(Fig.2)。

摘出した回腸組織における組織的なスコアは、NEC 群に比べて、rTM 群で有意に低値であった。また、rTM 投与により NEC 様の腸管傷害が 76%から 36%へ有意( $p = 0.009$ )に減少した(Fig.3)。

組織像においても回腸絨毛構造は NEC 群では絨毛構造の破壊を認めているが、NEC+rTM 群では絨毛構造の回復を認めた(Fig.4)。

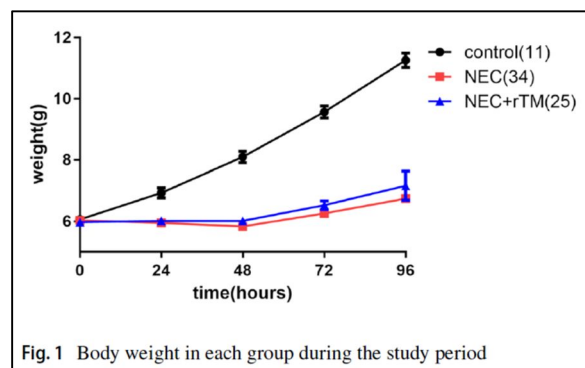


Fig.1 Body weight in each group during the study period

抽出した回腸組織における, TNF- $\alpha$ , IL-6 の mRNA の発現を評価することで炎症性サイトカインの評価を行った. control 群に比べて, NEC 群では, TNF- $\alpha$ , IL-6 の mRNA の発現は各々6.4 倍, 34.4 倍と上昇した. 一方, NEC+rTM 群では, control 群に比べて, TNF- $\alpha$ , IL-6 の mRNA の発現は各々3.4 倍, 4.3 倍であった. NEC+rTM 群では, NEC 群に比べ有意に TNF- $\alpha$ , IL-6 の mRNA の発現が低下しており, rTM 投与により炎症性サイトカインの mRNA 発現が抑制された (Fig.5). 回腸における HMGB1 タンパクの発現は,

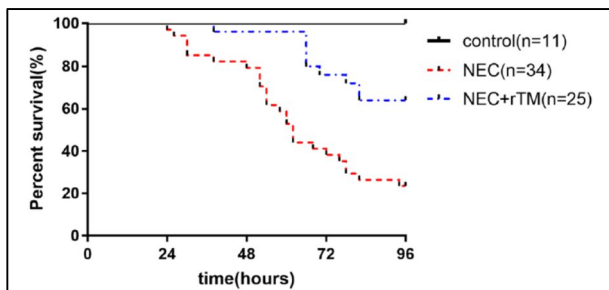


Fig. 2 Results of the Kaplan-Meier survival analysis. The rats in the NEC+rTM group had a significantly higher 96-h survival rate than those in the NEC group ( $P < 0.001$ )

Fig. 3 a The NEC histological score of the ileum in each group. Histological scoring of the terminal ileum of newborn rats in the control ( $n = 11$ ), NEC ( $n = 34$ ) and NEC+rTM ( $n = 25$ ) groups. NEC-like intestinal damage was defined as a score  $\geq 2$ . b The NEC incidence. The rate of NEC-like intestinal injury was lower in the NEC+rTM group than in NEC group (36% vs. 73.5%). The asterisk indicates  $P < 0.05$

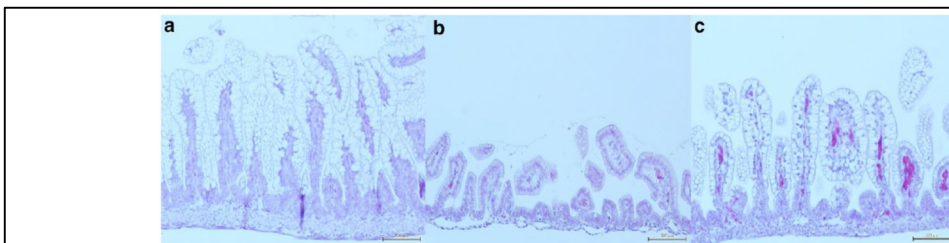
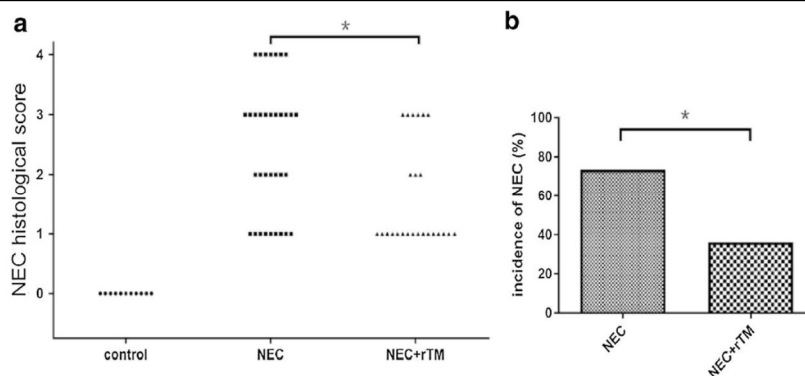


Fig. 4 Histological changes in the ileum in newborn rats. Representative images from each group are presented. a The structure of the intestinal mucosa was intact in the control group; b the structure of the ileum villus was broken and even lost in the NEC group; c the

ileum of the newborn rats in the NEC+rTM group had less-necrotic ilea and fewer lost villi than that in the NEC group. The scale bar represents 500  $\mu\text{m}$ . Original magnification: 100 $\times$

NEC 群で上昇しており, rTM 投与により NEC+rTM 群では control 群と同程度まで低下していた. これらの結果から, rTM 投与によりレクチン様ドメインや EGF 様ドメインを介して HMGB1 の作用を阻害し, 抗炎症効果を発揮し回腸の組織傷害を防止することが示唆された. また rTM 投与で NEC の重症度が軽減する別の機構としては, rTM による抗凝固能が腸管の微小循環血流を維持し, 結果 NEC の発症や重症度を低減させていると思われた. これら本研究の結果からは, rTM 投与により NEC の発症や重症度を低減させ生存率を改善する効果が期待される. これら作用は, HMGB1 を阻害することによる抗炎症効果で腸管粘膜において炎症性サイトカインの生成が抑制されることによると考えられた.

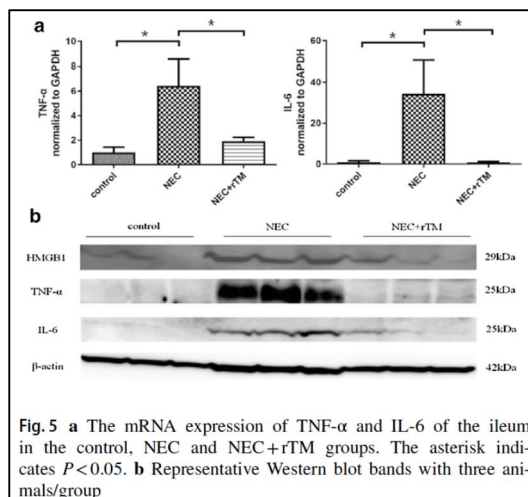


Fig. 5 a The mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 of the ileum in the control, NEC and NEC+rTM groups. The asterisk indicates  $P < 0.05$ . b Representative Western blot bands with three animals/group

#### 引用文献

1. Saka R, Okuyama H, et al. : The expression of surfactant proteins A and D in the intestines and pancreas of murine fetuses. Open J Pediatrics 2014 4:12-20
2. Saka R, Okuyama H, et al. : Immunolocalization of surfactant protein D in the liver from infants with cholestatic liver disease. J Pediatr Surg 2015 Feb;50(2):297-300.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bo Li, Ryuta Saka, Yuichi Takama, Takehisa Ueno, Yuko Tazuke & Hiroomi Okuyama	4. 巻 49
2. 論文標題 Recombinant human soluble thrombomodulin reduces the severity and incidence of necrotizing enterocolitis in a newborn rat model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 971-976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-019-01832-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Li B, Saka R, Takama Y, Tazuke Y, Oue T, Okuyama H
2. 発表標題 Recombinant human soluble thrombomodulin (rTM) reduces the severity and incidence of necrotizing enterocolitis (NEC) in a newborn rat model
3. 学会等名 51st annual scientific meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 波, 阪 龍太, 高間 勇一, 上野 豪久, 田附 裕子, 奥山 宏臣
2. 発表標題 ヒト可溶性トロンボモジュリンは新生ラット壊死性腸炎モデルにおける重篤度および発生率を低下させる
3. 学会等名 第54回日本周産期新生児医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田附 裕子 (TAZUKE Yuko) (10397698)	大阪大学・医学系研究科・准教授  (14401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	奥山 宏臣  (OKUYAMA Hiroomi)  (30252670)	大阪大学・医学系研究科・教授    (14401)	
研究 分担者	児玉 匡  (KODAMA Tasuku)  (60771045)	大阪大学・医学部附属病院・医員    (14401)	