

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名： 大山 慧
専攻分野：外科学 コース：小児外科 指導教授：北川 博昭
主論文の題目： A Peptide Profile of Amniotic Fluid in a Fetal Lamb Model of Gastroschisis. (ヒツジ胎仔腹壁破裂モデル羊水のペプチドプロファイル)
共著者： Toshiyuki Sato, Kunihide Tanaka, Shutaro Manabe, Hideki Nagae, Mitsumi Arito, Nobuko Iizuka, Shigeki Kojima, Kazuki Omoteyama, Yasuji Seki, Manae S. Kurokawa, Naoya Suematsu, Kazuki Okamoto, Kevin C. Pringle, Tomohiro Kato, Hiroaki Kitagawa.

### 緒言

腹壁破裂 (GS) は、腹壁の欠損孔から腸管が体外に脱出した状態で胎児が出生する疾患で、腸管の浮腫で一期的腹壁閉鎖術が困難なことがある。脱出腸管の病理組織所見として炎症性細胞の浸潤や粘膜筋層や漿膜層の肥厚が報告され、また、GS の羊水中に炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-6 および IL-8 の発現が上昇しているとの報告があり、炎症の関与が重要視されているが、炎症の原因は明らかではない。

一方、羊水中には様々なペプチドが存在すると考えられる。ペプチドはタンパク質が種々のプロテアーゼにより断片化されたものであり、近年、生理活性を有するペプチドも多数存在することが明らかになってきた。また、生理活性を持つペプチドの性質はその由来タンパク質の性質と類似する場合があることも分かっている。

そこで、我々は脱出腸管に対して炎症性変化や浮腫性変化をきたすペプ

チドが羊水中に存在すると仮定し、ヒツジ胎仔 GS モデルを作製し、その羊水中のペプチドの網羅的解析を行なった。

#### 方法・対象

胎生 60 日（満期：140～145 日）のヒツジ胎仔 4 頭を帝王切開で娩出し、外科的に GS を作製し、再度、子宮に戻して妊娠を継続した。満期である妊娠 145 日に再度帝王切開で胎仔を娩出した。その際、羊水を採取した。また、比較対象として正常妊娠の胎仔を同時期に帝王切開で娩出し羊水を採取した。採取した羊水から、弱イオン交換体ビーズによりペプチドを分離回収し、質量分析装置を用いて各羊水サンプル中のペプチドを網羅的に検出した。GS 群および正常妊娠群で検出されたペプチドの質量電荷比とイオン強度を ClinProt プログラム (Bruker Daltonics) を用いて解析した。t 検定で GS 群で有意にイオン強度に差のあるペプチドについて、アミノ酸配列と由来となるタンパク質を質量分析を用いて同定した。

同定し得たペプチドの由来タンパク質の 1 つである Annexin7 (Anx7) に関してはウェスタンブロット法により存在量を比較した。

本研究は Wellington Animal Ethics Committee (Wellington, New Zealand Approval Number 2-12) の承認を得て行なった。

ヒト Anx7 の中で、上記のヒツジ Anx7 由来ペプチドに相当する領域をペプチドとして合成し (hA7(168-211)、漿膜の構成細胞であるヒト中皮細胞に対するサイトカイン産生誘導能をサイトカインアレイを用いて解析した。

#### 結果

上記ヒツジ GS モデルでは、4 頭中 3 頭で GS が認められ、残り 1 頭では腹壁は自然閉鎖していた。そのため、GS 群 3 例と正常妊娠群 4 例で解析した。羊水中に 77 個のペプチドを検出し、そのうち 12 個は両群間でイオン強度に差があった (GS 群で増加していたもの 9 個、減少していた

もの 3 個、 $p < 0.05$ )。この 12 個のペプチドのうち 3 個についてアミノ酸配列と由来タンパク質を同定し得た。由来タンパク質は Anx7, nuclear pore glycoprotein p62 (Nuc62), Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog (UFD1) であり、すべて GS 群で増加していた。これらの中で炎症との関連性が報告されている Anx7 に関してウェスタンブロット法により 2 群間で存在量を比較したが有意差は認めなかった。

合成した hA7 (168-211) でヒト中皮細胞を刺激したところ、調べた 36 種類のうち、10 種類のサイトカインが培養液中に検出され。そのうち 4 種類 (IL-1Ra, sICAM-1, IL-27 および MIF) が hA7 刺激群で 1/1.5 以下に減少していた。

## 考察

本研究で、1 頭の失敗例を経験したものの、ヒツジ胎仔における GS モデルの作製が可能であることが示された。モデル作製時期の変更や作製方法の変更でよりモデル作成の確度が上げられる可能性がある。

ヒツジにおいて GS 羊水のペプチドプロファイルは正常妊娠羊水のプロファイルとは異なることが示された。Anx7 は炎症との関連が報告されているが、その量には両群間で有意差を認めなかったことから、Anx7 の部分ペプチドの増加には Anx7 の産生と分解の亢進の両方が考えられた。

ヒツジ GS 羊水中で有意に増加していた Anx7 ペプチドのヒト Anx7 における相当領域に当たるペプチドが IL-1Ra などの抗炎症性サイトカインの低下を誘導することが示され、炎症の促進に関わる可能性が示唆された。

## 結論

今回ヒツジ胎仔腹壁破裂モデルを作製しその羊水中のペプチドの網羅的解析を行い、正常妊娠群と比較して有意に増減するペプチドの存在が明らかになった。一部のペプチドのヒト相当領域は中皮細胞のサイト

カイン産生に影響をおよぼすことから、GS での炎症に関連している可能性が示唆された。