

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月 31日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791732

研究課題名（和文） 先天性横隔膜ヘルニアにおけるインシュリン様成長因子を用いた新たな治療戦略

研究課題名（英文） New treatment strategy for congenital diaphragmatic hernia patients using Insulin-like growth factors

研究代表者

江角 元史郎（ESUMI GENSHIRO）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30452759

研究成果の概要（和文）：

本研究では、横隔膜ヘルニア（CDH）疾患モデルのラット胎仔を作成し、CDHモデルラット胎仔肺組織の組織培養を行い、培養環境中に添加された IGF-1 と IGF-2 により肺成熟が誘導されるかについて検討を行った。

妊娠 9 日目の母体ラットにニトロフェンを投与し、妊娠 18 日目に帝王切開にて胎仔摘出を行った。摘出した胎仔のうち、横隔膜ヘルニアを形成しているもののみを選別し、肺を摘出。肺の切片を、IGF-1 群、IGF-2 群、対照群の 3 群に分け、IGF-1 群は IGF-1 を添加した培養液、IGF-2 群は IGF-2 を添加した培養液、対照群は IGF を添加しない培養液を用いて 24 時間と 48 時間の組織培養を行った。培養後の組織に対し、2 型肺胞上皮細胞のマーカーとして TTF-1、1 型肺胞上皮細胞のマーカーとして T1、気管および血管平滑筋のマーカーとして SMA の mRNA の発現量の解析を行い、また、これら TTF-1、T1、SMA に対する免疫染色を併せて行った。mRNA 定量の結果、48 時間培養した IGF-2 群において、TTF-1、T1 の mRNA 量が対照群と比較して増加していた。また、48 時間培養した IGF-2 群の免疫染色像において、TTF-1 染色陽性の肺胞上皮細胞が立方型から扁平型に変化しているのが認められた。IGF-1 群と対照群の間には、このような差は認められなかった。

以上の結果により、ニトロフェン誘導性 CDH モデルラット胎仔の低形成肺の培養組織に対し、IGF-2 を投与することで肺胞の成熟が誘導される可能性があると考えられた。本研究により、CDH における肺低形成に対して IGF-2 の胎生期投与が有望であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Purpose

Both the mortality and morbidity associated with congenital diaphragmatic hernia (CDH) are mainly caused by pulmonary hypoplasia and persistent pulmonary hypertension. A previous study revealed that insulin-like growth factors (IGFs) play important roles in fetal lung development. The aim of this study was to investigate the effect of IGF-1 and IGF-2 on tissue cultures of fetal hypoplastic lungs obtained from nitrofen-induced CDH model rats.

Methods

Pregnant rats were exposed to nitrofen on day 9 of gestation (D9). Fetuses were harvested on D18 by caesarian section. Lung specimens of the CDH (+) fetus were divided into three groups; control, IGF-1, and IGF-2. The specimens from the control group were cultured in culture medium without IGFs. The IGF-1 group specimens were cultured with IGF-1 (500 ng/ml), and those in the IGF-2 group were cultured with IGF-2 (500 ng/ml). The mRNA expression of TTF-1, T1a and  $\alpha$ -SMA were analyzed in each group using real-time RT-PCR after 24 and 48 h of incubation. Immunohistochemical staining of these markers was also assessed for each of the cultured specimens.

Results

There was a significant increase in the expression of both TTF-1 and T1a mRNA in the IGF-2 group, in comparison to the control group after 48 h of culture. Immunohistochemical

staining revealed that the cell morphology was changed from cuboidal to squamous type in the IGF-2 group.

#### Conclusions

An increased mRNA expression of the markers related to type 1 and 2 alveolar epithelial cells, and morphological changes in the epithelial cells were observed in the IGF-2 group. The administration of IGF-2 to nitrofen-induced hypoplastic lungs might lead to alveolar maturation, which thus results in their improved development.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011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：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア、肺低形成、胎児治療

#### 1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア（CDH）は依然として新生児外科医にとって挑戦を伴う疾患である。最近の新生児治療の報告によると、治療の生存率が70%を超えている施設もあるが、その一方で、高度の肺低形成をともなう重症のCDH症例の死亡率は依然として高いままである。これら重症CDH症例の予後を改善するためには、低形成肺の成熟を誘導するような胎児期の治療が必要である。

肺の器官形成においては、様々な成長因子（ホルモン）が重要な役割を持っていると考えられている。それらの成長因子のなかでも、インスリン様成長因子（IGF）は胎児期において重要な役割をしているということが言われてきた。IGFは内分泌ホルモンとして身体形成に関わるとともに、自己分泌、あるいは傍分泌により細胞の増殖と分化に関わっていることが示されている。我々も、先の報告において、マウス胎児肺の培養組織に対するIGF-1とIGF-2それぞれの投与が、2型肺胞上皮細胞の数を増加させたことを報告した。IGFの生物学的な作用は、インスリン受容体、IGF-1受容体、IGF-2受容体といった特異的な受容体によって介されていることが知られているが、最近、これらの受容体の発現がニトロフェン誘導性CDHモデルラット胎仔の低形成肺において、3種類とも減少していることが報告された。これは、IGFが肺胞細胞の増殖と分化に関わっていることを示唆していると考えられた。これはIGF投与が重傷CDH症例の予後を改善する可能性が存在することを示唆していると考えられた。

#### 2. 研究の目的

今回我々は、妊娠後期のIGFの投与がCDHにおける低形成肺に及ぼす影響を確認することを目的とし、その前段階として、CDHモデル動物の低形成肺組織の培養環境中におけるIGF添加の影響を検証した。

#### 3. 研究の方法

CDHモデル動物（ラット）の作成、低形成肺組織の摘出、培養と培養後の組織に対する評価について記載する。

#### CDHモデルラットの作成と肺組織培養

妊娠9日目のラット母獣に対し100mgのニトロフェンを1mlのオリーブ油に溶解して胃内に投与。妊娠18日目に帝王切開により胎仔を摘出した。およそ半数の胎仔に横隔膜ヘルニアの形成を認めた。横隔膜ヘルニア形成のある胎仔を選別し肺を摘出。細切し組織片を作成した。組織切片をIGF-1群、IGF-2群、IGF非投与（Control）群に割り当て、次の組織培養を行った。

#### 組織培養

組織培養後の肺切片をFalcon社の細胞培養用の多孔式フィルターにのせた後、IGF-1群、IGF-2群、対照群に分けた。それぞれの培養液が入った培養容器へフィルターを浸し、対照（Control）群の培養液としてはDMEM/F-12培養液にペニシリン（100U/ml）とストレプトマイシン（100mg/ml）、L-アスコルビン酸（150µg/ml）を添加したものを使用し

た。IGF-1 群の培養液には組換え型 IGF-1 製剤 500ng/ml を追加し、IGF-2 群の培養液には組換え型 IGF-2 製剤 500ng/ml を追加した。それぞれについて 24 時間、48 時間の培養の後に、RT-PCR と免疫染色を併用した病理組織学的解析を行った。

#### RNA 精製とリアルタイム RT-PCR

実験中の発現タンパクの推定は RT-PCR 法を用いて行った。組織切片からの RNA 精製を行った後、逆転写処理を行い、realtime-PCR にて定量測定を行った。目的蛋白として、2 型肺胞上皮細胞のマーカである TTF-1、1 型肺胞上皮細胞のマーカであるポドプラニン (T1)、平滑筋組織のマーカである

SMA の mRNA について発現の解析を行った。mRNA の発現量は アクチンの mRNA の発現量で標準化した。

#### 免疫染色

培養後の肺組織は 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定した後、脱水して、パラフィンで包埋した。パラフィン切片 (5 $\mu$ m) を作成。キシレンにて脱パラフィン後、水和した。次に、3% $H_2O_2$  中でインキュベートし、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次にスライドグラスをクエン酸緩衝液中におき、マイクロウェーブにて 15 分間の加熱賦活化を行ったのち、10%ヤギ血清を 4 で 10 分作用させブロッキングを行った。今回の実験では、抗 TTF-1 抗体 (2 型肺胞上皮細胞)、抗 T1 抗体 (1 型肺胞上皮細胞)、抗 SMA 抗体 (平滑筋組織) を使用して免疫染色を行った。これら 1 次抗体で処理した切片をリン酸バッファで洗浄し、ビオチン化した 2 次抗体で処理。ペルオキシダーゼ標識のストレプトアビジンと反応させた後、DAB で発色させて観察を行った。

#### 統計解析

TTF-1、T1、SMA それぞれの mRNA 発現量について、各群間の差を Student-t 検定を用いて評価し、P 値が 0.05 以下である場合に有意差があると判定した。

#### 4. 研究成果

本実験の結果、RT-PCRでの発現レベルは48時間培養時点でのTTF-1とT1について、IGF-2群はControl群に比べて有意に増加していた (P=0.018、P=0.016)。同じ群にて SMA も増加傾向にあったが、有意差は認められなかった (P=0.06)。同じ48時間培養した組織では、IGF-2群とIGF-1群との比較でもIGF-2群におけるTTF-1とT1のmRNA発現の増加が認められた (P=0.018、P=0.008)。一方、IGF-1群とControl群のmRNA発現量に有意な差は認

められなかった。

また、病理組織学的解析では、それぞれの免疫染色の結果、2型を中心とした肺胞上皮細胞のマーカであるTTF-1は、24時間、48時間の培養組織の両方で各群間の染色性に差を認めなかった。またIGF-2群の48時間培養においてのみ、TTF-1染色陽性細胞の形態が立方上皮細胞から扁平上皮細胞に変化しているのが観察された。T1は末梢肺胞上皮の表面に発現しているのが染色されたが、各群間の差は認められなかった。SMAは主に気管と血管壁の筋層、肺胞隔壁を形成する間葉に分布していたが、今回の組織においては、各群の差は認められなかった。

以上の結果より、IGF-2のみが1型、2型両方の肺胞上皮細胞の標識蛋白のmRNAを増加させ、さらに、免疫組織学的染色像でのTTF-1染色陽性細胞の形態変化を誘導していると考えられた。2型肺胞上皮細胞は1型肺胞上皮細胞の前駆細胞であると考えられており、立方上皮から扁平上皮への形態変化はこの分化過程に必須な過程であるとされている。今回我々がIGF-2添加群で観察した形態変化、および、1型、2型両方の肺胞上皮細胞のマーカ-mRNAの増加は、肺胞上皮細胞の成熟過程に伴ったものであると推測できた。一方、IGF-1添加群ではそのような影響は認められなかった。

IGF-1およびIGF-2の生物学的特性は、インスリン受容体、IGF-1受容体、IGF-2受容体の3つの受容体を介して発現すると考えられている。IGF-1受容体はIGF-1、IGF-2の両方に強い親和性がある。一方で、IGF-2受容体は主としてIGF-2に強い親和性があり、IGF-1やインスリンとは最小限の親和性しかない。今回の実験の結果はIGF-2投与のみがCDH肺に変化をもたらしたと考えられたことから、観察された変化は、IGF-1受容体だけでなく、IGF-2受容体のシグナル伝達も介在して発現したものと考えられた。胎生18日目のCDHラット肺において、IGF-1受容体とIGF-2受容体はともに肺胞上皮と間葉に分布しているとの報告があることから、IGF-2を羊水中、もしくは気管内に投与することで肺成熟を誘導できる可能性がある。IGF-1受容体とIGF-2受容体はともに出生直前の正常ラット胎仔肺にも発現していることから、ラット胎仔に対するIGFの投与の効果は新生児期においても期待できると考えられた。

今回の研究によって、我々は胎生後期のニトロフェン誘導性の低形成肺に対し、IGF-2

の投与を行うことで肺成熟が促進される可能性を提示した。IGF、特にIGF-2の投与による胎児治療はCDHにともなう低形成肺の成熟を誘導する可能性があると考えられる。今後のin Vivoや大動物モデルにおいても同様の結果が得られるのであれば、胎生後期の高度肺低形成を伴う重症CDH胎児に対し、IGF-2を用いた胎児治療を行うことで、肺の成熟を促すことができる可能性があり、新しい治療戦略の候補の一つとして有力である。

研究者番号：

#### 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1件)

Esumi, G, Masumoto, K. Teshiba, R et al.  
Effect of insulin-like growth factors on lung development in a nitrofen-induced CDH rat model  
Pediatric Surgery International, 27  
(2), pp. 187-192. 2011.  
DOI: 10.1007/s00383-010-2791-2

[学会発表](計1件)

Esumi, G, Masumoto, K. Teshiba, R et al.  
Effect of Insulin-like growth factors on lung development in a nitrofen-induced CDH model rat  
第22回福岡国際母子総合研究シンポジウム  
平成23年9月3日 福岡

[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]

特記事項なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

江角 元史郎 (ESUMI GENSHIRO)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：30452759

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )