

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791300

研究課題名(和文) Gja1 ノックアウトマウスを用いた低形成肺発生機序の解明に関する分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular-biological study for clarifying the etiology of lung hypoplasia of Gja1 knockout mice

研究代表者

永田 公二(ナガタ コウジ)

九州大学・大学院医学研究院・小児外科学分野

研究者番号：204196568

研究成果の概要(和文):

Gja1(以下Cx43)ノックアウトマウスは、出生直後に肺低形成により死亡する。出生直後のCx43ノックアウト新生仔肺とコントロールの新生仔肺との比較検討の結果、ノックアウト群は病理組織学的に肺胞中隔の肥厚および末梢側肺胞腔の狭小化を認め、分泌腺様構造を呈していた。また、RT-PCRの結果、Cx43ノックアウトマウス群の新生仔肺では、Sp-C、AQP-5、 α -SMAのmRNA発現は非ノックアウト群と比較して低下しており、免疫染色に関しても、ノックアウトマウス群はコントロール群と比べSp-C、AQP-5、 α -SMA陽性細胞は少なかった。

研究成果の概要(英文):

Gja1 (Cx43) knockout mice die after birth due to hypoplastic lungs. Adult hetero Cx43 mice were mated. Newborn mice were divided into the wild group and the knockout group. H.E. staining in the knockout mice showed narrow airspaces and thicker interalveolar septae. The m-RNA expression of AQP-5, Sp-C and α -SMA was significantly lower in knockout mice than that in the wild mice. Immunohistochemical staining in all markers (AQP-5, Sp-C and α -SMA) showed the same result to the m-RNA expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児外科学

キーワード：小児呼吸器外科学、Gja1、connexin43、肺低形成、肺発達

1. 研究開始当初の背景

Connexin 43 (Cx 43) は、Gap junction を構成する膜貫通蛋白の一構成蛋白である。Cx 43 は細胞内のホメオスタシスの維持のみならず、近年の報告では、心や骨などの臓器の発達・成熟過程における形態形成や、細胞増殖・分化に関与しているとの報告がある。

Cx 43 ノックアウトマウスは、出生後数時間以内にチアノーゼを呈し死亡するが、現在 Cx43 と肺低形成発生に関する報告はない。今回の研究では、Cx 43 ノックアウトマウスの新生仔肺と正常新生仔肺群とを比較検討する事に重点を置く事とした。

2. 研究の目的

新たな肺低形成モデルである Cx43 ノックアウトマウスを用いて分子生物学的解析を行う事で、肺低形成発生機序に関する新たな知見を得る事が第一義的目的である。また、それに派生して、未だに不可解が多い低形成肺の発生機序に関する新たな知見を得る事が今回の研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 研究デザイン

成獣 Cx 43 ヘテロマウスを交配し、出生直後の新生仔マウスの尾を用いてタイピングし、ホモ、ノックアウトの2群に分けた。仔マウス肺を摘出し、右肺から mRNA を採取し、左肺は、4%パラホルムアルデヒドで固定した。Surfactant protein-C (Sp-C), aquaporin-5 (AQP-5), alpha-smooth muscle actin (-SMA) の mRNA 発現を RT-PCR にて検討するとともに、同マーカーについて免疫染色を行った。同時にヘマトキシリンエオジン(HE)染色も行った。

4. 研究成果

1) 正常新生仔と Cx43 ノックアウトマウス
まず、成獣の Cx43 ヘテロマウスを交配して得られた新生児仔の尾をタイピングして正常コントロール群と Cx43 ノックアウト群に分類する。出生直後に Cx43 ノックアウト群はチアノーゼを呈して死亡した。下図に示すように外観上は両群の仔に明らかな体格差や外表奇形は見当たらなかった。各々の肺を摘出すると、Cx43 ノックアウト群の肺では含気に乏しく肺の拡張がない事がわかる。



図1. 正常仔と Cx43 ノックアウト仔の比較

上図：外観 下図：摘出肺

2) H.E. 染色

HE 染色の結果、ノックアウトマウス肺では、他の2群と比較して、肺胞中隔の肥厚および末梢側肺胞腔の狭小化を認め、分泌腺様構造を呈していた。

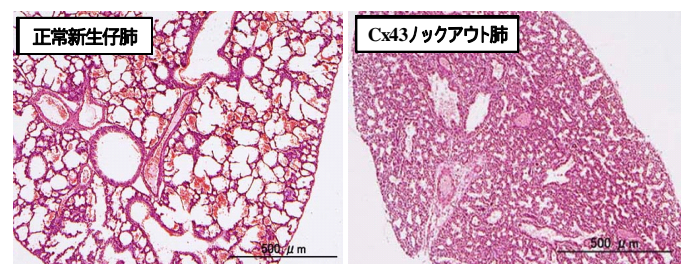


図2. H.E. 染色による比較

3) RT-PCR

RT-PCRの結果、Cx43 ノックアウト群における AQP-5, Sp-C, α -SMA の mRNA 発現はコントロール群と比較して低下していた。

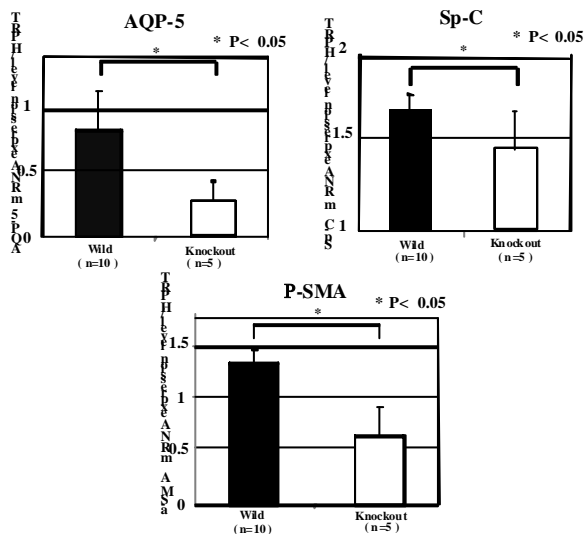


図 3 . RT-PCR による比較

4) 免疫染色

免疫染色に関しても、mRNA の結果と同様にノックアウトマウス群では正常コントロール群と比較して AQP-5, Sp-C, α -SMA 陽性細胞は少なかった。

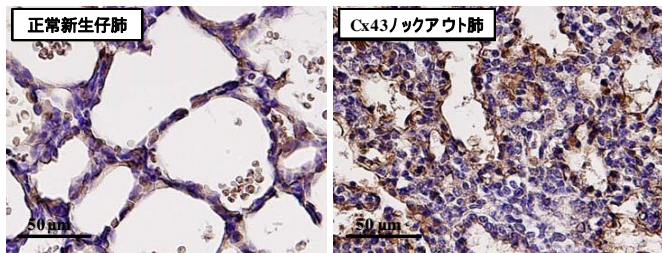


図 4 . 1 AQP-5 の免疫染色

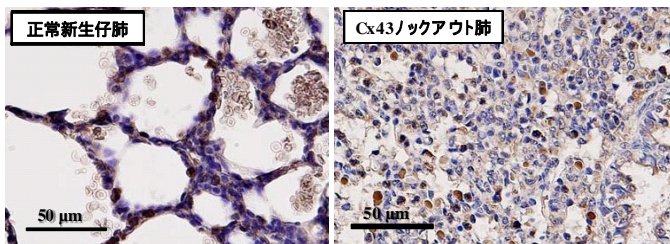


図 4 . 2 Sp-C の免疫染色

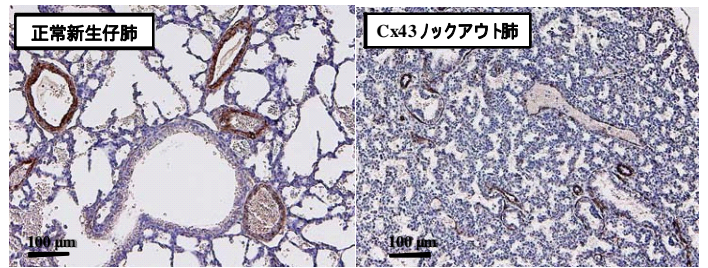


図 4 . 3 Sp-C の免疫染色

5) 考察

Cx43は、ギャップジャンクションを形成する蛋白の一つであり、細胞間のシグナル伝達やイオンチャネルの制御に関与していると言われていいる。また、発生過程においては、様々な臓器の発達にも重要な役割を果たしている。

胎生後期肺の肺胞上皮発達過程において、2型肺胞上皮細胞は1型肺胞上皮細胞に変化されると言われている。Cx43は2型肺胞上皮細胞が1型肺胞上皮細胞に分化する際に強発現するとの報告もあり、胎生後期の肺発達過程に何らかの役割を果たしている事が唆される。また、Cx37やCx40のトランスジェニックマウスは、血管奇形を呈すると言われており、コネクシンが血管内皮細胞の分化に関与しているとの報告もある。

われわれの実験でも1型肺胞上皮細胞のマーカーであるAQP-5や、2型肺胞上皮細胞のマーカーであるSp-C、血管平滑筋のマーカーである α -SMAはノックアウト群と比較して発現が低下していた。肺の病理組織学的所見でも、ノックアウト肺は、肺発生期の偽腺状期から管状期初期の構造を呈していた。即ち、2型肺胞上皮細胞や1型肺胞上皮細胞、気管・血管における平滑筋細胞の細胞分化が、Cx43ノ

ックアウトされる事により抑制され、正常コントロール群と比較して肺発達が遅延しているものと考えられた。

Cx 43ノックアウトマウスは新たな低形成肺モデルと考えられ、更なる解析を行う事で低形成肺治療に関する新たな知見が得られる可能性があるものと考えられた。

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)

[雑誌論文](計10件)

上杉達, 田尻達郎, 永田公二, 家入里志, 増本幸二, 田口智章. メッケル憩室を伴った新生児腸管部分拡張症の1例. 小児外科 40 巻 p721-4, 2008

増本幸二, 手柴理沙, 江角元史郎, 永田公二, 高畑靖, 原寿郎, 月森清己, 和氣徳夫, 田口智章. 横隔膜ヘルニアの治療ストラテジー低出生体重児に合併した先天性横隔膜ヘルニアの治療成績. 日本周産期・新生児医学会雑誌 44 巻 p1064-8, 2008

Masumoto K, Nagata K, Uesugi T, Yamada T, Kinjo T, Hikino S, Hara T, Taguchi T. Risk of respiratory syncytial virus in survivors with severe congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Int.* 50, p459-63, 2008

Masumoto K, Akiyoshi J, Nagata K, Uesugi T, Taguchi S, Tajiri T, Taguchi T. Chronological change in intramural components in severe proximally dilated jejunal atresia: an immunohistochemical study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 46, p602-6, 2008

Nagata K, Masumoto K, Tesiba R, Esumi G, Tsukimori K, Wake N, Taguchi T. Outcome and treatment in an antenatally diagnosed CCAM of the lung. *Pediatr Surg Int* 25, p753-7, 2009

永田公二, 増本幸二, 田尻達郎, 田口智章. 新生児腸間膜裂孔ヘルニアの1例. 日本小児外科学会雑誌 45, p1055-9, 2009

Kouji Nagata, Kouji Masumoto, Risa Tesiba, Genshirou Esumi, Keigo Yoshizaki, Satoshi Fukumoto, Kazuaki Nonaka and Tomoaki Taguchi. Cx43 play important roles in the lung development. *J Pediatr Surg* 44, p2296-2301, 2009.

永田公二, 江角元史郎, 手柴理沙, 木下義晶, 増本幸二, 高畑靖, 原寿郎, 田口智章. 当科にて経験した超低出生体重児の消化管穿孔 14 例に関する検討. 日本周産期新生児学会雑誌 45 巻, p1104 - 7, 2009

Esumi G, Masumoto K, Teshiba R, Nagata K, Taguchi Tomoaki, et al. Effect of insulin like growth factors on lung development in a nitrofen induced CDH model rat. *Pediatr Surg Int.* 27, p187-92, 2010

Teshiba R, Masumoto K, Esumi G, Nagata K, Tomoaki Taguchi, et al. Identification of TCTE3 as a gene responsible for congenital diaphragmatic hernia using a high-resolution single-nucleotide polymorphism array. *Pediatr Surg Int.* 27, p193-8, 2010

[学会発表](計16件)

永田公二, 江角元史郎, 手柴理沙, 増本幸二, 田口智章. 当科における出生前診断された先天性嚢胞性腺腫様奇形(CCAM)症例に関する検討. 第45回日本小児外科学会学術集会. 平成20年5月28日. 筑波

永田公二, 江角元史郎, 手柴理沙, 増本幸二, 田口智章. 出生前診断された先天性嚢胞性腺腫様奇形(CCAM)症例に関する検討. 第44回日本周産期新生児学会. 平成20年7月14日. 横浜

Kouji Nagata, Risa Tesiba, Genshirou Esumi, Kouji Masumoto and Tomoaki Taguchi. The postnatal outcome and timing of surgery for an antenatally diagnosed CCAM of the lung. 21th Congress of Asian Association of Pediatric Surgeons. 平成20年11月17日. Bangkok, Thai

永田公二, 江角元史郎, 手柴理沙, 増本幸二, 田口智章. 当科にて経験した超低出生体重児の消化管穿孔13例に関する検討. 第28回日本小児内視鏡外科手術手技研究会. 平成20年11月9日. 大阪

永田公二, 藤花菜, 増本幸二, 田口智章. 虫垂切除術時に偶発的に発見された回腸異所性胃粘膜の1例. 第452回小児科学会福岡地方会. 平成20年12月13日. 福岡

Kouji Nagata, Genshirou Esumi, Risa Teshiba, Kouji Masumoto, Keigo Yoshizaki, Satoshi Fukumoto, Kazuaki Nonaka and Tomoaki Taguchi. Cx43 plays important roles in lung development. 42nd Annual Meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2009年5月11日. Hong Kong

永田公二, 江角元史郎, 手柴理沙, 木下義晶, 増本幸二, 高畑靖, 原寿郎, 田口智章. 当科にて経験した超低出生体重児の消化管穿孔14例に関する検討. 第44回日本周産期新生児学会. 平成21年7月13日. 名古屋

永田公二, 江角元史郎, 手柴理沙, 木下義晶, 田口智章. 胸骨翻転術を施行した漏斗胸患者の長期成績に関する検討. 第39回九州小児外科研究会. 平成21年8月22日. 沖縄

永田公二, 江角元史郎, 手柴理沙, 木下義晶,

研究者番号：204196568

田口智章. 小児嚢胞性肺疾患に対する腋窩皺切開の検討. 第20回小児呼吸器外科研究会. 平成21年10月17日. 高崎

(2)研究分担者 なし

永田公二、江角元史郎、手柴理沙、木下義晶、増本幸二、田口智章、他. 当科における横隔膜ヘルニアの治療戦略. 第110回日本外科学会定期学術集会. 平成22年4月9日 名古屋

(3)連携研究者 なし

永田公二、江角元史郎、手柴理沙、木下義晶、増本幸二、田口智章、他. 難治性手術創に対する陰圧閉鎖療法の適応. 第24回小児ストーマ・排泄管理研究会. 平成22年4月24日. 埼玉

永田公二、江角元史郎、手柴理沙、木下義晶、増本幸二、田口智章. 両側横隔膜ヘルニアの1例. 第47回日本小児外科学会. 平成23年6月11日 名古屋

永田公二、江角元史郎、手柴理沙、増本幸二、田口智章. Hypoganglionosis 長期経過観察中に低P血症、低Mg血症を発症した1成人例. 第47回日本外科代謝栄養学会. 平成23年7月9日 横浜

永田公二、江角元史郎、手柴理沙、木下義晶、増本幸二、田口智章. 当科で経験した long gap 食道閉鎖症の長期経過に対する検討. 第46回周産期新生児学会. 平成23年7月13日 名古屋

Nagata K, Teshiba R, Masumoto K, Esumi G, Kinoshita Y, Tomoaki Taguchi. Review of 17 cases of extremely low birth weight infants associated with intestinal perforation. 23rd International Symposium on Pediatric Surgical Research. 平成23年9月14日 東京

Nagata K, Teshiba R, Masumoto K, Esumi G, Kinoshita Y, Tomoaki Taguchi. Axillary crease incision for pediatric thoracotomy. 3rd World Congress of Pediatric Surgery. 平成22年10月22日. New Delhi, India

〔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〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田 公二 (NAGATA KOUJI)
九州大学大学院医学研究院・
小児外科学分野・助教