

機関番号：32653  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18591951  
 研究課題名（和文）：胎児横隔膜ヘルニアにおける肺血管のリモデリング解析と胎児治療モデルの作成  
 研究課題名（英文）：The remodeling of the pulmonary artery in Nitrofen-induced diaphragmatic hernia  
 研究代表者：  
 幸地 克憲 (KOUCHI KATSUNORI)  
 東京女子医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：40312938

研究成果の概要（和文）：ラット横隔膜ヘルニア群（CDH）での肺血管では、angiopoietin-1の発現量は優位に低下、ET1、ET1 receptor A, Bは優位に増加、VEGF、angiopoietin-2、ephrinA1, B2、PDGFb、各 receptor の発現量は正常群と差を認めなかった。この結果から CDH では肺動脈壁肥厚に ET1 が大きく関与していることが考えられ、ET1 receptor antagonist を用いて、肺動脈壁の肥厚を抑制できるか検討した。母胎投与された ET1 receptor antagonist により、胎児 CDH 群の肺動脈壁肥厚は優位に抑制されたことから、CDH における肺動脈壁肥厚には ET1、ET receptor の発現量増加が大きく関与していると考えられ、ET1 antagonist 投与による胎児治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In Nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia (CDH) fetal rat, the expression of angiopoietin-1 was low and the ET1, ET1 receptor A/B was high. The other genes; VEGF, angiopoietin-2, ephrinA1, B2, PDGFb and their receptor was no alternation compared with normal fetal rat. This suggested that over expression of ET1 and its receptor A/B induced the wall thickness of CDH fetal rat. Therefore, We examined the effect of ET receptor antagonist to fetal dam. Pregnant rat gavaged ET1 antagonist. In these dam, the thickness of the pulmonary artery was not observed and the expression of VEGF was increased. In the other gene expression were not altered. In conclusion: ET receptor antagonist increased the expression of VEGF and reduced the wall thickness of the pulmonary artery in CDH dam. We supposed the high expression of VEGF made the prevention of the wall thickness. ET receptor antagonist has effect to prevent the pulmonary hypertension in newborn CDH.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科(E)

キーワード：胎児、横隔膜ヘルニア、肺高血圧

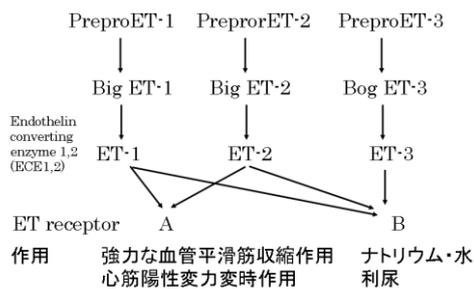
### 1. 研究開始当初の背景

胎児診断の普及と超音波診断技術の普及に伴い、横隔膜ヘルニア（以下CDH）の胎児診断例は増加し、生直後より専門施設での intensive care が行われている。しかし、現状では胎児診断されたCDHの予後は一般的に不良であり、胎児診断の恩恵を受けていない。この理由として胎児診断のCDH予後不良例の肺は極めて未熟であり、肺低形成および血管平滑筋の肥厚による肺高血圧の2つの重篤な病態を伴っている。

近年の分子生物学的研究により、肺血管の発生とremodelingの過程に関わる遺伝子：VEGF, angiopoietin, ephrinが解明され、肺血管形成の過程とこれに関わる遺伝子の発現が分かってきた。

更に、肺血管トーンを司る遺伝子として endothelin が関与していることが判明した。（図2）

### Endothelin(ET)の産生と作用



(図2)

ここで、胎児診断された予後不良のCDH例において、肺血管のremodelingを胎児期より誘発したり、肺血管トーンをコントロールすることで、出生後の著明な肺高血圧を抑制させる可能性が考えられる。これにより、胎児診断の予後不良例や出生後診断例の中でも重症例での治療

成績を改善させる可能性が期待される。

本研究の特徴

1) 現在、人CDHおよびラットCDHモデルにおける肺血管構築に関わる遺伝子の中心は、VEGFであり、人CDHでは出生後VEGFの発現は増加しているとされている。しかし、我々の胎児CDHラットを用いた研究では、VEGFの発現量は胎児期においては、正常胎仔とCDHラットでは発現量の差は認められなかった。すなわち、従来研究されてきたVEGFは、CDHにおける肺血管壁肥厚に深く関与していない可能性がある。血管構築に関わる主な遺伝子は、VEGF, angiopoietin, ephrinの3つとされている。今までCDHにおけるephrinの研究報告はなく、CDHの肺血管構築にephrinがどのように関与しているか判明する。

更に、これら遺伝子の解析の他、血管トーンをコントロールする因子であるET1, receptor A/Bの発現量を解析することにより、VEGF, angiopoietin, ephrinと如何にCDHモデルでは関連するかの検討することが可能となる。これにより、肺血管構築のメカニズムが分かる可能性がある。

2) 予後不良のCDH例に対し、従来の胎児手術とは異なる新たな胎児治療法の確立が考えられる。従来の胎児治療は、胎児鏡下に気管を結紮する方法（Endoscopic fetal tracheal occlusion : Fetendo）が行われ、施行例の約70%が生存したとの報告があるが、施行にあたっては、母体・胎児の両者にリスクを伴い、侵襲的な治療と考えられる。本研究では、妊娠ラットにET1, receptor A/Bを経口投与することで、胎児CDHの肺血管壁肥厚を抑制できるか検討する。本手法により肺血管の肥厚が抑制され

るようで有れば、今までの報告にない全く新たな肺高血圧に対する治療法で、本手法が確立されれば、予後不良の CDH の新たな治療法の確立につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

ラット CDH モデルを用いて肺血管形成、トーンスに与える遺伝子の発現を解析し、胎児肺動脈壁肥厚の抑制が可能か検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) ラット CDH モデルの作成

GA 17、19、21 日目に帝王切開にて胎仔を摘出。GA-17、19、21 日目の胎仔は、顕微鏡下に横隔膜ヘルニアの有無を確認後、胎仔肺を摘出し、CDH が形成されなかった群:CDH-群、CDH が形成された群:CDH+群に分類する。C 群、CDH-群、CDH+群の肺組織から cDNA を作成、同時に免疫染色用の凍結標本を作成する。

#### 【方法 1】

#### A) 肺動脈壁の面積

胎児肺組織を摘出後、CDHモデルの有無を検索。

#### Nitrofenによる胎仔CDH出現頻度

妊娠ラット7匹		
Total dam	CDH+	CDH-
101	58(57.4%)	43(42.6%)

Nitrofen投与におけるCDH作出頻度は、43%であり、他の報告と比較しても、同じような率であり、本実験モデルとして適当であると判断した。

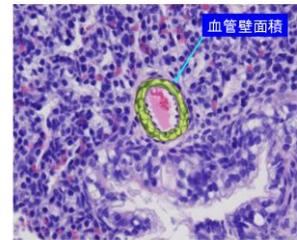
#### B) 病理標本と肺動脈血管壁の算出

胎児肺組織を摘出後、HE標本を作製し、画像解析ソフトを用いて、100  $\mu$ m以下の肺血管壁

の厚さを解析

## 肺動脈血管壁面積の算出

血管面積( $\mu$  m<sup>2</sup>)=血管外周面積-血管内周面積



### C) 遺伝子解析

①RT PCR hybrid probeの作成: ephrinは、まず2つのsubclass A, Bが存在し、さらにA, Bは幾つかの subclassに分類されている。現時点では、肺血管構築に早期に関わる ephrin subclassはB2, B4とされ、A1は胎生後期に発現するとされ、発現部位では、B2は肺動脈、B4は肺動静脈に発現し、A1は肺胞上皮に発現する。

まずA, Bのsubclassを分類できるように、probeをデザインし、pan A, pan BのRNA発現量を計測できるようにする。

②検量線用probeの作成: RNA発現量解析のためには、検量線用probeの作成が必要なため、pan A, pan Bの検量線用probeを作成する。

③Ephrin RNA発現定量: C群、CDH-群、CDH+群のGA 17、19、21日目の各肺組織での ephrin RNA発現をRT PCRを用いて測定する。Internal marker (GAPDH) による補正を行い、ephrinのRNA発現量を定量する。

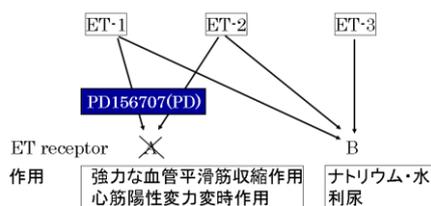
【方法 2】肺血管構築に関わる遺伝子解析と同時に、肺血管トーンスを司る遺伝子である endothelin (ET) の解析は、CDHにおける肺高血圧の病態解明において、極めて重要な問題となる。ETは、不活性型のbig ETが産生され、ET converting enzymeの作用により活性型のET-1、-2、-3が産生される。そのレセプター

は、type A, Bがあり、Aにおける作用は、強力な血管平滑筋収縮作用と心筋陽性変力変時作用を呈する。Bでは、ナトリウム・水利尿の作用を呈し、ノックアウトマウスでは食塩感受性の高血圧を呈することが、報告されている。

ET-1, receptor type A, B に対する hybridprobe、検量線プラスミドを作成し、RNA定量を行う。更に ET converting enzyme-1は、市販ベースで hybridprobe が存在するため、ET converting enzyme に対してもその発現を解析する。以上のデータを元に、CDHにおける血管トーンを有効にコントロールできるか、研究を進める予定である。

【方法3】妊娠ラットに NT 投与後、GA15～19 までそれぞれ ET1 receptor antagonist:PD50, 100mg/kg (PD50 群、PD100 群), Bosentan50, 100mg/kg (Bos50, 100), ATZ50, 100mg/kg (ATZ50, 100) を経口投与し、対照は生食のみ投与。この他 NT を投与しない群を正常群とした。GA20 に肺組織を摘出後、肺動脈壁の肥厚を HE 標本の上、画像解析ソフトにより正常群、対照群、CDH 群の3群間で比較検討する。さらに、これら3群間での VEGF の発現量を比較し、ET1 receptor antagonist と VEGF 発現の間に相関関係があるか検討する。

### Endothelin (ET) の産生と作用



### 実験 2

GA(日)	9.5	15	16	17	18	19
		PD156707 100mg				
対照群	Olive oil	↓	↓	↓	↓	↓
CDH群	Nitrofen	↓	↓	↓	↓	↓

1. 胎仔の肺動脈壁面積の計測: GA20

2. RT-PCRによるVEGF発現量の測定

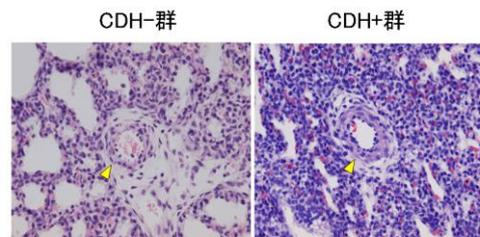
### 4. 研究成果

#### 【結果1】

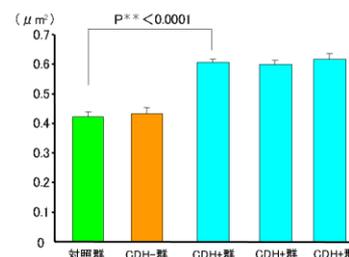
A) 肺動脈壁の肥厚の状態

CDH 群では対照群と比べ、優位に肺動脈壁の肥厚を認めた。

#### CDH群における血管壁の形態 —GA21—



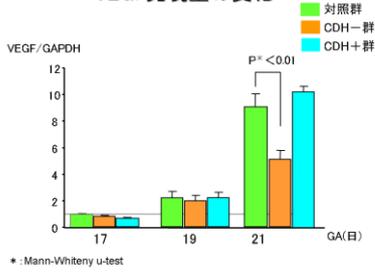
#### GA21各群における肺動脈壁面積



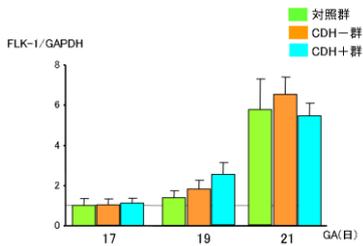
\*: 横隔膜ヘルニア側  
\*\* : Mann-Whitney u-test

【結果2】 CDH 群では対照群と比較し、GA21で angiopoietin-1 の発現量が優位に低下していたが、VEGF、angiopoietin-2、ephrinA1, B2、PDGFb、各 receptor の発現量は各 GA で差を認めなかった。

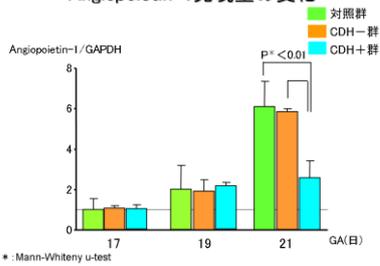
VEGF発現量の変化



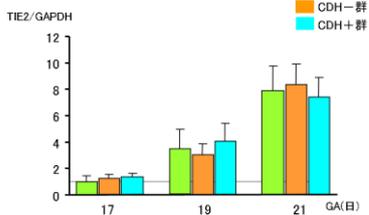
FLK-1発現量の変化



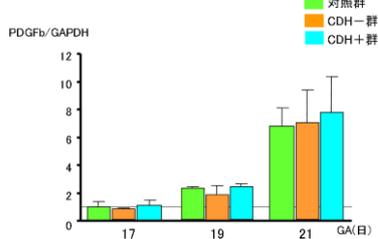
Angiopoietin-1発現量の変化



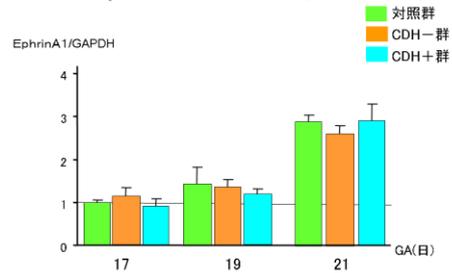
TIE2発現量の変化



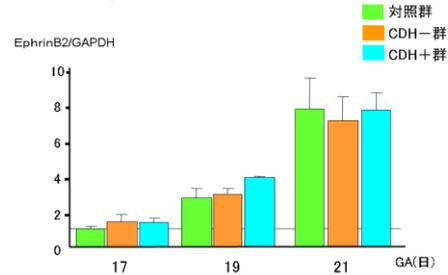
PDGFb発現量の変化



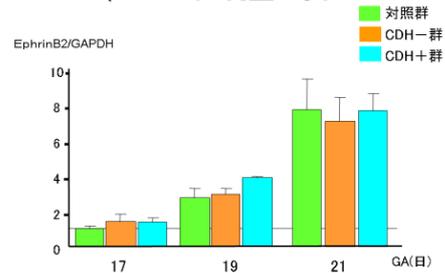
EphrinA1発現量の変化



EphrinB2発現量の変化

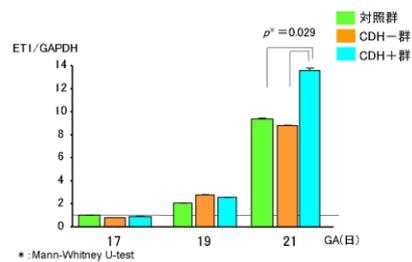


EphrinB2発現量の変化

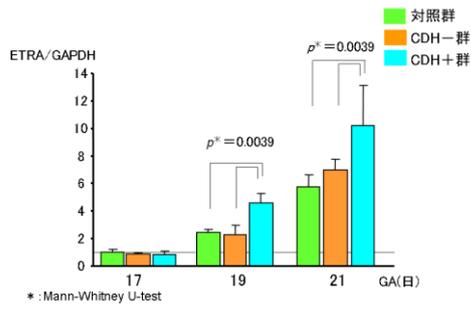


【結果 2】 ET1 は GA21、ET1 receptor A, B は GA19, 21 において CDH 群で優位に発現量の増加を認めた。この結果から CDH では胎児肺動脈壁肥厚に ET1 が大きく関与していることが考えられ、ET1 receptor antagonist: PD156707 (PD), Bosentan, ATZ を用いて肺動脈壁厚に及ぼす影響を検討した。

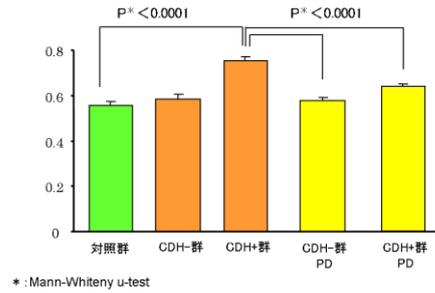
ET1発現量の変化



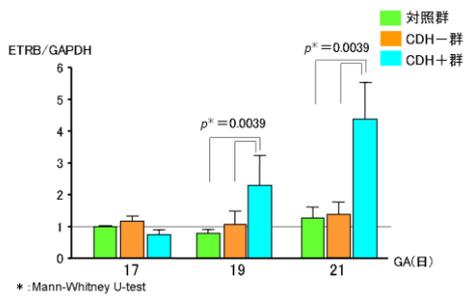
### ET receptor-type A (ETRA) 発現量の変化



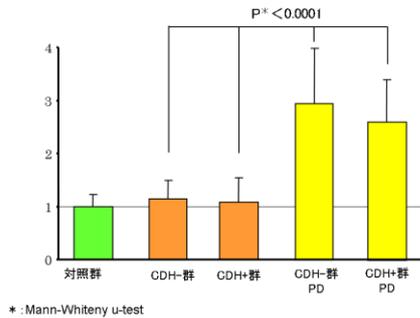
### GA20各群における肺動脈壁面積



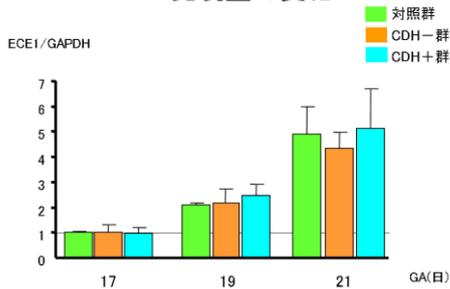
### ET receptor-type B (ETRB) 発現量の変化



### GA20 各群におけるVEGFの発現量

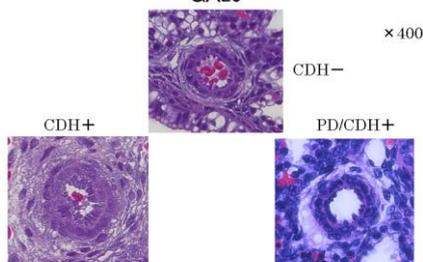


### ECE1 発現量の変化



【結果 3】肺血管壁の肥厚は、対照群に比べ PD, Bos, ATZ 群で優位に抑制された。VEGF の発現量も対照群、正常群に比べ PD, Bos, ATZ 群で優位に高値であった。

### 各群における血管壁の形態 —GA20—



【まとめ】CDHにおける肺動脈壁肥厚にはET1、ET receptorの発現量増加とVEGFの相互関係が大きく関与していると考えられた。母胎投与におけるET1 antagonistにより、胎児CDHモデルでの肺動脈壁肥厚が優位に抑制されたことから、胎児CHD治療になりうる可能性が示唆され、今後重症横隔膜ヘルニアの胎児診断例に対する新たな治療法として期待されるものと思われた。

### 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)

[学会発表] (計1件)

ラット横隔膜ヘルニアモデルを用いた血管形成の分子生物学的検討とEndothelin1阻害薬による肺動脈壁肥厚の抑制 幸地克憲、松浦玄、吉田英生、菱木知郎、齋藤武、照井慶太 第45回日本小児外科学会シンポジウム 筑波 2008/5/28~30

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

幸地 克憲 (KOUCHI KATSUNORI)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40312738