

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K18005

研究課題名(和文) 前駆タンパク質転換酵素に着目した未熟児慢性肺疾患の病因解析と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment focusing on the proprotein convertase in chronic lung disease of the premature infant

研究代表者

加藤 晋(Kato, Shin)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：90551250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞形成に関わる因子の前駆タンパク質を切断する酵素として知られている furin が、早産児慢性肺疾患の病態形成の鍵となると考え、新生仔マウス高濃度酸素暴露による慢性肺疾患モデルを用いてその役割を検証した。マウス肺の myofibroblast に furin が発現していることを示したうえで、病態モデルマウスで furin とその標的蛋白の発現が減少し、肺胞形成が悪化することを示した。次に furin 阻害剤の投与で、病態が再現されることを示した。最後にこのモデルに furin を投与することで肺胞形成が改善することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で我々は、早産児に特有の慢性肺疾患の病因として、新規に furin が重要な役割を果たしていることを世界で初めて明らかにした。標準治療では改善が困難な重症の慢性肺疾患において、新規治療戦略の選択肢となりうる。毎年およそ1200人前後と推計される罹患児の長期予後の改善から社会参画の促進や医療費の抑制につながることも期待できるなど、社会的意義が非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that furin, also known as an enzyme that cleaves proproteins of factors involved in alveologenesis, may play a key role in the pathogenesis of chronic lung disease in preterm infants. Here we examined its role using a chronic lung disease model in neonatal mice exposed to 85% oxygen. We showed that furin is expressed in myofibroblasts in mouse lungs, and that the expression of furin and its target proteins is decreased in the mouse model, resulting in worsened alveoli formation. Next, we showed that administration of a furin inhibitor successfully reproduced the pathology. Finally, we showed that treatment with furin improved alveoli formation in a hyperoxia-exposed mouse model.

研究分野：新生児学、新生児呼吸器病学

キーワード：慢性肺疾患 早産児 肺胞形成 前駆タンパク質転換酵素 myofibroblast

## 1. 研究開始当初の背景

慢性肺疾患は、出生体重が1000g未満の超低出生体重児の遠隔期合併症のひとつである。呼吸機能低下だけでなく、長期入院や活動制限から精神社会的発達も遅らせるなど、新生児医療の成績向上や医療費削減においても大切なテーマである。日本では、胎内感染があった早産児の中に、生後初期よりレントゲンで泡沫気腫状陰影を示す一群をはやくから区別して把握してきた(慢性肺疾患型)。肺のう胞を形成して重篤な経過をたどり、退院前死亡原因となるなど厳しい予後を示すが、その発症機序・病態はまだ完全に把握されておらず、その解明が根本的な治療介入や、発症予防のために急がれる。

慢性肺疾患で肺胞形成促進効果のあるNO-cyclic GMP(cGMP)-cGMP dependent protein kinase I(PKGI)シグナル系を解析し、その活性を調節する酵素として前駆体蛋白変換酵素のfurinを同定した。furinはPKGIのほかに、Insulin like growth factor I(IGF-I), IGF-I receptor, platelet-derived growth factor-A(PDGF-A)やtransforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )などの、肺胞形成に関わる因子の前駆タンパク質を切断する酵素としても知られている。

## 2. 研究の目的

出生後早期から重篤な経過を示す慢性肺疾患の一群は、「炎症によりゴルジ体機能が妨げられてfurinの酵素活性が低下し、肺胞形成を促す因子の活性低下が起こることが原因となっている」との仮説を立てるに至った。新生仔マウスによる慢性肺疾患モデルをもちいてこれを立証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### a. 高濃度酸素暴露による慢性肺疾患モデル動物の作成

日齢0(P0)のC57BL6マウス新生仔を母子ともに85%酸素濃度を維持したチャンバーへ入れ、10日間暴露する。安楽死させた後開胸して、右心室より0.1molクエン酸ナトリウムを用いて血液をフラッシュする。気管切開を行い、PEチューブで気道にカニューレーションを行い、4%パラホルムアルデヒドを20cmの高さから大気圧でinflateし、30分間固定を行う。気道を結紮して全身を4%パラホルムアルデヒド溶液にて48時間固定する。肺を取り出してパラフィン包埋して薄切切片を作成し、組織の定量的解析、immunohistochemistry, immunofluorescenceに用いた。

### b. 慢性肺疾患モデルの病理組織像における肺の定量評価

肺切片標本を光学顕微鏡下に撮像し、NIH提供のフリーソフトウェアImage Jを用いて、mean linear intercept法とtissue volume density法を用いて平均肺胞径と組織密度を評価した。

### c. ウェスタンブロッティングによる蛋白発現量評価

P10で液体窒素下に凍結して保存しておいた肺切片を、同じく液体窒素下に粉砕して回収し、RIPA bufferに溶解した。ソニケーションの後、4℃、ローターで30分間溶出して上清を試料とした。蛋白濃度測定にはBCAアッセイを用いた。

### d. 新生仔肺の初代培養とimmunocytochemistry

P1の新生仔マウス肺をaで述べた方法で血液をフラッシュしたあと摘出する。Lung

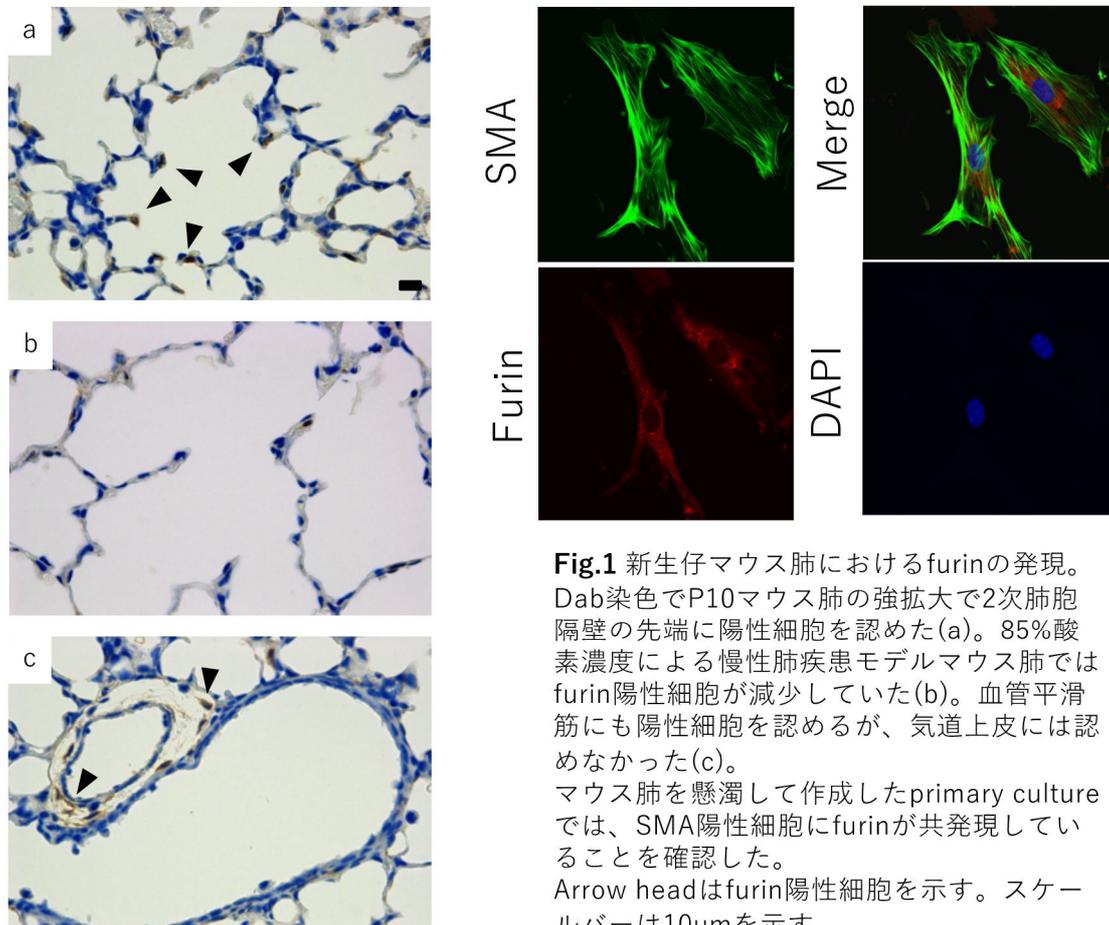
dissociation kit を用いて酵素的・物理的に単細胞溶液化を行い、ガラスボトム dish に播種する。4 日間の培養後固定し、抗原特異的抗体、蛍光色素結合二次抗体を用いて細胞染色を行い、confocal microscope にて目的蛋白の発現を確認した。

e. 統計学的検定

各群の定量評価の比較には、ウィルコクソン検定、もしくはフリードマン検定を使用し、 $p < 0.05$  を有意とした。

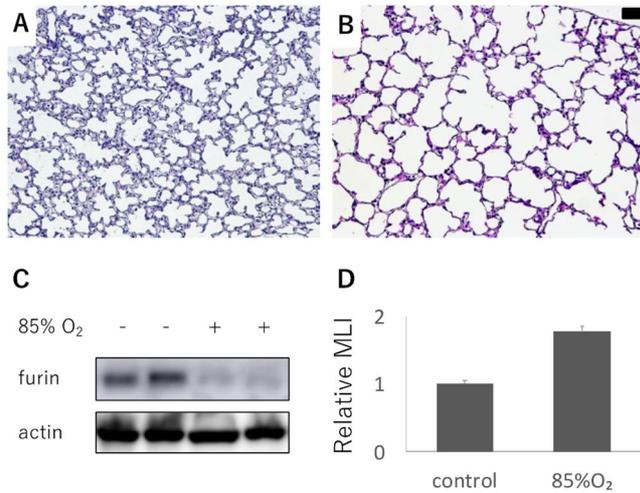
4. 研究成果

新生仔マウス肺には furin 陽性細胞が存在する。P10 マウス肺には furin 陽性細胞が存在することが確認できた。強拡大でみると、2 次肺胞隔壁が貫入していく先端に陽性細胞を確認することができ(a, 矢頭)、myofibroblast であることが示唆された。furin 陽性細胞は、大血管の中膜に存在するが、気道上皮には乏しいことがわかる(c)。lung primary culture の蛍光免疫染色法では、furin が SMA 陽性細胞に共発現していることが確認でき、新生仔マウス肺において、myofibroblast に furin が存在していることが示された。



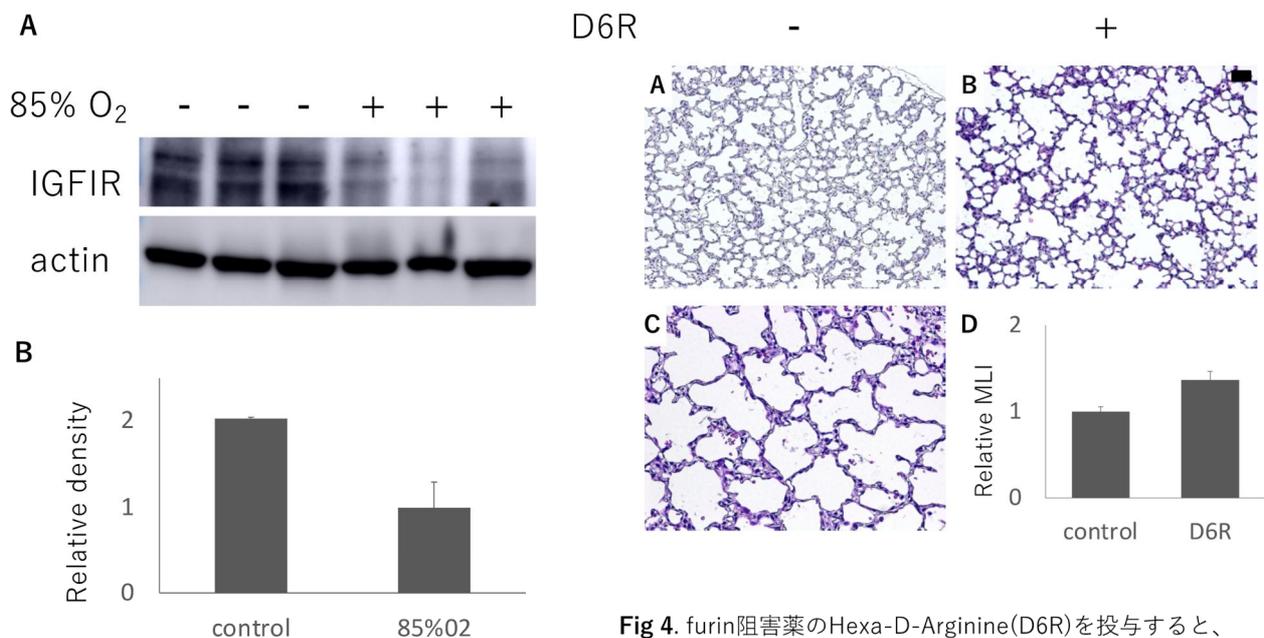
**Fig.1** 新生仔マウス肺におけるfurinの発現。Dab染色でP10マウス肺の強拡大で2次肺胞隔壁の先端に陽性細胞を認めた(a)。85%酸素濃度による慢性肺疾患モデルマウス肺ではfurin陽性細胞が減少していた(b)。血管平滑筋にも陽性細胞を認めるが、気道上皮には認めなかった(c)。マウス肺を懸濁して作成したprimary cultureでは、SMA陽性細胞にfurinが共発現していることを確認した。Arrow headはfurin陽性細胞を示す。スケールバーは10umを示す。

高濃度酸素による慢性肺疾患モデルマウスの肺では furin の発現が減少している。P0 から P10 まで 10 日間 85%酸素暴露を行い作成する慢性肺疾患モデル(85%群, B)では、control 群(A)と比較して肺胞形成が著しく低下する。P10 で保存した肺の懸濁液で行った Western blotting では、85%群で furin の発現が減少していた。Morphometry として平均肺胞径(Mean linear intercept; MLI)を評価すると、85%群で有意に拡大していることが確認できた。



**Fig 2.** 高濃度酸素による慢性肺疾患モデルマウスの肺では furin の発現が減少している。85%酸素への10日間の暴露は control(A)と比較して肺胞形成を著しく低下させる(B)。Western blottingでfurin発現が減少している(C)。平均肺胞径(MLI)の拡大を認めた(D)。スケールは10umを示す。

高濃度酸素による慢性肺疾患モデルマウスの肺では furin の標的蛋白の一種である IGF-IR の発現が減少している。モデル動物肺を P10 で回収したものを、液体窒素下に破碎して作成した蛋白試料を western blotting で検出した。control 群と比較して、85%群では IGF-IR の発現が半分程度まで減少していることが確認できた。



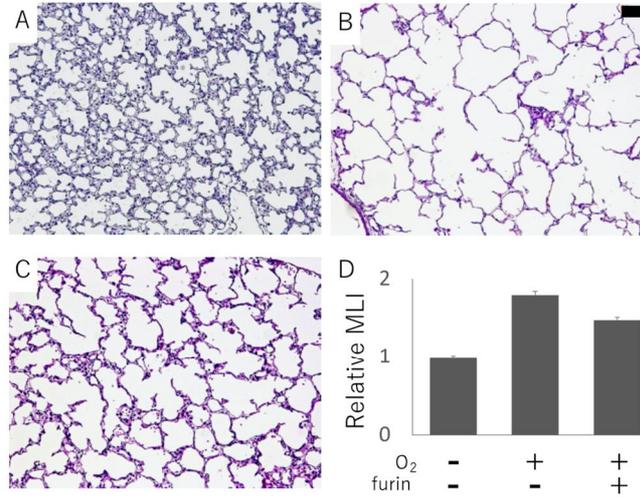
**Fig 3.** 高濃度酸素による慢性肺疾患モデルマウスの肺ではIGFIRの発現が減少している。85%酸素への10日間の暴露はfurinの標的蛋白のひとつである、IGFIRの発現を減少させた(A)。Densitometryの結果を示す(B)。

**Fig 4.** furin阻害薬のHexa-D-Arginine(D6R)を投与すると、肺胞形成が阻害される。P2から2日おきにD6Rを腹腔内投与してP10で固定した。control(A)と比較してD6Rを投与した群(B)では、肺胞形成の遅延が認められた。強拡大で観察すると、肺胞を構成する細胞数や肺胞隔壁の厚みは保たれていることがわかる(C)。肺胞形成の程度をMLIによる評価で確認した(D)。スケールは10umを示す。

furin 阻害薬の Hexa-D-Arginine(D6R)を投与すると、肺胞形成が阻害される。P2 から 2 日おきに D6R を腹腔内投与して P10 で固定した。control 群(A)と比較して D6R を投与した群(B)では、肺胞形成の遅延が認められた。強拡大で観察すると、肺胞を構成

する細胞数や肺胞隔壁の厚みは保たれていることがわかる(C)。肺胞形成の程度を MLI による評価で確認した(D)。

Furin の発現変化は、新生仔マウスの肺胞形成に影響する。85%酸素10日間の暴露は、control 群(A)と比較して肺胞形成を著しく低下させる(B)が、furin の腹腔内投与を行うことで一定の改善を得ることが示された(C)。MLI で評価を行い、各群間で有意な変化を確認した(D)。



**Fig 5.** Furinの発現変化は、新生仔マウスの肺胞形成に影響する。85%酸素10日間の暴露はcontrol(A)と比較して肺胞形成を著しく低下させる(B)。85%酸素暴露を受けているマウスに、P2から2日おきにfurinを腹腔内投与すると、肺胞形成の改善が認められる(C)。MLIでこれを確認した(D)。スケールは50umを示す。MLI, mean linear intercept.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shin Kato, Osuke Iwata, Yasumasa Yamada, Hiroki Kakita, Takaharu Yamada, Hideyuki Nakashima, Tokio Sugiura, Satoshi Suzuki, Hajime Togari	4. 巻 61
2. 論文標題 Standardization of phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia using multiple-wavelength irradiance integration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics and Neonatology	6. 最初と最後の頁 100-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pedneo.2019.07.002	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 -
1. 著者名 Shunsuke Araki, Shin Kato, Fumihiko Namba, Erika Ota	4. 巻 13
2. 論文標題 Vitamin A to prevent bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants: a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0207730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0207730	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 -
1. 著者名 Harada E, Kinoshita M, Iwata S, Saikusa M, Tsuda K, Shindou R, Sahashi T, Kato S, Yamada Y, Saitoh S, Iwata O	4. 巻 in press
2. 論文標題 Visual function scale for identification of infants with low respiratory compliance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics & Neonatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pedneo.2019.02.006	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 -
1. 著者名 加藤 晋、近藤 康宏、水谷 優子、粟屋 梨沙、圓若 かおり、廣岡 孝子、横山 岳彦、田中 太平	4. 巻 53
2. 論文標題 新生児領域でのHeated humidified high flow nasal cannulaの導入基準の検討 -当院における使用経験を踏まえて-	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本周産期・新生児医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 88-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shin Kato, Osuke Iwata, Takaharu Yamada, Yuko Mizutani, Taihei Tanaka, Shinji Saitoh
2. 発表標題 Admission temperatures in very low birth-weight infants and their neurodevelopmental outcomes
3. 学会等名 Pediatric Academic Society Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 晋, 岩田欧介, 山田崇春, 水谷優子, 田中太平, 中村泰久, 津田兼之介, 戸川貴夫, 加藤文典, 岩田幸子, 齋藤伸治
2. 発表標題 極低出生体重児の入院時体温が発達予後を左右する
3. 学会等名 第64回日本新生児成育医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤晋、荒木俊介、難波文彦、大田えりか
2. 発表標題 低出生体重児に対するビタミンA投与は修正36週の慢性肺疾患を減少させる：系統的レビューとメタ解析
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

1. 発表者名 Shin Kato, Osuke Iwata, Takaharu Yamada, Taihei Tanaka, Shinji Saitoh
2. 発表標題 Heated humidified high flow nasal cannula in very-low birth weight infants: Potential benefit in promoting oral feeding and early hospital discharge.
3. 学会等名 European Academy of Paediatric Societies (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 晋
2. 発表標題 高濃度酸素暴露マウス慢性肺疾患モデルにおけるproprotein convertaseの発現変化
3. 学会等名 第2回新生児基礎トランスレーショナルリサーチ研究会
4. 発表年 2019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
研究協力者	浅井 清文  (Asai Kiyofumi)		
研究協力者	加藤 寛之  (Kato Hiroyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------