

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591613

研究課題名(和文)後障害なき生存を目指して～新生児期肺障害モデルにおける肺泡微小循環系の再生の試み

研究課題名(英文) Morphological characterization of the mechanism for pulmonary microvascular disease in bronchopulmonary dysplasia caused by hyperoxia in newborn mice

研究代表者

中西 秀彦 (Nakanishi, Hidehiko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70528207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高濃度酸素投与による発達期肺泡微小循環障害の解明のため、電子顕微鏡を用いた超微形態解析を行った。その結果、高濃度酸素肺障害モデルでは血管内皮細胞(EC)層を中心に血液空気関門(BAB)が著明に肥厚していた。またEC細胞質成分の不均一な肥厚により毛細血管腔は虚脱していた。回復群では、BABの肥厚は改善したが、EC形態は依然不均一であり毛細血管腔は虚脱していた。BABの肥厚は、低酸素血症および高炭酸ガス血症を引き起こし、肺血管の異常収縮を来す可能性がある。また毛細血管の虚脱は、本来抵抗血管ではない肺泡微小血管レベルで循環障害を来す可能性があり、これら変化は、二次性肺高血圧発症の一要因と推察される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the morphological characterization of the mechanisms for pulmonary vascular disease secondary to bronchopulmonary dysplasia (BPD), we studied the ultrastructural changes of the pulmonary microvasculature (PV) by using newborn mice lungs exposed to 14 days' hyperoxia and subsequent seven days of normal air replacement conditions. The ultrastructure of PV in the hyperoxia-exposed lung had the characteristics of collapsed capillary lumen due to abnormal morphology of endothelial cells (ECs) with heterogeneously thick cytoplasm, and thick blood-air barriers (BABs), compared to air-control. Moreover, those abnormal ultrastructural changes of ECs persisted even after seven days of room air replacement conditions. These results indicate that the circulatory collapse at the alveolar capillary level might cause high vascular resistance, and that thick BABs might worsen hypoxemia and hypercapnia, the both of which finally can be the cause of secondary pulmonary hypertension in BPD.

研究分野：胎児新生児

キーワード：慢性肺疾患 早産児 肺泡微小血管 血液空気関門 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児医療の進歩により超早産児の予後は大きく改善したが、新たな問題となる合併症として慢性肺疾患 (chronic lung disease; CLD) が挙げられる。本症では、早産により発達途上の未熟な肺胞や肺胞微小循環系が障害を受け、児に長期にわたる人工呼吸管理や栄養障害を引き起こしその後の神経発達にも悪影響を及ぼす。よって CLD の発症、重症化予防、再生治療の確立は、早産児の後障害なき救命のために最重要課題である。CLD 発症のメカニズムはいまだ解明されていないことが多く、とくに血液空気関門の形態変化など微細構造については、詳細な検討がされておらず、障害をうけた肺胞微小循環系がどのように変化し、またその後どのように血液空気関門を再生させるかなどの疑問を解明するにあたり、それらを構成する肺胞上皮、基底膜、内皮細胞の形態的变化を検証することは、肺胞微小血管再生医療や、CLD 予防治療法の開発につながるうえでの基礎的な知識となると考えられる。

(2) 申請者はこれまでに、新生児マウス高濃度酸素肺障害モデルを用いて、CLD における Transforming factor beta (TGF- $\beta$ ) の関与について研究を行った。その結果、高濃度酸素投与肺障害モデルでは TGF- $\beta$  シグナルの増加に伴い、肺胞発達障害、肺胞壁 elastin 沈着パターンの異常、肺胞毛細血管細胞マーカーの染色パターンの異常、体重増加不良を認めた。一方、TGF- $\beta$  中和抗体投与群では、TGF- $\beta$  シグナルの増加が抑制されるのに伴い、上記構造異常および肺毛細血管細胞マーカーの染色パターンの改善、体重増加の改善を確認し CLD に関わる TGF- $\beta$  シグナルの直接的関与を証明した {Nakanishi, 2007 #679}。しかし、この研究では CLD に関わる様々な因子の経路を証明したにすぎない。また肺胞発達に重要な肺胞微小循環系の評価が、免疫組織染色による染色パターンの変化を観察したのみで、実際に微小循環系のどの細胞が障害を受け、細胞内小器官を含めた微細構造や、血管を構築する細胞間のネットワークがどのように変化を受けたのか不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 新生児マウス高濃度酸素肺障害モデルおよび高濃度酸素離脱後にルームエア下に暴露した回復モデルを作成し、肺胞構造および肺胞微小循環系がどのように障害を受け、どのように回復していくのか、各種細胞マーカーを用いた多重免疫染色や分子生物学的手法による関連遺伝子、たんぱく質の発現を評価するのみならず、電子顕微鏡を用いて肺胞微小血管を中心に超微形態解析を行い、細胞レベルでの形態学的評価を行う。

(2) 最終ゴールとして CLD における肺胞微小循環系の障害過程および再生過程を解明すること、その障害および再生に関わるシ

グナルを探求し、そのシグナル修飾戦略を CLD の予防や血管再生治療へと応用していくことにある。

## 3. 研究の方法

(1) 動物実験モデルの作成： ICR マウスを生直後より 85% 酸素 ( $O_2$ ) もしくはルームエア (Air) 下に 14 日間暴露させた後、回復期として Air 下に 7 日間飼育した。Air 群 (Air-14d, 21d)、高濃度酸素 14 日群 ( $O_2$ -14d)、高濃度酸素回復群 ( $O_2$ -Air-21d) の 4 群の肺組織を用いて検討した。

(2) 組織切片作成： 新生児 ICR マウスを麻酔下に気管に挿入したポリエチレンチューブから 4% パラホルムアルデヒドもしくは 2.5% グルタルアルデヒド + 2.0% パラホルムアルデヒドを注入し、20cmH<sub>2</sub>O の圧で 30 分間肺を拡張させた後、同液を用いて 4、overnight で肺組織を固定した。前者はパラフィン切片、凍結切片に、後者は樹脂包埋切片に使用した。固定肺は、その後の免疫組織染色、組織学肺胞発達評価、電子顕微鏡を用いた微細構造の評価に使用した。

(3) 肺胞構造の評価： 各群の肺組織切片から均等に肺野のサンプリングを行い、これまでも報告されているパラメーターである Mean linear intersept (Lm)、% Air volume density (%AVD)、secondary septal density を用いて、客観的に肺胞発達の評価を行い {Nakanishi, 2007 #679}、各群におけるこれら変化を統計学的に解析した。

(4) 蛍光免疫染色： 血管内皮細胞 (CD31)、肺胞上皮細胞 (Pro-SPC) のマーカーを用いて蛍光免疫染色を施行した。

### (5) 肺胞微小血管の評価

% fluorescent Volume Density (%FVD) CD31 蛍光免疫染色結果を撮像し、その画像上の免疫染色陽性のピクセル数を画像全体のピクセル数で除した値を %FVD として、各群で比較した。

### 電子顕微鏡を用いた超微形態評価

各群の肺胞毛細血管における血液空気関門全体の厚さ、血管内皮細胞層が占める厚さを計測した。また血管内皮細胞の細胞質成分の厚さを異なる 5 か所で計測し、その平均値および標準偏差 (SD) を計測した。SD 低値は細胞質成分が均一な血管内皮細胞であることを示唆し、SD 高値は不均一な形態を有する血管内皮細胞であることを示唆する。これらパラメーターを各群で比較した。

### (6) 肺高血圧の評価

右室心筋重量/左室心筋および心室中隔重量比 (RV/(LV+IVS))： 右心系負荷を示唆する指標として多くの研究で使用されており、肺胞微小循環系異常の指標となり得る。そこで各群における肺組織を固定後、心臓を剥離し、RV/(LV+IVS) を微量計量器で計測し各群で比較した。

呼吸細気管支、終末気管支レベルでの肺動脈中膜の計測： 直径 20-100  $\mu$ m の肺動脈の中

膜を計測し、肺動脈径(ED)で除した  $MT\% = (MT \times 2 \times 100) / ED$  を計測し、各群で比較した。  
 (7) 肺胞型上皮細胞の評価  
 抗 Pro-SPC 抗体を用いて蛍光免疫染色を施行後、各群における免疫染色陽性細胞を計測し、比較検討した。  
 (8) 統計学的解析  
 一元配置分散分析により各群の比較を行い、有意な場合には、Post hoc テストとして Tukey's HSD テストを用いた。  $p < 0.05$  を有意とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高濃度酸素投与により、新生仔マウスの肺胞発達には障害を受け、その障害は長期にわたり遷延する：

図1に示すように、14日間の高濃度酸素に暴露された新生仔マウスの末梢肺野(O2-14d)では、エアコントロール(Air-14d、-21d)と比較して、換気スペースの増大、肺胞中隔数の減少を認めた。また酸素暴露後ルームエアに7日間留置した回復群(O2-Air-21d)においても、構造の改善は認めなかった。図2に示すように、これら肺胞構造の変化は、Lm、%AVD、secondary septal densityの3つのパラメータで定量化した。

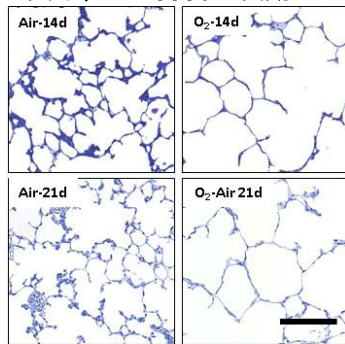


図1: 各群における末梢肺野における肺胞構造  
Scale bar: 100 μm

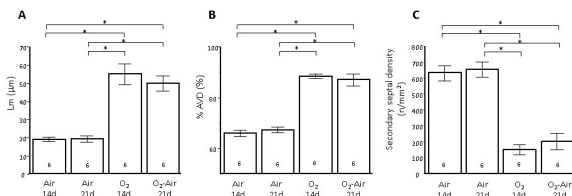


図2: 各群における肺胞構造の定量パラメータの比較  
A: Lm (μm) B: %AVD (%) C: Secondary septal density (n/mm²)  
\* $P < 0.05$

##### (2) 高濃度酸素投与により傷害を受けた新生仔マウスの肺胞微小循環は、長期にわたり遷延する：

図3Aに示すように、O2-14d群の肺胞におけるCD31免疫活性は、Air-14d、Air-21dと比較して減少していた。またO2-Air-21dにおいても、免疫活性の低下は遷延し、大きな改善は認めなかった。これら結果は、図3Bで定量化した。

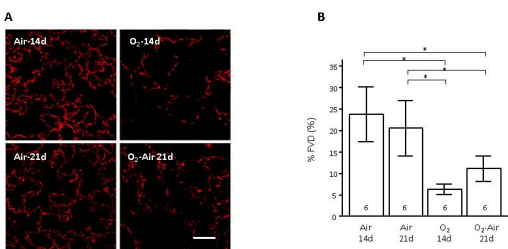


図3: 各群におけるCD31蛍光免疫染色パターン( A )とその定量化(%FVD) ( B )  
Scale bar: 75 μm  
\* $P < 0.05$

図4に示すように、電子顕微鏡を用いて超微形態評価を行った結果、上皮細胞層、基底膜、血管内皮細胞層の3層から成る血液空気関門は、O2-14d群ではエアコントロール群と比較して著明に肥厚しており、特に血管内皮細胞層の肥厚が顕著であった。またO2-14d群の血管内皮細胞の細胞質成分は不均一に肥厚しており、それにより肺胞毛細血管の内腔は狭小化していた。一方、O2-Air-21d群では、O2-14d群と比較して、血液空気関門の肥厚は改善していたが、血管内皮細胞層の肥厚は遷延しており、かつ細胞質成分は引き続き不均一で、内皮細胞の異常形態は遷延しており毛細血管の内腔は狭小化していた。これら結果は図5に示すように定量化した。

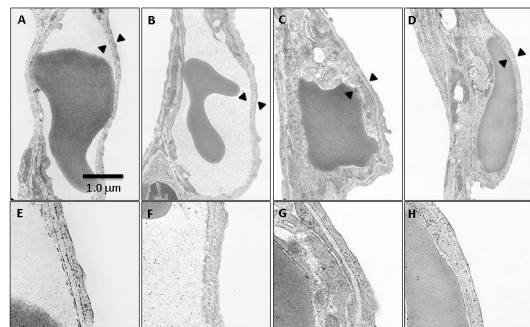


図4: 各群における肺胞毛細血管(A-D)および血液空気関門(E-H)の超微形態の比較  
A, E: Air-14d. B, F: Air-21d. C, G: O2-14d. D, H: O2-Air-21d  
矢印(▼)血液空気関門

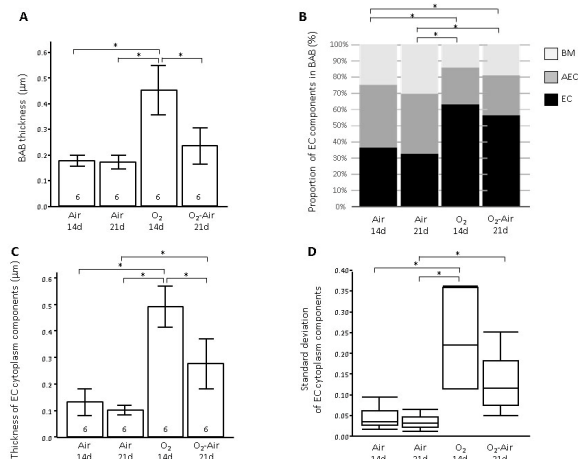


図5: 各群における血液空気関門(BAB)、血管内皮細胞(EC)の超微形態変化の定量化  
A: 各群におけるBABの厚さ(mm)  
B: 各群のBABにおける、内皮細胞(EC)、上皮細胞(AEC)、基底膜(BM)が占める割合(%)  
C: 各群におけるEC細胞質成分の厚さの比較(mm)  
D: 各群におけるEC細胞質成分の厚さのSDの比較  
\* $P < 0.05$

##### (3) 高濃度酸素投与により新生仔マウスの肺動脈(20 - 100 μm 径)の中膜は肥厚し、長期にわたり遷延する：

図6に示すようにO2-14d群における%MTは、エアコントロール群と比較して増加していた。一方、O2-Air-21d群では、部分的に肥厚は改善するものの中膜肥厚は遷延していた。

右室心筋重量/左室心筋および心室中隔重量比 (RV/(LV+IVS))は、4 群間で差は認めなかった。

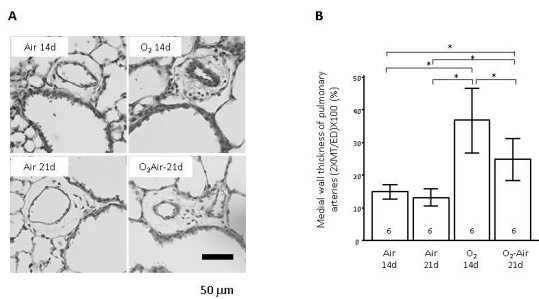


図6: 各群における肺動脈(20-100 μm径)の中膜組織像 (A) と%MT (B)  
Scale bar: 50 μm  
\**P* < 0.05

#### (4) 高濃度酸素投与により新生仔マウス肺胞壁におけるⅡ型上皮細胞数は減少する:

図7に示すように、肺胞Ⅱ型上皮細胞を認識する抗Pro-SPC抗体を用いて蛍光免疫染色をした結果、O<sub>2</sub>-14d群ではコントロール群と比較して、陽性細胞数の減少を認めた。一方、O<sub>2</sub>-Air-21d群では、陽性細胞数の上昇を認めた。

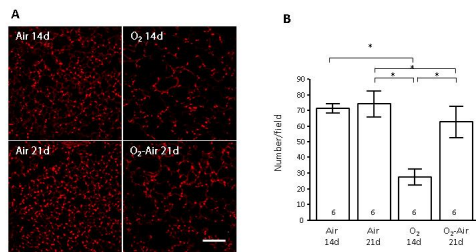


図7: 各群におけるPro-SPC免疫染色結果(A)と一視野あたりのPro-SPC陽性細胞数(n/field)(B)  
Scale bar: 75 μm  
\**P* < 0.05

図8に示すように、電子顕微鏡による肺胞Ⅱ型上皮細胞の超微形態評価では、O<sub>2</sub>-14d群のラメラ体数がコントロールと比較して減少していた。一方、O<sub>2</sub>-Air-21d群では、その数は増加していた。

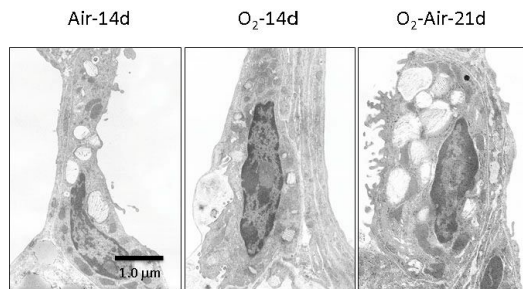


図8: 各群における肺胞Ⅱ型上皮細胞の超微形態の比較  
Scale bar: 1.0 μm

#### (5) Angiopoietin-1 (Ang-1) 投与は肺胞微小血管障害を改善する可能性がある:

高濃度酸素投与回復期の新生仔マウスに Ang-1 (2μg/0.2ml) を腹腔内投与し、以下の予備的な実験結果を得た。

肺組織のマイクロアレイ解析では高濃度酸素投与群で Ang-1 の遺伝子発現は低下していた。

Ang-1 投与群では、非投与群と比較して肺胞構造の部分的な改善を認めた(図9)。

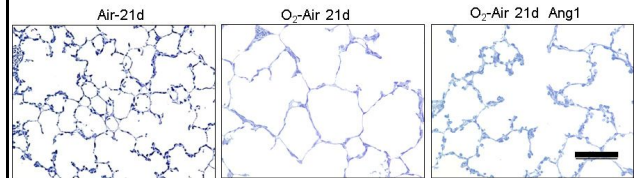


図9: 高濃度酸素肺障害モデルにおける肺胞構造異常に対するAng-1の改善効果  
Scale bar: 75 μm

#### (6) 考察

本研究のように、肺胞微小循環系の超微形態評価を行った報告は数少ない。血液空気関門の肥厚は、低酸素血症や高炭酸ガス血症を引き起こし、肺血管収縮を来すと考えられる。また血管内皮細胞の形態異常は、毛細血管腔の虚脱をもたらし、本来抵抗血管ではない毛細血管レベルで循環障害をもたらす可能性がある。本研究は、CLDに続発する肺高血圧症の発症機序に、これら超微形態変化が関与している可能性を示唆する初めての報告である。

予備実験結果より、Ang-1は肺胞構造異常を改善させたことから、CLDの予防や血管再生治療へとつながる可能性が十分にあり、今後詳細に検討を進めていくべき課題と考える。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 中西秀彦. 特別講演「超微形態解析からみた慢性肺疾患 (CLD)-CLDにおける肺胞微小循環系再生の試み」ドレーゲル新生児呼吸器セミナーin 仙台 ~新生児呼吸管理の新展開~, 2016年3月5日、TKP ガーデンシティ (宮城県仙台市)
2. 中西秀彦. 特別講演「細胞レベルで見よう~肺胞微小循環系からみた新生児慢性肺疾患の病態解析」第277回長野県周産期カンファランス、2016年3月2日、信州大学付属病院 (長野県松本市)
3. 中西秀彦. 特別講演「肺胞微小循環系からみた新生児慢性肺疾患の病態解析」第4回新生児科指導医教育セミナー、2016年1月23日、TKP 仙台カンファレンスセンター (宮城県仙台市)
4. 中西秀彦. 特別講演 ランチョンセミナー「慢性肺疾患と肺高血圧」第49回日本小児循環器学会総会・学術集会、2013年7月11日、国立オリンピック記念青少年総合センター (東京都渋谷区)
5. 中西秀彦. 高濃度酸素投与新生仔 CLDモデルにおける肺動脈病変とその回復過程の変化~Angiopoietin-1の肺動脈リモデリング効果の検討~ 第59回日本

未熟児新生児学会学術集会、2014年11月12日、愛知県民文化会館（愛媛県松山市）

6. 中西秀彦、発達期肺胞微小循環系障害とその回復過程における遺伝子発現の変化～Angiopoietin-1は発達期の肺胞微小循環系障害を改善させる～ 第119回日本解剖学会学術集会、2014年3月27日、自治医科大学地域情報研修センターホール（栃木県宇都宮市）
7. 中西秀彦、Angiopoietin-1は、発達期の肺胞微小循環系障害を改善させる 第118回日本解剖学会学術集会、2013年3月29日、サンポートホール高松（香川県高松市）
8. 中西秀彦、新生児期肺障害モデルにおける肺胞および肺胞微小循環系の再生過程の解析 第117回日本解剖学会学術集会、2012年3月27日、山梨大学甲府キャンパス（山梨県甲府市）
9. 中西秀彦、高濃度酸素投与による発達期の肺胞微小循環系障害は長期にわたり遷延する～新生仔マウスCLDモデルを用いた解析～ 第57回日本未熟児新生児学会学術集会、2012年11月25日、ホテル日航熊本（熊本県熊本市）
10. Nakanishi H. The characterization of recovery process of alveoli and pulmonary microcirculation in the injured developing lung. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, August 27, 2012. Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 秀彦（NAKANISHI, Hidehiko）  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 70528207

### (2) 研究分担者

北原 秀治（KITAHARA, Syuji）  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号： 40510235