

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 06 月 04 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659536

研究課題名（和文）新生児呼吸窮迫症候群における肺胞上皮 Akt シグナルの病態生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Role of lung epithelial Akt signaling in respiratory distress syndrome

研究代表者

塩島 一郎 (SHIOJIMA ICHIRO)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90376377

研究成果の概要（和文）：Akt はインスリンによって活性化される蛋白リン酸化酵素であり、細胞増殖や糖代謝など多彩な生物学的作用を有することが知られている。肺胞上皮細胞特異的に Akt を活性化すると、帝王切開により早期娩出した胎児において肺胞における毛細血管密度の減少と VEGF、HIF-2 の発現量低下がみられ、新生児呼吸窮迫症候群ときわめて類似した表現型を呈することが明らかになった。また、ラパマイシン投与により、VEGF、HIF-2 の発現量が増加し RDS の病態が改善された。以上の結果から、胎児期における過剰な Akt シグナルが、mTOR 依存性に VEGF の発現を抑制することにより、RDS の病態形成に関与するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Akt is a serine/threonine protein kinase that is activated by insulin and regulates multiple cellular processes including cell growth and glucose metabolism. Overexpression of Akt in lung epithelium resulted in reduced capillary density and downregulation of HIF-2 and VEGF, leading to RDS in preterm infants born by Caesarean section. Treatment with rapamycin restored the expression of VEGF and HIF-2 and improved the lung pathology of transgenic mice. These results suggest that aberrant activation of Akt/mTOR pathway in the lung epithelium plays a critical role in the pathogenesis of RDS.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：未熟児医学 シグナル伝達 発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病合併妊娠では周産期のリスクが高く、さまざまな合併症が増加することが知られており、これらは母体の高血糖に対する反応性の胎児高インスリン血症によって生じると考えられている。新生児呼吸窮迫症候群 (respiratory distress syndrome (RDS)) はこれらの周産期合併症のなかでも死亡率が高く、臨床的にもきわめて重要な疾患である。RDS は肺胞上皮細胞からのサーファクタント

産生低下によって生じるとされており、人工サーファクタントの投与により治療されているが、依然として未熟児の死亡原因の大きな部分を占めており、RDS 発症機構の解明と治療法の開発が望まれている。

RDS についてはこれまで肺サーファクタントの欠損がその本態と考えられており、現在も主に人工サーファクタントによって治療がなされている。また、糖尿病合併妊娠での RDS 発症における胎児側の高インスリン血症については、その病態への関与が示唆されて

はいるものの、直接的な証拠には乏しい。その理由の1つとしてRDSの適切な動物モデルがなかったということがあげられる。

近年、遺伝子改変マウスなどの発生日工的手法が広く応用されるようになり、シグナル伝達系と実際の病態を関連づけた疾患モデルマウスの解析が可能になってきた。我々はこれまで組織特異的Aktトランスジェニックマウスを用いて、心臓・血管・膵臓等におけるAktシグナルの役割について検討してきた。肺胞上皮におけるAktシグナルの役割を検討するために肺胞上皮特異的発現誘導型Aktトランスジェニックマウスを作成したところ、RDSにきわめて類似した表現型を示すことが明らかになり、このマウスはRDSの病態生理を解析するうえで非常に有用な新規動物モデルであると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺胞上皮特異的発現誘導型Aktトランスジェニック (LE-Akt TG) マウスをRDSの疾患モデルマウスとして使用し、RDSの病態生理におけるAktシグナルの役割を明らかにすることをその目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) LE-Akt TG マウスの表現型解析

我々は肺胞上皮におけるAktシグナルの病態生理学的意義を明らかにするために、2型肺胞上皮細胞特異的なプロモーターであるsurfactant protein C (SP-C)プロモーターを用いてrtTA TGマウスを作成し、これをTet-myrAkt TGマウスと交配して得られたダブルTGマウスにドキシサイクリンを投与することにより、肺胞上皮特異的にAktが過剰発現するマウスを得た(図1)。

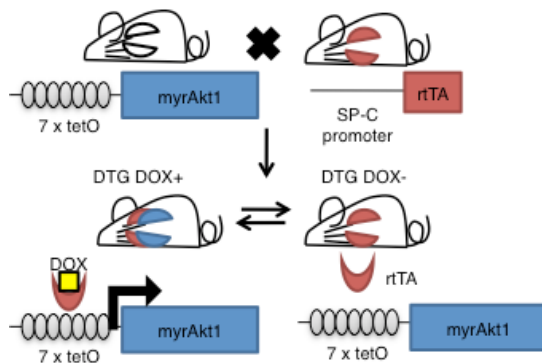


図1 肺胞上皮特異的誘導型Akt TGマウス

予備的検討により、肺胞上皮特異的誘導型Aktトランスジェニック (LE-Akt TG)マウスでは、E18.5で帝王切開により出産した新生児

はチアノーゼを呈し、全例2時間以内に死亡した。肺のHE染色では肺胞含気不良・上皮細胞の増生・肺胞内への液体の漏出などがみられ、新生児呼吸窮迫症候群(RDS)にきわめて類似した表現型を呈することが明らかになった(図2)。

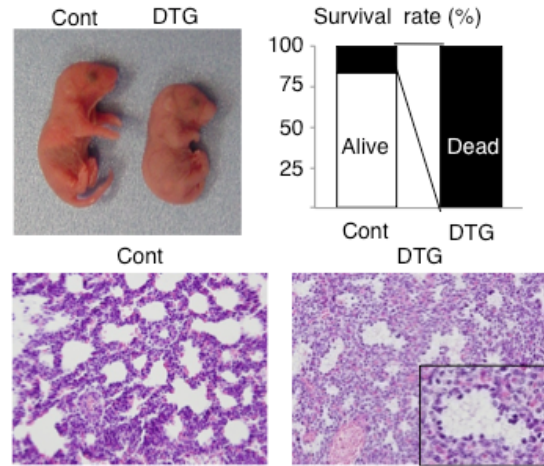


図2 LE-Akt TGマウスにおけるRDS

そこでさらにこの表現型を詳細に検討するために、以下のような解析を行った。

- ①: PAS染色により肺胞上皮細胞におけるサーファクタント産生を評価した
- ②: Toluidine Blue染色により、肺胞の空気含有量・肺胞壁厚について評価した
- ③: CC-10, SP-C, AQP5で染色を行い、肺胞上皮の分化度・成熟度につき評価した
- ④: インスリン受容体下流のシグナルにつき、Western blotにより解析した

### (2) LE-Akt TG マウス肺における血管新生の解析

VEGFは強力な血管新生促進因子であり、さまざまな臓器・組織における血管新生を制御している。またVEGFは肺胞上皮の成熟を促進する因子としても知られており、肺胞上皮および間質でその発現が認められる。さらに、VEGFを誘導することが知られているhypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ )のノックアウトマウスでは、肺におけるVEGFの発現が著明に低下し、RDSと類似した表現型を呈することが報告されている。これらの知見は、肺におけるVEGFの主たる制御因子はHIF-2であり、また、肺胞における血管新生がRDSの表現型に関連している可能性を示唆するものである。そこでLE-Akt TGマウスにおいて血管新生の変化を検討した。

- ①: isolectin-B4により血管内皮を染色し、血管密度を評価した

②: VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量を Western blot・免疫染色により評価した

③: 培養肺上皮細胞を用いて、インスリンが VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量に及ぼす影響を検討した

(3) LE-Akt TG マウスの RDS 発症における mTOR の役割の解析

Akt 下流のシグナル伝達系は複数存在するが、なかでも Akt-mTOR 経路は血管新生など重要な細胞反応を制御することが知られている。そこで Akt-mTOR 経路が Akt 過剰発現による RDS 発症に関与しているかを明らかにするために、以下の検討を行った。

①: LE-Akt TG マウスにおいて mTOR を阻害し、RDS の表現型に対する影響を検討した

②: 培養肺上皮細胞を用いて、インスリンの VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量に対する影響が mTOR を阻害することによりどのように変化するか検討した

#### 4. 研究成果

(1) LE-Akt TG マウスの表現型解析

①: PAS 染色では LE-Akt TG マウスにおいて多数の PAS 陽性グリコーゲンがみられた。通常成熟した肺胞上皮細胞ではグリコーゲンはサーファクタントに変換されることから、肺胞上皮細胞の成熟障害が存在するものと考えられた。

②: Toluidine Blue 染色では LE-Akt TG マウスにおいて肺胞の空気含有量低下と肺胞壁厚の菲薄化障害がみられ、RDS に特徴的な所見と考えられた。

③: CC-10, SP-C, AQP5 で染色したところ、LE-Akt TG マウスにおいて CC-10/SP-C 二重陽性の肺胞上皮幹細胞が増加し、I 型肺胞上皮細胞のマーカーである AQP5 の発現が減少していた。肺胞上皮幹細胞は II 型肺胞上皮細胞とクララ細胞に分化し、前者がさらに I 型肺胞上皮細胞に分化することが知られており、以上の結果は LE-Akt TG マウスにおいて肺胞上皮細胞の分化障害が見られることを示唆するものと考えられた。

④: インスリン受容体下流のシグナルにつき、Western blot により解析したところ、LE-Akt TG マウスにおいて Akt シグナルの活性化に伴い mTOR も活性化していることが明らかになった。

(2) LE-Akt TG マウス肺における血管新生の解析

①: isolectin-B4 染色により血管密度を評価

したところ、LE-Akt TG マウスにおいては、肺胞内の毛細血管密度が減少していること

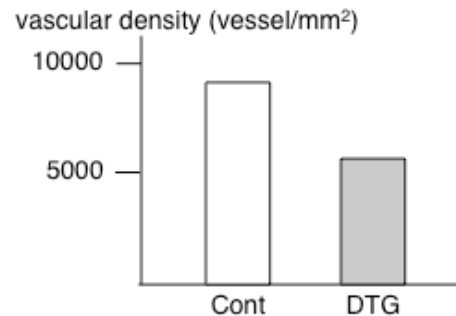
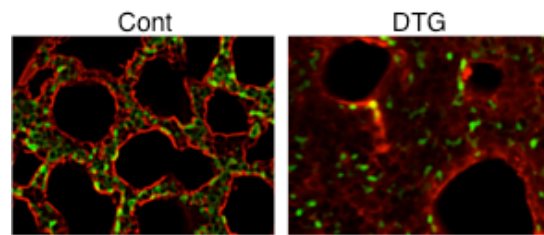


図3 肺胞毛細血管密度

が明らかになった (図3)。

②: また、Western blot・免疫染色により VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量を評価したところ、LE-Akt TG マウスにおいて VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量が低下していることが示された。

③: 培養肺上皮細胞を用いて、インスリンが VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量に及ぼす影響を in vitro で検討したところ、インスリンにより VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量が低下し、また、HIF-2 $\alpha$  の転写活性も減弱していることが明らかになった。

(3) LE-Akt TG マウスの RDS 発症における mTOR の役割の解析

①: LE-Akt TG マウスにおいてラパマイシンを投与して mTOR を阻害したところ、RDS の表現型は著明に改善した。また、VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量が回復し、肺胞の毛細血管密度の減少も改善された。

②: 培養肺上皮細胞においても、ラパマイシン処理により、インスリンによって生じた VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量低下は改善し、HIF-2 $\alpha$  転写活性の減弱も回復した。

(4) 研究結果のまとめ

肺胞上皮細胞特異的に Akt を活性化すると、肺胞における毛細血管密度の減少と VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量低下がみられ、新生児呼吸窮迫症候群ときわめて類似した表現型を呈することが明らかになった。また、ラパマイシン投与により、VEGF, HIF-2 $\alpha$  の発現量が増加し RDS の病態が改善された。以上の結果から、胎児期における過剰な Akt シグナルが、

mTOR 依存性に VEGF の発現を抑制することにより、RDS の病態形成に関与するものと考えられた。

#### (5) 考察

新生児呼吸窮迫症候群 (RDS) は糖尿病合併妊娠における周産期合併症のなかでも死亡率が高く、臨床的にもきわめて重要な疾患である。今回の研究から、肺胞上皮細胞における過剰なインスリンシグナルが Akt-mTOR 経路を活性化することにより RDS の病態形成に関与している可能性が強く示唆された。RDS は肺胞上皮細胞からのサーファクタント産生低下によって生じるとされており、人工サーファクタントの投与により治療されているが、依然として未熟児の死亡原因の大きな部分を占めている。今回の結果は、ラパマイシンのような mTOR 阻害薬が RDS の治療に有効である可能性を示唆するものであり、今後 RDS の新規治療法開発へとつながることが期待される。

#### 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)

①池田弘之、塩島一郎、五十嵐隆、小室一成：  
「マウス胎児肺上皮細胞でのAkt - mTORシグナルの過剰発現は微小血管構造異常をきたし新生児呼吸窮迫症候群を呈する」  
(日本小児循環器学会：2012年07月05日：  
国立京都国際会館)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

塩島 一郎 (SHIOJIMA ICHIRO)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90376377