

2024 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	母体由来細菌による胎児腸管上皮発達と壊死性腸炎発症への影響 ー母体由来細菌と壊死性腸炎発症機序の因果関係ー
キーワード	①壊死性腸炎、②新生児、③胎児免疫機構

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	イシヤマ アスカ 石山 明日香
配付時の所属先・職位等 (令和6年4月1日現在)	順天堂大学 医学部小児外科学講座・助教
現在の所属先・職位等	順天堂大学 医学部小児外科学講座・非常勤講師
プロフィール	2010年3月に高知大学医学部医学科を卒業後に順天堂大学医学部附属順天堂医院で初期研修を経て2012年から同院小児外科学講座の大学院博士課程に進学、2016年に同課程を修了。大学院の傍ら小児外科医として臨床に携わる。2020年7月から2022年7月まで米国の Johns Hopkins 大学の小児外科学研究室において新生児壊死性腸炎を始めとする小児炎症性腸疾患に対する基礎研究に従事した。帰国後は順天堂大学にて引き続き小児炎症性腸疾患の関する基礎研究に携わっている。

1. 研究の概要

羊水内に細菌または細菌が産生する細胞外小胞を C57Bl6 妊娠マウスの子宮内に注入することで、生後、仔マウスの腸管免疫細胞の集団に特定の細胞に分化するような偏向を与え得るのかを検証し、母体に高度ストレスがかかることによって母体から流入した細菌または細菌の一部がこうして胎児腸管免疫細胞に分化偏向を与えることで出生後の児の壊死性腸炎を発症する誘因となる可能性を探る。

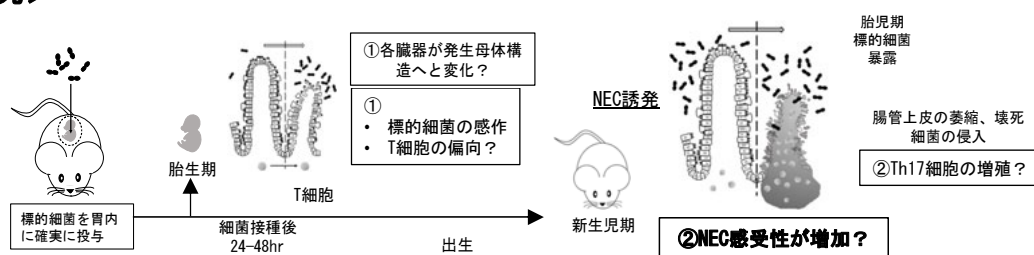
2. 研究の動機、目的

壊死性腸炎 (Necrotizing enterocolitis: NEC) は、在胎週数 37 週未満で生まれた早産児や出生体重 2500g 未満で出生した低出生体重児において、生後 1 週間から 1 ヶ月頃に腹部が膨れ哺乳不良となるといった非特異的な症状から始まり、1-2 日以内に急激に小腸を中心として腸管全体に激烈な炎症が波及するとともに腸管の血流が滞ることで腸管が壊死する恐ろしい疾患である。ひとたび NEC を発症すると緊急手術にて壊死腸管を切除し血流が保たれている腸管をつなぎ合わせるか人工肛門を作成しないと致死的となりうる。医学の発展とともに早産児・低出生体重児の出生率が増加した一方で、未熟児における NEC の発症率は約 10%、致死率は 20-30%と依然として極めて高く、新生児医療における深刻な問題となっている。では、NEC を発症しやすい未熟児と発症しにくい成熟児の腸管においてどのような発生母体の差があるのか。そして、その差は母胎内にいる間に形成されているのか、これは NEC 研究における長年の問いである。

興味深いことに、従来無菌と思われていた子宮内環境において、実は極少量の母親由来の微

生物または微生物の一部が許容されており、非炎症環境を保ちながら胎児の免疫細胞が母体由来抗原を認識学習することで胎児免疫細胞の成熟を促している、という概念が近年普及しつつある（Mishra et al. Cell 2021; Rackaityte et al. Nat Med 2020; Kaisanlahti et al. Microbiome 2023）。そこで本研究では、母親が早産を誘発するような高ストレス環境や感染症にかかると、母親由来の細菌または細菌の一部が子宮内胎児環境に伝播し、胎児腸管で胎児免疫細胞によって感作されることで胎児腸管免疫細胞が活性化され炎症を惹起しやすくなるような免疫細胞分化の偏向が起きるのではないかという仮説を立てた。この仮説に基づき、本研究では、胎児マウスの羊水内に細菌または細菌が産生する細胞外小胞（脂質や酵素、細菌の外膜の一部や DNA や RNA の一部を含む）を打ち込むことで、生後にマウス腸管免疫細胞集団に偏向が起こりうるのか、そしてその偏向が NEC を起こす母体となるような易炎症性を伴うのかを検証していく。

<本研究>



仮説①と②が正しければ、母体の細菌を起点とした児のNEC発症の新機序が明確になり、治療への道が拓かれる。

3. 研究の結果



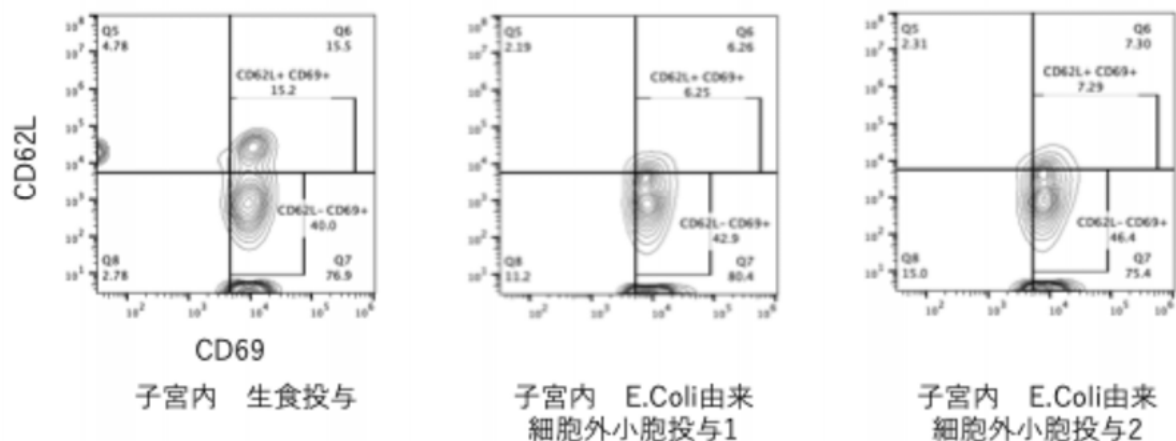
←胎生期 17 日の子宮内に E. coli から抽出した細胞外小胞または対照群として生食を注入した。



←細胞外小胞投与 24 時間後に帝王切開にて胎児を出生させた。



CD4陽性CD44陽性リンパ球



E. coli を RPMI 溶液にて培養し、その後細菌を濾過、溶液を濃縮することで細胞外小胞を抽出することに成功した。また、この E. coli から抽出した細胞外小胞を胎生 17 日の子宮内に投与しその 24 時間後に帝王切開にて胎児を出生・蘇生させることに成功した。さらには、生後 7 日後に出生後仔マウスの腸管内にいるリンパ球を採取し flow cytometry で分画を確認したところ、T 細胞リンパ球のうち、活性化した証拠となる CD62L 発現が低下した細胞が細胞外小胞を投与した群において、対照群である生食を子宮内に投与した群よりも増加していることを確認した。既に Ha らのグループによって E. coli から抽出した細胞外小胞を母マウスの血管内に注入すると胎児マウス子宮内に注入した細胞外小胞が到達したことが確認されていることから (Jae Yeong Ha et al., Front Mol Biosci. 2020)、母親が感染または高ストレス環境下で体循環にグラム陰性桿菌由来の細胞外小胞が乗ると胎児に伝搬され胎児腸管内に存在する T 細胞性リンパ球分化に偏向を与え、出生後の腸管炎症を惹起しやすくなる可能性が示唆された。今後はさらにどのような炎症メディエーターを介してリンパ球の分化が促されたのか、また遺伝子レベルでのヒストンアセチル化やメチル化といった影響の有無も確認し母体感染症または母体細菌叢と胎児の免疫機能への影響をさらに追求していく。

4. 研究者としてのこれからの展望

悲劇的な経過を辿ることが多い NEC 疾患に対して、現在確立された治療法が外科的切除術しかなく、その外科的手術を施しても組織の脆弱性がありかつ体力・抵抗力の弱い未熟児に対してはその手術自体が致命的となることも現状では、疾患の機序を解明すること及び予防法の確立が切望されて久しい。本研究で試みているように、未熟児においてこの疾患の発生母体が母体の細菌感染または腸内細菌叢が破綻することで細菌由来細胞外小胞が胎児環境に流入し胎児の出生後の特定疾患の発症を誘導することが証明されれば、新生児期早期に発症する NEC のみならず小児期のアレルギー性疾患や成人期の炎症性腸疾患、生活習慣病の発症にも関与している可能性は十分考えられる。今後は NEC だけでなく母体環境がこれら疾患への発症傾向に与える影響を探るとともにその予防法確立を目指す。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

医療の現場で非常に小さく生まれながらも懸命に大きくなろうとしている未熟児を突如と襲う無情なこの疾患への関心は世界的に高く、外科医、小児科医、基礎研究者がその機序の解明と予防法、治療法の確率に取り組んでいます。母乳の有用性や羊水治療の可能性などの発見があるなか、母体環境がこの疾患の発症にどのような関連があるのか注目が集まっています。近年、細菌や植物が産生する細胞外小胞の疾患抑制効果が新たに発見されており、本研究でも細菌産生性細胞外小胞が羊水中に流入することで胎児免疫細胞の偏向を促すことが確認されました。このことは将来的に母体の細菌叢を改善することで出生後の児の疾患を予防し得る

非常に意義のある研究を進めることができたと考えます。このように将来性のある研究を開始するためのご支援をいただきましたことを心から感謝申し上げます。また、この研究を力強く推進していくために今後ともご支援・ご協力の程を何卒宜しくお願いいたします。