

令和元年6月10日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10105

研究課題名(和文) 新生仔期高濃度酸素性肺傷害修復過程におけるHAPLN1の重要性

研究課題名(英文) Identification and importance of hyaluronan and proteoglycan link protein 1 in developing mouse lungs

研究代表者

難波 文彦 (Fumihiko, Namba)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20643323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新生児に対する酸素毒性についてはよく知られている。今回、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により高濃度酸素暴露新生仔マウス肺内の新規バイオマーカーを同定し、そのマウス肺での重要性を評価した。

高濃度酸素暴露後回復させたマウス肺において、ルームエアと比較して発現量が変化した遺伝子Hapln1を同定した。Hapln1欠損E18.5胎仔マウスは野生型と比較して、肺重量低下、肺水含量低下、エアスペース減少、血管周囲コラーゲン量低下、ヒアルロン酸含量増加を示し、Hapln1欠損新生仔マウスは生後早期に死亡した。Hapln1は発達過程にあるマウス肺の形態発生に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児慢性肺疾患は早産・低出生体重児の重篤な呼吸器疾患であり、現在有効な治療法がなく、長期的な呼吸器及び神経学的合併症を残す。今回、新生児慢性肺疾患動物モデルを用いて、同疾患の重症化に關与する可能性のある細胞外基質蛋白質であるヒアルロン酸プロテオグリカン結合蛋白質1の遺伝子発現上昇を見出し、同蛋白質が胎児・新生児期の肺発達に重要な役割を果たすことをヒアルロン酸プロテオグリカン結合蛋白質1欠損マウスを用いて証明した。以上のことから、同蛋白質が新生児慢性肺疾患の新規バイオマーカーおよび新規治療ターゲットになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In premature infants, the lungs may not develop fully and have limited diffusing capacity for gas exchange; hence, supplemental oxygen is required. As excessive oxygen is known to be toxic to the lungs. Our objectives were to identify a novel biomarker in neonatal mouse lungs exposed to hyperoxia using microarrays for gene expression profiling and to evaluate its importance in the developing mouse lungs.

We identified HAPLN1 as a candidate gene that had significantly increased or decreased expression levels in hyperoxia-exposed mice compared with that in controls at 7 days. HAPLN1 knockout (KO) newborn mice died shortly after birth. The lungs displayed decreased lung weight, decreased lung wet/dry weight ratio, reduced airspace, increased HA content, and increased collagen content, in HAPLN1 KO embryos at E18.5 compared with those in wild-type mice. HAPLN1 might play an important role in morphogenesis in developing mouse lungs by organizing the components of extracellular matrix.

研究分野：新生児科学

キーワード：高濃度酸素 新生児 ヒアルロン酸プロテオグリカン結合蛋白質1 マウス 遺伝子発現解析 マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

早産・低出生体重児では、肺が未発達なままであり、ガス交換のための拡散能も制限され、それゆえ長期間の機械的人工呼吸管理と酸素投与を必要とする。過剰な酸素暴露は肺に対して毒性を持つことは知られており、新生児肺に対する高濃度酸素性肺傷害急性期の遺伝子発現変化についての報告は散見されるが、高濃度酸素暴露後の回復期については検討されていない。

## 2. 研究の目的

今回われわれは、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により高濃度酸素暴露後の回復期における新生仔マウス肺内の新規バイオマーカーを同定し、同定した分子の発達過程におけるマウス肺での重要性を評価した。

## 3. 研究の方法

生後 12 時間以内の新生仔マウス (C57BL/6) を 21% または 95% 酸素に 4 日間暴露させ、ルームエアで 3 日間回復させた。高濃度酸素とルームエアに暴露した肺内の遺伝子発現の違いについて、マイクロアレイ (Affymetrix GeneChip) を用いてスクリーニングした。同定した遺伝子ヒアルロン酸プロテオグリカン結合蛋白質 1 (Hapln1) mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR で再確認した。Hapln1 欠損胎仔マウスの表現型を、生存率、肉眼的形態、HE 染色および Masson's trichrome 染色による肺形態学、Purple-Jelley HA Assay と QuickZyme Total Collagen Assay を用いたヒアルロン酸およびコラーゲンの肺内含量定量により、野生型と比較した。

## 4. 研究成果

高濃度酸素暴露後に回復させたマウス肺において、ルームエアと比較して発現量が変化した 4 遺伝子 (Ccdc3, Prnd, Cpa3, Hapln1, Fhl5) を同定した (図 1A, B)。定量 RT-PCR により、新生仔肺内 Hapln1 遺伝子発現は、ルームエアと比較し高濃度酸素暴露後の回復期に長期間高値を示すことを確認した (図 1C, D)。

Hapln1 欠損新生仔マウスは、四肢短縮と顔面形成異常を示し (図 2B, C) 生後早期に死亡した (図 2D)。

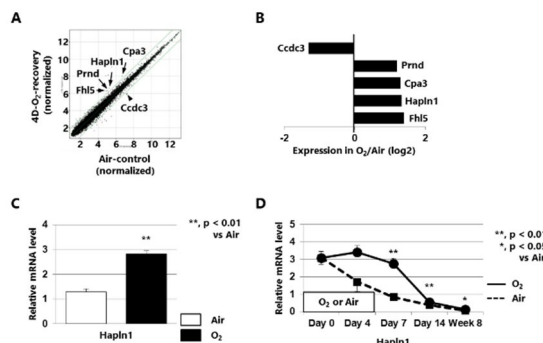


図1

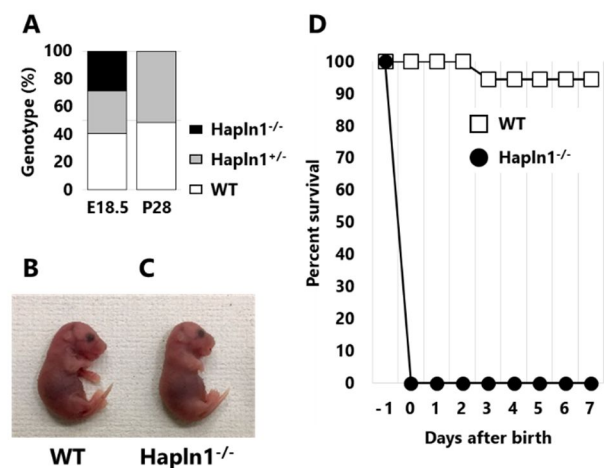


図2

Hapln1 欠損 E18.5 胎仔マウスは野生型と比較して、肺重量低下(図 3A)、肺水含量低下(図 3B)、エアスペース減少(図 3C-E)

ヒアルロン酸含量増加(図 4A)、コラーゲン含量増加(図 4B)、アグリカン含量低下(図 4C)を示した。以上から、Hapln1 は発達過程にあるマウス肺の形態発生に重要な役割を果たすことが示唆された。

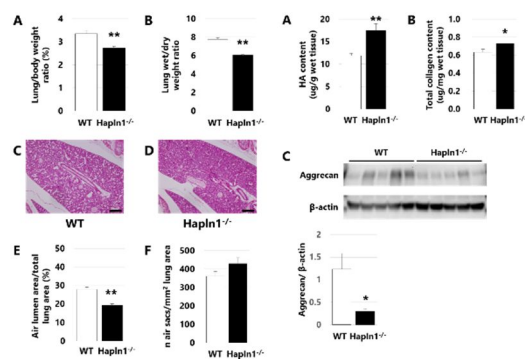


図3

図4

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計8件)

Tanaka K, Ozawa J, Watanabe T, Arai Y, Matsuoka K, Tamura M, Namba F. Identification and importance of hyaluronan and proteoglycan link protein 1 in developing mouse lungs. Pediatric Academic Societies Annual Meeting, 2018.5: Toronto, poster presentation.

難波文彦. 新生児慢性肺疾患研究 病態理解からバイオマーカー探索、新規治療法開発まで . 第121回日本小児科学会、2018. 4: 博多

田中広輔、小澤純一、渡邊貴明、新井幸男、松岡菊美、難波文彦. 発達過程のマウス肺における hyaluronan and proteoglycan link protein 1 の同定とその重要性 . 第58回日本呼吸器学会、2018. 4: 大阪、一般口演

難波文彦. 新生児慢性肺疾患研究 - 研究留学後、自分のラボを立ち上げて - . 秋田大学大学院医学系研究科 小児科学講座特別講演会、2017.11: 秋田、講演

難波文彦. 新生児慢性肺疾患研究 - 研究留学後、自分のラボを立ち上げて - . 第14回名古屋新生児フォーラム、2017.7: 名古屋、講演

Namba F, Nagano N, Ito M, Ozawa J, Watanabe T, Arai Y, Miyake F, Matsumura S, Tamura M. Identification and importance of hyaluronan and proteoglycan link protein 1 in the developing mouse lung. Pediatric Academic Societies Annual Meeting, 2017.5: San Francisco, poster presentation.

難波文彦. 「CLDの最前線」CLD研究 - 基礎研究からトランスレーショナル研究まで - . 日本新生児成育医学会、2016.12: 大阪、講演

難波文彦、川崎秀徳、本島由紀子、岡俊太郎、伊藤加奈子、大島拓也、大島あゆみ、伊藤誠人、新井浩和、長野伸彦、渡邊貴明、三宅芙由、田村正徳. Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 遺伝子の一塩基多型: 新生児慢性肺疾患の発症・重症度との関連性 (第一報). 第61回日本新生児成育医学会、2016. 12: 大阪、一般口演

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：田中 広輔

ローマ字氏名：( TANAKA, kosuke )

研究協力者氏名：松岡 菊美

ローマ字氏名：( MATSUOKA, kikumi )