

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16288

研究課題名(和文)横隔膜ヘルニア症における横隔膜欠損の発症機序の解明と新規予防法を目指した基礎研究

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms of diaphragmatic defects in the congenital diaphragmatic hernia disease and new treatment modalities.

研究代表者

高橋 俊明 (Takahashi, Toshiaki)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70624857

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)：本研究は、先天性横隔膜ヘルニアの動物モデルを作製し、関連遺伝子の1つとされるPbx1等の遺伝子の発現、およびタンパク産生をqRT-PCR法や、組織免疫染色法で分析した。結果、Pbx1や、ともに一連のシグナル経路の中で働くMeis2、Runx1の肺や横隔膜組織での蛋白および遺伝子発現が、疾患モデル群において有意に減少していることが確認された。COVID-19の流行による種々の制限により、予防治療を模索するための追加実験の機会には恵まれなかったが、Pbx1、Meis2、Runx1のシグナルの障害が、横隔膜欠損の発生に関与しているという理論の提唱に成功し、その成果は雑誌掲載という形で評価された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性横隔膜ヘルニアの臨床的な致死率を鑑みるに、その発症機序を解明する研究は急務である。横隔膜欠損を引き起こす分子メカニズムの解明は、そのシグナル経路に対する治療的関与への可能性へと繋がるものである。先天性横隔膜ヘルニア関連遺伝子の1つとされるPbx1、Meis1、Runx1が、ともに一連のシグナル経路を構成して、原始横隔膜の形成に大きな働きを担い、その破綻が疾患における横隔膜欠損の背景にあるというメカニズムを明らかにした。

この研究はヨーロッパで最も権威のある小児外科雑誌に掲載され、今後はさらにそこから胎児期における予防的投与薬剤の開発への重要な足がかりとなると確信している。

研究成果の概要(英文)：Diaphragmatic and pulmonary gene expression levels of Pbx1, Meis1 and Runx1 were analyzed by qRT-PCR and protein expression was evaluated by immunofluorescence-double-staining. In results, Relative mRNA expression of Pbx1, Meis1 and Runx1 was significantly decreased in developing diaphragms and lungs of nitrofen-exposed fetuses compared to controls. Confocal-laser-scanning-microscopy revealed markedly diminished Pbx1, Meis1 and Runx1 immunofluorescence in diaphragmatic and pulmonary mesenchyme, associated with less proliferating mesenchymal cells in nitrofen-exposed fetuses compared to controls. In conclusions, decreased Pbx1, Meis1 and Runx1 expression during diaphragmatic development and lung branching morphogenesis may reduce mesenchymal cell proliferation, causing malformed PPFs and disrupted airway branching, thus leading to diaphragmatic defects and PH in the nitrofen-induced CDH model. These findings may therefore provide new insights into the pathomechanisms underlying CDH.

研究分野：Congenital malformation

キーワード：CDH pulmonary hypoplasia Pbx1 Meis1 Runx1

1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニアは、横隔膜の欠損を特徴とする先天奇形である。2000 出生に 1 人という大変頻度の高い割合で発生し、これはすべての先天奇形の 8%にも及び (McGivern et al. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2015, 100, F137-144)。横隔膜の欠損は腹腔内臓器の胸腔内への嵌入を引き起こし、胎児期の肺の発達を障害する (図 1)。近年の新生児医療は目覚ましい発展を遂げたが、こと先天性横隔膜ヘルニアに関して言えば、肺低形成、遷延性肺高血圧という深刻な合併症を伴うことから、患児の救命率は依然として低いままである (McHoney et al. Pediatr Surg Int, 2015, 31, 1005-1013)。にもかかわらず、“なぜ横隔膜に欠損が発生するのか?”という「問い」に対する解答は未だ得られていない現状がある。このため、先天性横隔膜ヘルニアの発症機序の解明は、現在の新生児医療の現場では最重要課題の一つである。

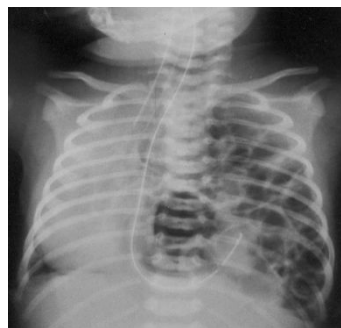


図 1
左側横隔膜ヘルニアを伴う新生児の胸部 X 線写真 (左側肺野に嵌入した腹腔内臓器を認める)

近年の横隔膜の発生の研究によると、ラットでいう在胎 12-14 日程度で出現する Pleuraperitoneal fold (以下 PPF) という構造物が一際注目されている (Merrell AJ, FEBS J, 2013, 280, 4026-4035)。最新の研究では、PPF は横隔膜の筋結合組織へと発達し、筋の増生をコントロールしていることから、横隔膜の発生に極めて重要であることが明らかになってきたのである (Merrell AJ, Nat Genet, 2015, 47, 496-504)。一方で、ナイトロフェン誘導モデルを代表とする動物モデルや、先天性横隔膜ヘルニアを発症した幾つかのノックアウトモデルでも、この PPF や筋結合組織の発生・形成異常が出現することが証明された (図 2) (Greer JJ, Respir Physiol Neurobiol, 2013, 189, 232-240)。

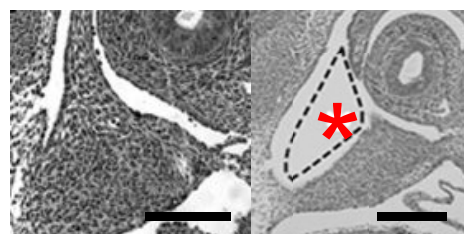


図 2
在胎 13 日のラット胎仔の PPF の構造; 左が正常、右が先天性横隔膜ヘルニアモデル (* が形成不全部位)
Scale bar=200 μm

現在最も注目を浴びている先天性横隔膜ヘルニア関連遺伝子の一つとして、Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 (Pbx1) という蛋白をコードする *Pbx1* がある。この蛋白は、レチノイン酸経路や、Wnt 経路、TGF 経路等の先天性横隔膜ヘルニアの発症に関わる重要な経路に複雑に関わっている可能性が指摘されており、最も有力な発症原因候補蛋白の一つと考えられている (Vitobello et al. Dev Cell, 2011, 20, 469-482)。さらに *Pbx1* ノックアウトモデルでは、ヒト先天性横隔膜ヘルニアに類似した横隔膜欠損を発症することも証明された (Selleri et al. Development, 2001, 128, 3543-3557)。Pbx1 は、Meis2、Runx1 という蛋白と結合して、ともに一連のシグナル経路の中で働く。そのシグナルの障害は、胎生早期での横隔膜の発達において重要な PPF の発生を阻害し、結果として横隔膜欠損が生じているという理論が提唱された (Russell et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109, 2978-2983)。



図 3
ナイトロフェン誘導ラットの横隔膜所見: 人間の先天性横隔膜ヘルニアと酷似した欠損を認める

2. 研究の目的

今回の研究では、ナイトロフェン誘導 - 先天性横隔膜ヘルニアラットモデルを作製し (図 3)、横隔膜の形成異常の原因遺伝子として最も可能性の高い *Pbx1*、*Meis2*、*Runx1* の発現およびその蛋白の組織内の発現、分布を調べることにより、横隔膜欠損の背景にあるメカニズムを明らかにし、さらにそこからヒトの先天性横隔膜ヘルニア発生の胎児期における予防医療の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 先天性横隔膜ヘルニアの動物モデルの構築と評価 実験動物の作製

Sprague-Dawley rats[®] (Harlan Laboratories, Sharnlow, UK) の受胎後、在胎 9 日に、1ml のオリーブ油に溶解した 100mg のナイトロフェン (2,4-dichloro-phenyl-p-nitrophenyl ether) (WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Germany) を投与する。コントロー

ル群のラットには、オリーブ油のみを投与。胎児期の横隔膜の形成に重要な3つのポイント、すなわち在胎13日（PPF形成）、在胎15日（PPFから横隔膜へ発達）、在胎18日（横隔膜筋肉成分の発達）のそれぞれにおいて、ラットを帝王切開し胎仔を取り出す（図4）。

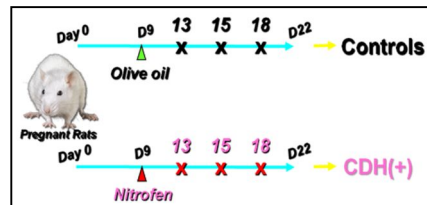


図4 Study designの概略シエーマ

横隔膜の形態の評価

それぞれの時期で取り出された胎仔の横隔膜を拡大顕微鏡で肉眼評価する。

HE染色を行い、横隔膜の組織学的形態評価を行う。

(2) 横隔膜ヘルニアを引き起こす標的蛋白の探索

RNA抽出とcDNAの作製

D13、D15の胎仔検体 →

パラフィンブロックの10 μ m切片からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (Arcturus XT[®]) で横隔膜成分だけ採取

↓ High Pure FFPE RNA Micro

D18の横隔膜検体 →

TRizol reagent →

Total RNA

↓

cDNA

→ qRT-PCR

qRT-PCR

LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 遺伝子特異的なPrimerを使用し、actinでNormalization

蛍光免疫染色による候補蛋白の発現と組織分布の評価

横隔膜のパラフィン切片 (D13、D15、D18) をそれぞれ候補蛋白Pbx1、Meis2、Runx1に対する抗体で蛍光免疫染色

DAPI (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) で比較染色

ZEISS LSM 700 Confocal Microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) を使用し複数の実験者で発現を評価

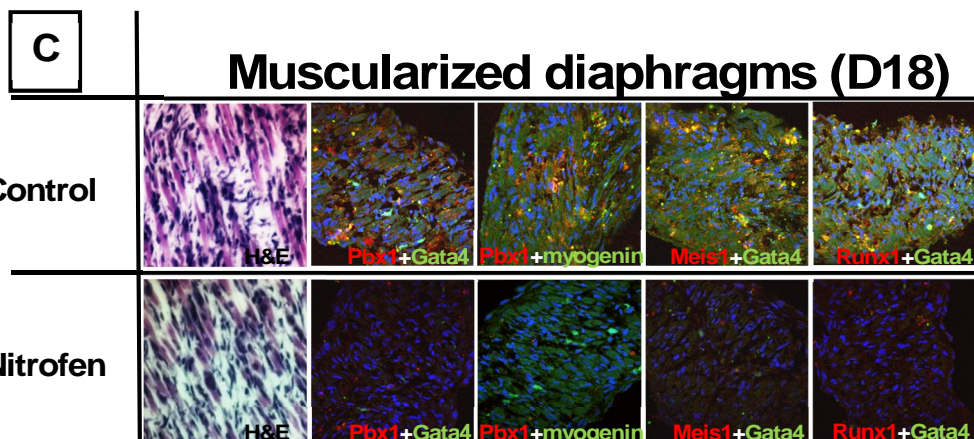
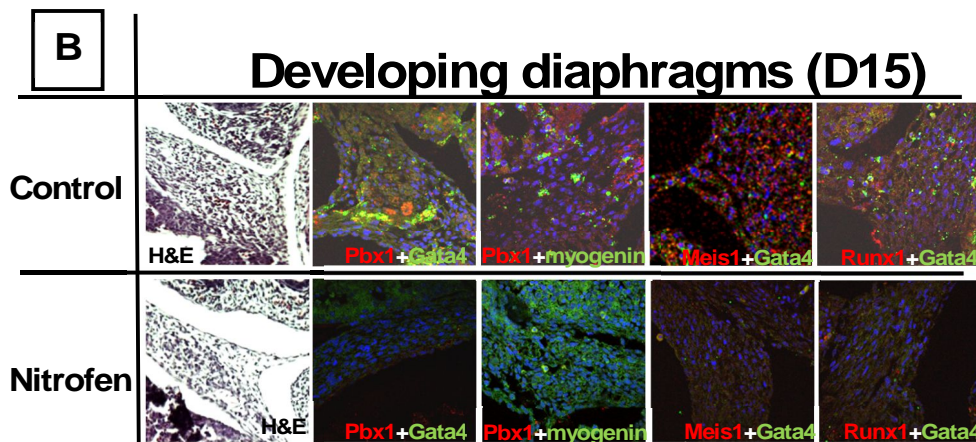
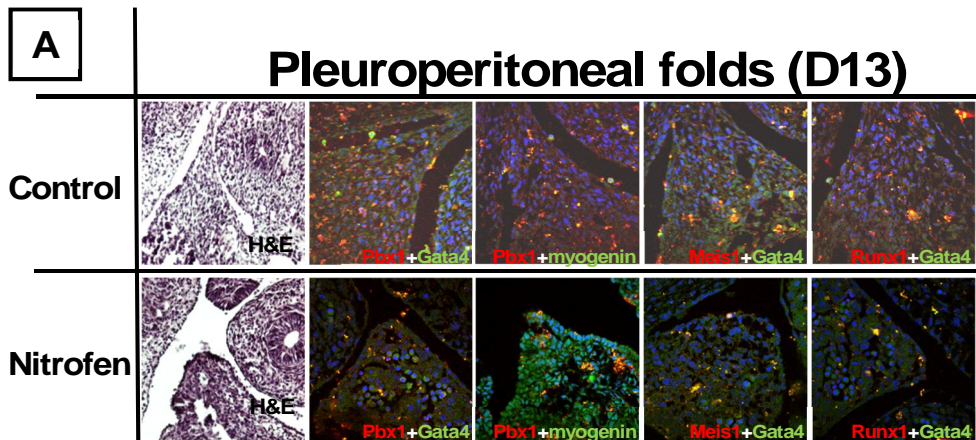
4. 研究成果

まず、先天性横隔膜ヘルニアの動物モデルの作製に成功した。そして、在胎13日（PPF形成）、在胎15日（PPFから横隔膜へ発達）、在胎18日（横隔膜筋肉成分の発達）のそれぞれにおいて横隔膜組織と肺組織を、疾患群、正常群ともに採取に成功した。Pbx1、Meis1、Runx1のそれぞれにおいて、relative mRNA expression levelsは、PPF、PPFから発達途上の横隔膜、横隔膜の筋肉成分において、疾患モデル群において有意に減少していることがわかった。また、肺組織のdeveloping lungs (D15)やfully differentiated lungs (D18) においても有意に減少していることがわかった。

組織学的検査では、まずコントロール群のPPFでは三角形の背側へ伸びる錐体部があり、疾患群ではその背側へ伸びる錐体部が欠失していることがわかった。

蛍光組織学的検査では、Pbx1、Meis1、Runx1はmesenchymal markerのGATA4や、myogenic factorのmyogeninと比較した結果、Pbx1、Meis1、Runx1のprotein expressionは、在胎13日（PPF形成）、在胎15日（PPFから横隔膜へ発達）、在胎18日（横隔膜筋肉成分の発達）のそれぞれにおいて横隔膜組織で横隔膜の発達に働いていることがわかった。また、肺組織のdeveloping lungs (D15)やfully differentiated lungs (D18) においても肺の発達に関与していることがわかった。そしてその発現は横隔膜、肺いずれにおいても、疾患群で正常群より有意に低下していることがわかった。以上より、Pbx1や、ともに一連のシグナル経路の中で働くMeis2、Runx1の肺や横隔膜組織での蛋白および遺伝子発現が、疾患モデル群において有意に減少していることが確認された。

結論として、先天性横隔膜ヘルニア関連遺伝子の1つとされるPbx1、Meis1、Runx1が、ともに一連のシグナル経路を構成して、原始横隔膜の形成に大きな働きを担い、その破綻が疾患における横隔膜欠損の背景にあるというメカニズムを明らかにした。この研究はヨーロッパで最も権威のある小児外科雑誌に掲載され、今後はさらにそこから胎児期における予防的投与薬剤の開発への重要な足がかりとなると確信している。



上記の Figure は、まずコントロール群の PPF では三角形の背側へ伸びる錐体部があり、疾患群ではその背側へ伸びる錐体部が欠失していることがわかる。また、Pbx1、またはそれと一連のシグナル経路で働くと言われている、Myeloid ecotropic integration site 1 (Meis1) や Runt-related transcription factor 1 (Runx1) などの横隔膜組織での蛋白の発現が、疾患モデル群の横隔膜の pleuroperitoneal folds (D13)、developing diaphragms (D15) そして fully muscularized diaphragms (D18) において、有意に減少しているという結果を示している。

Table Relative mRNA expression levels of Pbx1, Meis1 and Runx1 in pleuroperitoneal folds (D13), developing diaphragms and lungs (D15) and fully muscularized diaphragms and differentiated lungs (D18).

		<i>Pbx1</i>		<i>Meis1</i>	
		Control	Nitrofen	Control	Nitrofen
Diaphragms	D13	1.60 ± 0.66	0.93 ± 0.51*	0.47 ± 0.14	0.19 ± 0.08*
	D15	2.04 ± 0.79	1.31 ± 0.30*	0.37 ± 0.09	0.14 ± 0.14*
	D18	2.05 ± 1.28	1.04 ± 0.45*	0.44 ± 0.12	0.25 ± 0.06*
Lungs	D15	1.02 ± 0.29	0.71 ± 0.21*	1.80 ± 0.80	0.71 ± 0.11*
	D18	1.28 ± 0.51	0.65 ± 0.43*	1.62 ± 1.05	0.70 ± 0.14*

		<i>Runx1</i>	
		Control	Nitrofen
Diaphragms	D13	1.90 ± 1.19	1.03 ± 0.65*
	D15	1.84 ± 0.49	1.16 ± 0.51*
	D18	2.07 ± 0.60	0.92 ± 0.61*
Lungs	D15	-	-
	D18	-	-

* $p < 0.05$ vs Control.

上記の Table は、Pbx1、またはそれと一連のシグナル経路で働くと言われている、Myeloid ecotropic integration site 1 (Meis1)や Runt-related transcription factor 1(Runx1)などの肺や横隔膜組織での遺伝子発現が、疾患モデル群の横隔膜の pleuroperitoneal folds (D13)、developing diaphragms (D15)そして fully muscularized diaphragms(D18) や、肺組織の developing lungs (D15)や fully differentiated lungs (D18) において、有意に減少しているという結果を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Toshiaki, Friedmacher Florian, Zimmer Julia, Puri Prem	4. 巻 31
2. 論文標題 Pbx1, Meis1, and Runx1 Expression Is Decreased in the Diaphragmatic and Pulmonary Mesenchyme of Rats with Nitrofen-Induced Congenital Diaphragmatic Hernia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 120 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0040-1714736	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------