

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861485

研究課題名(和文)先天性横隔膜ヘルニアモデルにおける胎児治療の開発

研究課題名(英文)The development of fetal therapy in model of congenital diaphragmatic hernia

研究代表者

坂井 宏平 (Sakai, Kohei)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30515292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：先天性横隔膜ヘルニア(CDH)は新生児外科疾患の中で未だ高い致死率を示す疾患である。当施設ではgentle ventilationを主体とした集中管理で、生存率の著明な向上を得た。しかし、重症肺低形成をきたす症例は救命できていない。この、重症例に対する胎児治療の開発を目的とし、先天性横隔膜ヘルニアモデルラットに神経ペプチドであるボンベシンを投与することで、肺体重比の増加、細胞増殖因子の減少、2型肺胞上皮細胞の減少などの肺成熟に繋がる結果を得ることができた。他の薬剤との併用効果に関しては十分な結果を得ることができず、今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a disease that has a still high mortality rate among neonatal surgical diseases. In our facility, intensive care based on gentle ventilation gained marked improvement in survival rate. However, patients who have severe pulmonary hypoplasia can not be rescued. In order to develop fetal therapy for severe cases, administration of neuropeptide bombesin to congenital diaphragmatic hernia model rat increased lung body weight ratio, decreased cell growth factor, type 2 alveolar epithelial cells Results leading to lung maturation such as reduction could be obtained. As for the effect of combined use with other drugs, it is impossible to obtain sufficient results and it is a future subject.

研究分野：小児外科

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア nitrofen 胎児治療 bombesin

1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア(CDH)は新生児外科疾患の中で未だ高い致死率を示す疾患である。近年、高頻度振動換気や体外膜型人工肺による呼吸器管理、一酸化窒素(NO)吸入療法の導入が試みられている。当施設ではgentle ventilationを主体とした集中管理で、生存率の著明な向上を得た(Kimura O, et al. *Pediatr Surg Int.* 2012)。しかし、重度の肺低形成症例の救命率は未だ改善を得られていない。重度肺低形成症例の救命には出生までに低形成肺を成熟させる胎児治療が必要と考えられ、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

胎児肺成熟因子としてレチノイン酸やステロイドが報告されているが、神経ペプチド・ボンペンシ(BBS)にも胎児肺成熟を促す効果が報告されている(Emanuel RL, et al; *Am J Physiol.* 1999)。

申請者らの他研究分野におけるBBSの使用経験(Furukawa T, et al. *J Pediatr Surg.* 2003)を基に横隔膜ヘルニアモデルラットを用いてBBSの肺成熟への関与を検討する。

3. 研究の方法

1) CDH妊娠ラット作成：妊娠ラットに催奇形性のあるnitrofenを経口投与させる手法(Tenbrinck R, et al. *J Pediatr Surg.* 1990)を参考にモデル作成。

2) 実験1: BBSの投与時期を妊娠9日目(embryonal stage)、14日目(pseudoglandular stage)、19日目(canalicular stage)に設定し、出生直前胎仔を犠牲死させ、胎児肺の成熟度について比較検討する。また、BBSの投与量についても検討する。

胎児肺成熟度の評価：形態学的検索として肺組織をHE染色し肺胞構造を比較検討する。免疫組織学的検索として、cell proliferation及び、肺胞型細胞・肺胞型細胞の分布の比較を行う

3) 実験2: 実験1の結果を受け、肺成熟度の良好なグループにおいてnitrofen・BBS投与を行った後に自然分娩させる。出生後の生存率や、生存期間等を評価し重症度を判定する。

実験1 BBS投与によるCDHラット肺の成熟度の評価

動物モデルとしてadult Sprague-Dawley(SD) ratsを一晩交配させ、vaginal plug陽性であった雌ラットを妊娠0日とする。妊娠1日にAlzet osmotic pump(Durect, California, USA)を腹腔内に留置し、BBS(Peptide Institute, Osaka, Japan)の持続投与を開始する。妊娠SDラット(term 22days)に対し妊娠9日にnitrofen 100mg(WAKO Chemicals, Osaka, Japan)をolive oil 1mlに溶解させ全身麻酔下に経口胃管を通して1回投与する(Suen HC, et al; *Pediatr*

Res. 1994)。

胎仔ラットはBBS投与量・時期により以下のグループに分け比較検討する。

・Group1 (nitrofen(+), BBS(-)), day9 から生食を腹腔内持続投与

・Group2 (nitrofen(+), BBS(+)) day9 からBBS50µg/kg/dayを腹腔内持続投与

・Group3 (nitrofen(+), BBS(-)) day14 から生食を腹腔内持続投与

・Group4 (nitrofen(+), BBS(+)) day14 からBBS50µg/kg/dayを腹腔内持続投与

・Group5 (nitrofen(+), BBS(-)) day19 から生食を腹腔内持続投与

・Group6 (nitrofen(+), BBS(+)) day19 からBBS50µg/kg/dayを腹腔内持続投与

各グループにおいて採取した肺組織を以下の手法により検索する。

1) lung weight to body weight ratio(LW/BW)の比較検討による肺成熟度の評価

2) 組織学的(形態学的)検討評価

4%パラホルムアルデヒドにて肺組織を固定しHE染色による形態学的評価と免疫組織染色にてcell proliferation(PCNA染色)及び肺胞上皮細胞の分布(型TTF-1染色)を評価する。

3) 生化学的検討評価

肺低形成の評価するために肺組織内のDNA-to-protein ratioを測定し評価する。

DNA定量はdiphenylamine法、protein定量はBradford法によって評価する。

免疫組織染色におけるPCNA, TTF-1それぞれにおいてRT-PCRによる定量評価を行う。

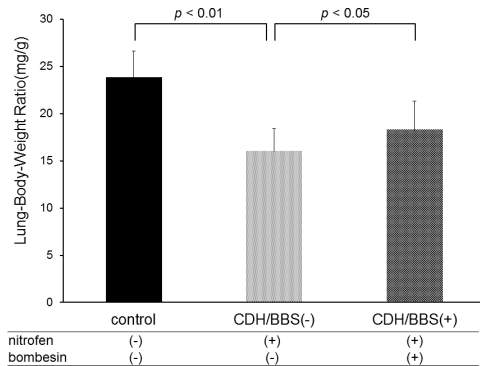
4) 研究成果

各Groupにおいて、Group5,6間には肺体重比に差を認めなかった。より臨床に即したモデルで検討するためにGroup3,4間での比較を行った。

CDH発症率はBBS非投与群(Group3)で50%(13/26体)、BBS投与群(Group4)で49%(24/49体)であり有意差は認めなかった。発症したCDHは全て左CDHであり、BBSを投与されたCDHラットには他の合併奇形は認めなかった。

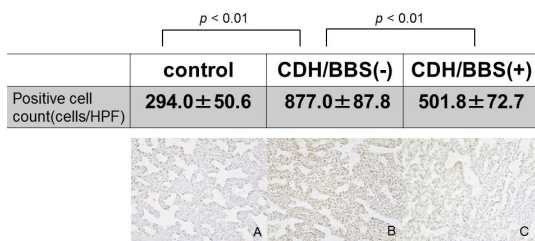
肺体重比においてCDH/BBS(+)群はCDH/BBS(-)群よりも有意に肺体重比が高値であった($p < 0.01$) (Figure 1)。

Figure 1



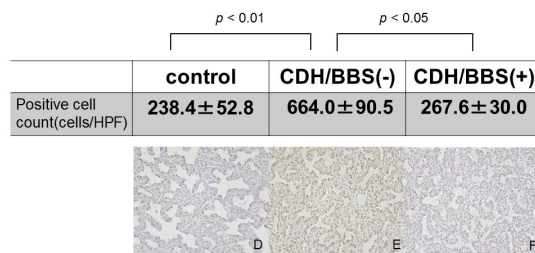
免疫染色では、PCNA 染色において CDH/BBS (+) 群よりも CDH/BBS (-) 群の方が陽性細胞は多かった ($p < 0.01$) (Figure 2) .TTF-1 染色でも同様の結果であった ($p < 0.01$) (Figure 3) .

Figure 2



BBS: bombesin, CDH: congenital diaphragmatic hernia
HPF : high power field

Figure 3



BBS: bombesin, CDH: congenital diaphragmatic hernia
HPF : high power field

RT-PCR では PCNA の mRNA 発現量は CDH/BBS (+) 群では低値であったが、CDH/BBS (-) 群と比較して有意差は認めなかった (Figure 4) . 一方で TTF-1 の mRNA 発現量は CDH/BBS (+) 群が有意に CDH/BBS (-) 群と比較して減少していた ($p < 0.05$) (Figure 5) .

Figure 4

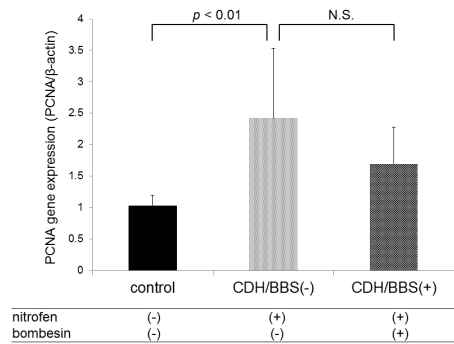
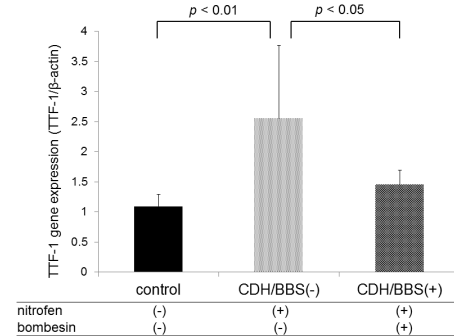


Figure 5



PCNA と TTF-1 は両者ともに、CDH モデルの低形成肺において増加することが報告されている . この二つのマーカーが BBS 投与により発現量が減少したことから BBS が肺成熟効果を促進したことが示唆された .

重症 CDH における低形成肺への有効な胎児治療の可能性を見出した点で、医学上価値ある研究と言える .

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 1 件)

Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Fumino S, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T. Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. J Pediatr Surg 49: 1749-1752, 2014.

[学会発表] (計 2 件)

Sakai K, Kimura O, Furukawa T, Higuchi K, Wakao J, Kimura K, Fumino S, Aoi S, Masumoto K, Tajiri T. Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in rat models of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. 47th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons. 2014 May 24-29. Banff, Canada

坂井宏平, 古川泰三, 若尾純子, 木村幸積,
文野誠久, 樋口恒司, 青井重善, 木村 修,
田尻達郎.

先天性横隔膜ヘルニアに対する bombesin
胎内投与による肺成熟効果の検討. 第 51 回
日本小児外科学会学術集会 2014 年 5 月 8
日 大阪国際会議場, 大阪市, 大阪府.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 宏平 (Sakai Kohei)
京都府立医科大学小児外科・助教
研究者番号: 30515292

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()