

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21334

研究課題名(和文)高濃度酸素暴露されたマウス肺における転写因子Bach1の重要性に関する研究

研究課題名(英文) Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes

研究代表者

小林 信吾 (KOBAYASHI, Shingo)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00464727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新生仔期における高濃度酸素暴露に対しBach1が寄与する影響を検討した。Bach1ノックアウト(KO)、野生型(WT)新生仔マウスに対し高濃度酸素暴露を96時間行った。WT群では酸素暴露による肺胞発達の遅延を日齢14まで認めた。一方、KO群では日齢14に肺胞化の改善が見られた。また、酸素暴露直後、WT群に比してKO群では肺内HO-1、IL-6、MCP-1のmRNA発現量およびIL-6蛋白発現量が一次的に上昇した。我々は、新生仔Bach1 KOマウスは高濃度酸素暴露によりHO-1とIL-6、MCP-1のアップレギュレートが一時的に惹起され、高濃度酸素性肺傷害に対する防御効果を示すことを示した。

研究成果の概要(英文)：Bach1 is a transcriptional repressor of HO-1. The effects of Bach1 disruption on hyperoxic lung injury in newborn mice have not been determined. We aimed to investigate the role of Bach1 in the newborns exposed to hyperoxia. Bach1<sup>-/-</sup> and WT newborn mice were exposed to 21% or 95% oxygen for 4 days. Lung histology was assessed and lung Bach1, HO-1, IL-6, and MCP-1 mRNA levels were evaluated. Lung inflammatory cytokine levels were determined using cytometric bead arrays. After 10 days recovery from neonatal hyperoxia, Bach1<sup>-/-</sup> mice showed improved lung alveolarization compared with WT. HO-1, IL-6, and MCP-1 mRNA levels and IL-6 and MCP-1 protein levels were significantly increased in the Bach1<sup>-/-</sup> lungs exposed to neonatal hyperoxia. Bach1<sup>-/-</sup> newborn mice were well-recovered from hyperoxia-induced lung injury. This effect is likely achieved by the antioxidant/anti-inflammatory activity of HO-1 or by the transient overexpression of proinflammatory cytokines.

研究分野：小児呼吸器学

キーワード：高濃度酸素 新生児 肺傷害

## 1. 研究開始当初の背景

BTB and CNC homology 1 (Bach1) は heme oxygenase (HO) -1 遺伝子の抑制性転写因子である。Bach1 ノックアウトマウスは成獣において心筋虚血 / 再灌流傷害や高酸素性肺傷害に対し防御作用を示すことが報告されているが、新生仔期高濃度酸素性肺傷害における Bach1 の作用については未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

新生仔期における高濃度酸素暴露に対し Bach1 が寄与する影響を検討する。

## 3. 研究の方法

Bach1 ノックアウト (knockout (KO))、野生型 (wild-type (WT)) 新生仔マウスに対し高濃度 (95%) 酸素暴露を 96 時間行い、以降はルームエア (21%酸素) 下で飼育した。日齢 4、14 で肺を摘出し、(1) hematoxylin and eosin (HE) 染色、エラスチン染色を用いた組織学的検討、(2) リアルタイム PCR を用いた Bach1、HO-1、interleukin (IL) -6、monocyte chemotactic protein (MCP) -1 遺伝子発現レベルの定量、(3) Cytometric Bead Array (CBA) を用いた炎症性サイトカイン蛋白発現レベル (interferon (IFN) -alpha、IL-12、IL-6、MCP-1、IL-10、tumor necrosis factor (TNF) -alpha) の定量を行った。いずれも出生時よりルームエア下で飼育したマウスをコントロールとした。

## 4. 研究成果

WT 群では新生仔期の高濃度酸素暴露による肺胞発達の遅延を認め、この肺胞化停止は日齢 14 まで続いていた (図 1、2)。一方で、

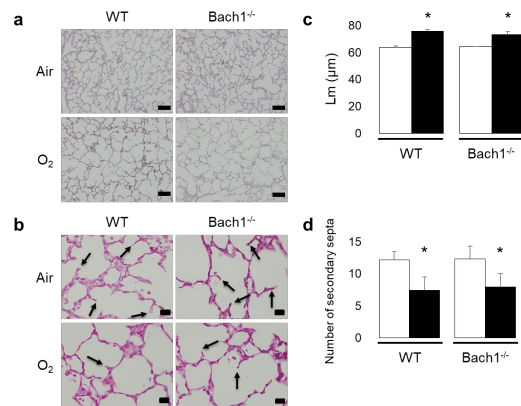


図 1. 新生仔期高濃度酸素暴露後の肺胞発達 (日齢 4) (a, HE 染色; b, エラスチン染色; c, mean linear intercept; d, 二次中隔数)

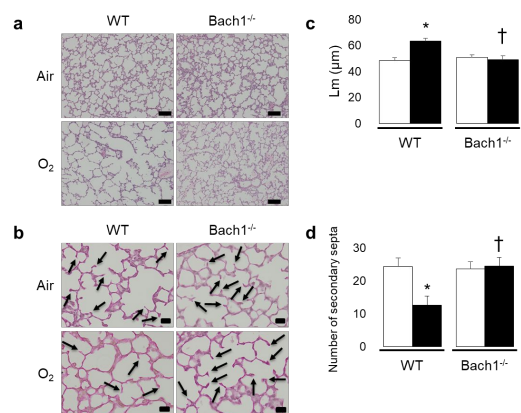


図 2. 新生仔期高濃度酸素暴露後の肺胞発達 (日齢 14) (a, HE 染色; b, エラスチン染色; c, mean linear intercept; d, 二次中隔数)

KO 群では日齢 4 の高濃度酸素暴露による肺胞発達遅延を認めるものの、日齢 14 では肺胞化の改善が見られた (図 1、2)。

また、高濃度酸素暴露直後の日齢 4 において WT 群に比して KO 群では肺内 HO-1、IL-6、MCP-1 の mRNA 発現量が有意に上昇した (それぞれ  $p < 0.05$ ) (図 3、5)。この有意な上昇は一時的で持続しなかった。CBA においても KO 群は高濃度酸素暴露により肺内 IL-6、MCP-1 の蛋白発現が有意に上昇した (それぞれ  $p < 0.05$ ) (図 4)。

我々は、新生仔 Bach1 KO マウスは高濃度酸素暴露により HO-1 と IL-6、MCP-1 のア

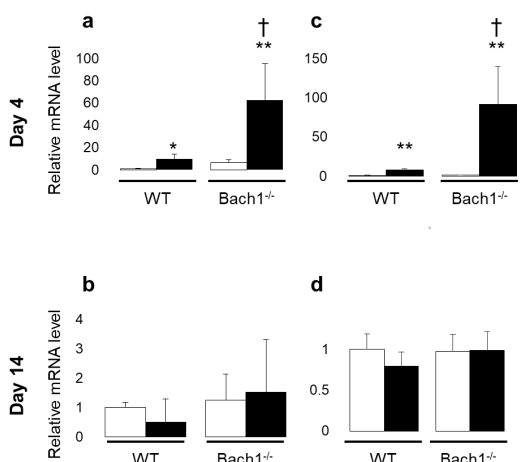


図3 . HO-1、IL-6 遺伝子発現レベル (a, b, HO-1; c, d, IL-6)

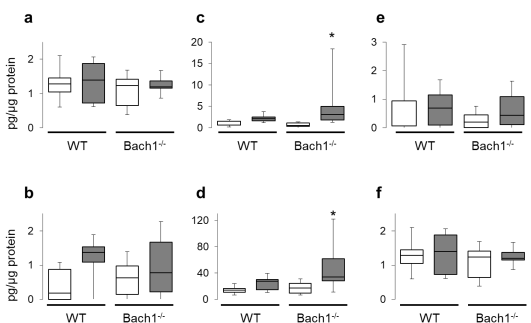


図4 .炎症性サイトカイン蛋白発現レベル(a, IFN-α; b, IL-12; c, IL-6; d, MCP-1; e, IL-10; e, TNF-α)

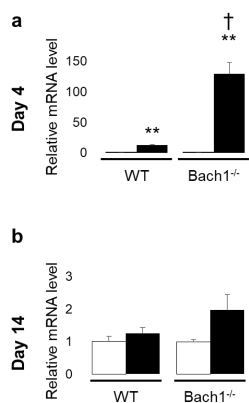


図5 . MCP-1 遺伝子発現レベル

ップレギュレートが一時的に惹起され、高濃度酸素性肺傷害に対する防御効果を示すことを示した。今後これらの変化による長期的な影響と詳細な機序を解明するため、さらな

る研究が必要である。

## 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 1件)

Ito M, Nagano N, Arai Y, Ogawa R, **Kobayashi S**, Motojima Y, Go H, Tamura M, Igarashi K, Dennery PA, **Namba F**. Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes. *Pediatr Res*. 2017. [Epub ahead of print]. (査読有)

[学会発表](計 3件)

Ito M, Arai Y, Ogawa R, Go H, Tamura M, Dennery PA, **Namba F**. Genetic ablation of the Bach1 gene upregulates HO-1 and IL-6 expression in the newborn lung exposed to hyperoxia. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting, 2016.5.2: Baltimore, USA, poster presentation.*

伊藤誠人、新井幸男、小川亮、田村正徳、**難波文彦** . 転写因子 Bach1 の遺伝子欠損は高濃度酸素暴露新生仔マウス肺において HO-1 と IL-6 の発現を増加させ肺保護効果をもたらす . 第 60 回日本新生児成育医学会、2015.10.25: 盛岡、一般講演

Ito M, Arai Y, Ogawa R, Go H, Kato I, Tamura M, Dennery PA, **Namba F**.

Genetic ablation of the Bach1 gene upregulates HO-1 and IL-6 expression in the newborn lung exposed to hyperoxia. Pediatric Academic Societies Annual Meeting, 2015.4.25: San Diego, USA, poster presentation.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 信吾 (KOBAYASHI, Shingo)

埼玉医科大学・小児科・助教

研究者番号： 00464727

### (2)研究協力者

難波 文彦 (NAMBA, Fumihiko)

埼玉医科大学・小児科・講師

研究者番号： 20643323