

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10111

研究課題名(和文) Angiopoietin-1による肺泡微小血管再生は早産児肺障害の治療戦略となる

研究課題名(英文) Angiopoietin-1 might be a novel therapeutic strategy for injured pulmonary capillaries in the developing lung

研究代表者

中西 秀彦 (Nakanishi, Hidehiko)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70528207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生に重要な役割を果たしているAngiopoietin-1(Ang-1)の投与が、早産児肺障害の新たな治療戦略に繋がると考え、新生仔マウス高濃度酸素肺障害後回復期モデルを用いて、肺泡微小血管障害に対するAng-1投与効果について超微形態解析を行った。その結果、Ang-1投与により血管内皮細胞の形態異常と血液空気関門の肥厚が劇的に改善した。それに伴い、肺泡構造異常の改善と二次性肺高血圧の指標である右室心筋重量が軽減した。微小血管障害改善効果の背景には免疫関連遺伝子の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で我々は、発達期肺障害における主要な障害部位は、肺胞壁内の微小血管であり血液空気関門を構成する血管内皮細胞であることを解明した。またAngiopoietin-1(Ang-1)投与により、血管内皮細胞障害の改善とともに肺泡構造異常と二次性肺高血圧の改善を認めたことから、Ang-1がCLDの新たな治療戦略となる可能性が示唆された。また効果の背景に免疫関連遺伝子の関与が示唆されたことより、血管再生と免疫修飾の両面からのシグナル修飾が新たなCLD治療戦略となる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Considering that administration of Angiopoietin-1 (Ang-1), which plays an important role in angiogenesis, will lead to a new therapeutic strategy for bronchopulmonary dysplasia in premature infants, we studied ultrastructural changes in pulmonary microvasculature after Ang-1 administration, by using lungs from newborn mice exposed to hyperoxia for 14days after birth followed by 7 days of normal room-air replacement conditions. As a result, Ang-1 administration dramatically improved vascular endothelial cell morphology abnormalities and blood-air barrier thickening. Along with this, the alveolar structural abnormality was also improved and the right ventricular myocardial weight, an index of secondary pulmonary hypertension, was reduced. The involvement of immune-related genes was suggested as the background of the effect of improving microvascular injuries.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 新生児医療の進歩により、これまで救命困難であった超早産児の予後は大きく改善したが、新たな合併症として慢性肺疾患 (chronic lung disease; CLD)が問題となっている。本症では、早産により発達途上の未熟な肺胞や肺胞微小血管が障害を受け、児に長期にわたる呼吸・循環障害を引き起こす。よって CLD 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。しかし、その発症機序は明確には解っておらず、超早産児における CLD 発症率は減少をみていない。
- (2) 申請者はこれまでに、新生仔マウス高濃度酸素暴露 CLD モデルを作成し、肺胞微小血管障害の改善が CLD の改善に重要な役割を果たしている可能性があることや(Nakanishi et al. AJP-Lung Cell Mol Physiol 2007)、超微形態解析を用いて高濃度酸素暴露後の肺胞微小血管障害では血管内皮細胞の細胞質形態異常と血液空気関門の著明な肥厚を特徴とすること、これら構造異常が長期にわたり遷延することから、この肺胞微小血管構造を改善させることが、CLD の治療ターゲットになり得ることを報告した(2012-2015 科研費基盤 C) (Nakanishi et al. Med Mol Morphol 2018)。
- (3) Angiopoietin-1 (Ang-1) は、胎生期において血管内皮細胞に発現する Tie2 受容体を介して血管構造を安定化するとともに血管新生を促進することや、また新生仔マウス肺においてその遺伝子発現は生後経過とともに上昇しており、肺胞微小血管の成熟に重要な役割を果たすことが知られている (Hato ら, 2009)。
- (4) CLD の病態は肺胞微小血管障害であるため、肺胞微小血管の再生を目的とする Ang-1 投与は、CLD の治療戦略となり、その病態解明にもつなげる可能性が十分であると期待できる。

2. 研究の目的

- (1) 血管新生に重要な役割を果たしている Ang-1 の投与が CLD の改善に繋がると考え、新生仔マウス高濃度酸素肺障害モデルと回復期 (高濃度酸素離脱) モデルに加え、回復期再生 (Ang-1 投与) モデルを作成する。
- (2) Ang-1 投与による高濃度酸素暴露後肺胞および肺胞微小血管障害への改善効果について、特異抗体を用いた多重免疫染色、電子顕微鏡を用いた肺胞微小血管や血液空気関門の超微形態解析、生化学・分子生物学的手法による関連遺伝子発現の評価、各臨床パラメータ (体重、肺容量、心筋重量) の評価結果を基に解析を行う。
- (3) 本研究の最終ゴールは、CLD における肺胞微小血管の障害過程および Ang-1 投与による再生過程を解明し、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) **CLD (高濃度酸素投与)、回復期 (高濃度酸素離脱)、回復期再生 (Ang-1 投与) モデルの作成:** ICR マウスを出生直後より、85%酸素に暴露させることで、高濃度酸素投与肺障害モデルを作成した。このモデルは、CLD モデルの一つとして既に申請者は確立している (Nakanishi ら, 2007)。つまり ICR マウスを出生直後より、85%酸素 (O₂) もしくはルームエア (RA: 21%酸素; Air) 下に 14 日間暴露させた後、回復期 (高濃度酸素離脱) として RA 下に 7 日間飼育した。これによりコントロール群 (すなわち RA14 日 (Air-14d) 群)、RA21 日 (Air-21d) 群、CLD 群 (すなわち高濃度酸素 14 日 (O₂-14d) 群)、回復期モデル群 (すなわち高濃度酸素回復群 (O₂Air-21d)) 群を作成した。回復期再生モデルとして、前述した回復期モデル群に Ang-1 を 2 μg/dose の投与量で、酸素離脱直後 (日齢 14) と日齢 17 に腹腔内投与することにより作成した (O₂Air21-Ang-1) (Hegeman ら, 2010)。
- (2) **組織切片作成:** 新生仔マウスを麻酔下で気管切開し、PE-10 カテーテルを挿入した。そこから 4%パラホルムアルデヒドを注入し、20cmH₂O の圧で 30 分間肺を拡張させた後、同液を用いて 4 日、over night で肺組織を固定した。これらはパラフィン切片、凍結切片に使用した。電顕観察用として、エポキシ樹脂包埋試料を作成した。固定肺は、その後の免疫組織染色、組織学的肺胞構造評価、電子顕微鏡を用いた超微形態観察に使用した。
- (3) **肺胞構造の評価:** 各群の肺組織切片を用いて、トルイジンブルー染色を施行し、光学顕微鏡を用いて、肺胞構造の形態学的評価を行った。
- (4) **超微形態解析による肺胞微小血管の評価:** 電顕観察用 100 メッシュグリッド全域に超薄切片を載せ、電子染色後、電顕観察した。画像計測用に 1 枚のグリッドに付き、各検体血液空気関門を含めて約 60-70 枚を一律 5 万倍で撮影した。撮影した画像に、レイヤーとしてグリッドを重ね、グレーティングでキャリブレーションを掛け、マス目に認めた血液空気関門上 (5-7 か所) の上皮細胞層、基底膜層、内皮細胞層の厚さを計測した。計測の前提条件として、基底膜が比較的明瞭であること、上皮細胞または内皮細胞同士が隣接する細胞間接着が確認される周辺部位とした。
- (5) **肺容量、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。

肺容量測定：固定肺を用いて、各群の肺体積をアルキメデスの原理に基づき測定し、マウス体重当たりの体積 (cm³/g) を計算して比較した。

(6) リアルタイム PCR、マイクロアレイ解析

リアルタイム PCR: QIAGEN 社 TissueLyzer を用いて凍結マウス肺組織を破碎し、QIAGEN 社 QIAamp RNA mini kit にて total RNA を精製した。得られた total RNA 1 μg から ThermoFisher SCIENTIFIC 社 SuperScript™ VIL0™ Master Mix を用いて cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとし、以下のプライマーセットを用いて BIO RAD 社 SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix を用いてリアルタイム PCR を行った (n=6~8)。ハウスキーピング遺伝子である TBP を コントロール遺伝子として比較 Ct 法 (Ct 法) にて解析を行った。

Ang-1 ang1 FW (5' -gatcttacacgggtgccgatt) ang1 RV (5' -tgattttgtcccgcagtgta)
 Ang-2 ang2 FW (5' - tgtgcggaaatcttcaagtc) ang2 RV (5' - tgccatcttctcgggtgttg)
 Tie2 tie2 FW (5' - ccctcctcaaccagaaaaca) tie2 RV (5' - gcccttgagctggtactgag)

CAGE-seq による肺胞障害および再生過程に関する関連遺伝子の網羅的解析: マウス日齢および酸素や薬剤処理による 5 群のサンプルを用意し、次世代シーケンサー解析の一種である CAGE 解析 (Cap Analysis of Gene Expression) により、肺組織に含まれる全 RNA (total RNA) について、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

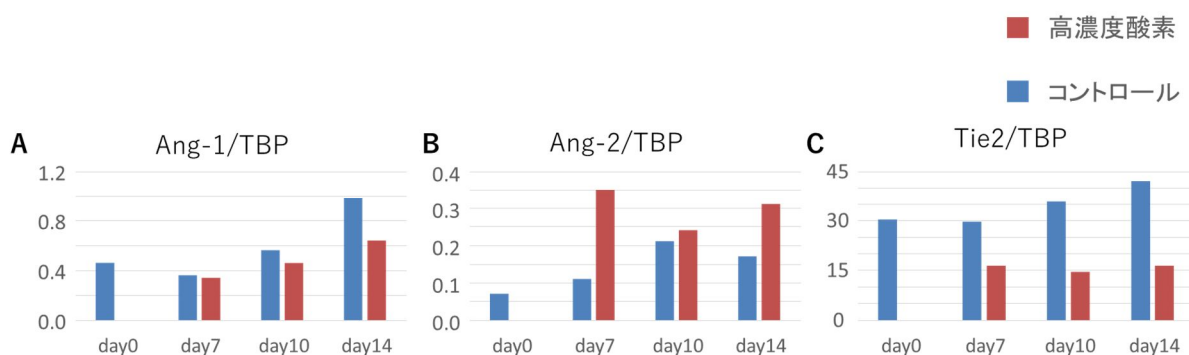
(7) 統計学的解析: 一元配置分散分析により各群の比較を行い、有意な場合には、Post hoc テストとして Tukey's HSD テストを用いた。p<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) Ang-1 遺伝子は生後肺の発達に重要な役割を果たしており、高濃度酸素肺障害ではその発現は低下している。

図 1 に示すように、出生後から生後 14 日までの期間において、Ang-1、Ang-2、Tie-2 遺伝子の肺組織での発現は、生後経過とともに上昇しており、これら遺伝子は肺の発達に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、高濃度酸素暴露下では、Ang-1 および Tie2 遺伝子発現が低下していたのに対し、Ang-2 遺伝子発現は大きく上昇していた。

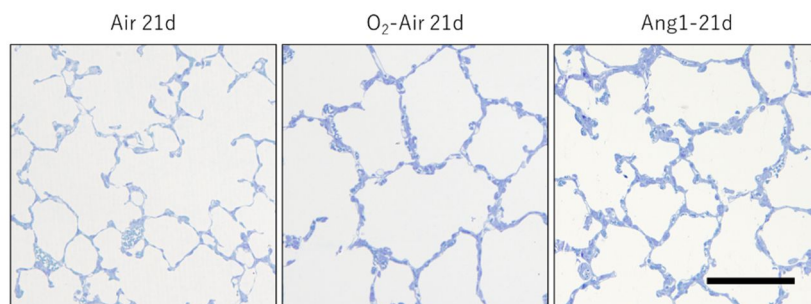
図 1: Ang/Tie2 シグナル遺伝子における生後経時的変化



(2) Ang-1 投与は、高濃度酸素暴露後回復期に遷延する肺胞構造異常を改善させる。

図 2 に示すように、14 日間の高濃度酸素暴露後回復期の新生仔マウス肺 (O₂-Air-21d) は、コントロール (Air-21d) と比較しても、換気スペースの増大、肺胞中隔数の減少を認め、回復期においても構造異常は遷延することが示された。一方、Ang-1 投与群 (Ang1-21d) では、O₂-Air 21d と比較して、これら肺胞構造の異常が改善していた。

図 2: 各群における末梢肺胞構造



Scale bar: 100 μm

(3) Ang-1 投与は、高濃度酸素暴露により減少した肺泡毛細血管数を改善させ、肺体積増加を軽減する。

図 3 に示すように、肺全体のマクロ所見において、O₂-Air-21d 群は、Air-21d 群と比較して、全体的に蒼白であり、肺泡微小血管数減少が遷延していることが示唆された。一方 Ang-21d 群では、コントロールと比較して、ほぼ同等の色調であることから、肺泡毛細血管数が改善していることが示唆された。また O₂-Air-21d 群の肺体積は、Air-21d 群と比較して大きく増大していたが、Ang1-21d 群では、Air-21d 群と同等であった。これら肉眼的変化は、表 1 に示す各群の肺体積 (mm³)、肺体積/体重 (cm³/g) の実測結果からも、明らかであった。この肺体積の増加は、肺泡構造の変化 (図 2) と関連があることが示唆された。

図 3 : 各群における肺泡のマクロ所見

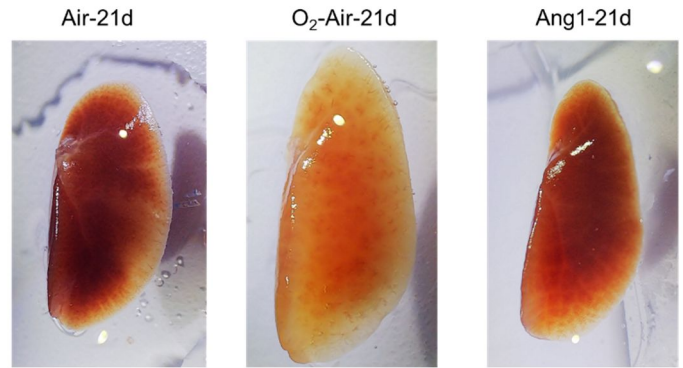


表 1 : 各群における新生仔マウス体重および肺体積の比較

	Air-21d	n	O2Air-21d	n	Ang1 21d	n
体重(g)	12.2	14	11.2	11	11.4	13
肺容積(cm ³)	660	8	886	^a 8	796	5
肺容積/体重	54.3	8	80.8	^a 8	67.8	^{a,b} 5
RV/(LV + IVS)	0.34	11	0.40	^a 9	0.33	8

a: p<0.05 vs Air-21d; b: p<0.05 vs O₂-Air 21d

(4) Ang-1 投与は、発達期の肺泡微小血管障害を改善させる。

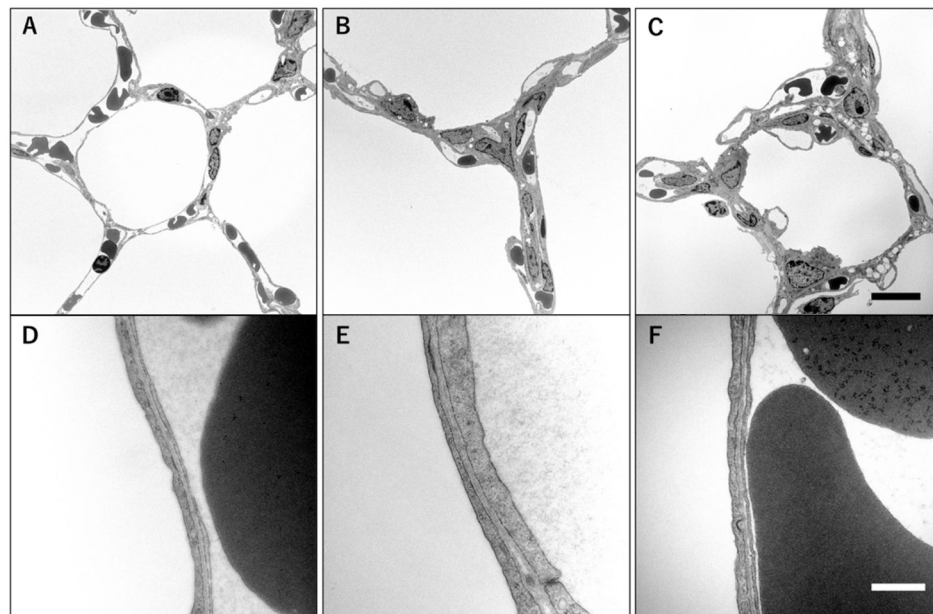
超微形態解評価を行った結果を図 4 (A,B,C,D,E,F) に示す。

Air-21d の肺泡壁には多数の肺泡微小血管が存在し、その内腔は薄い BAB で形成されているのに対し (図 4A)、O₂-Air-21d 群では、肺泡微小血管の内腔は狭小化しており、厚い BAB で形成されていた (図 4B)。一方、Ang1-21d 群では、肺泡微小血管形態異常の改善を認めた (図 4C)。

血液空気関門 (BAB) に注目すると、Air-21d の BAB の 3 層構造はそれぞれ薄く構成されているが (図 4D)、O₂-Air-21d 群では、BAB は著明に肥厚し、中でも血管内皮細胞層の肥厚が顕著であった (図 4E)。Ang1-21d 群では、これら構造異常が劇的に改善していた (図 4F)。

図 4 : 各群における肺泡毛細血管 (A-C) および血液空気関門 (D-F) の超微形態比較

A,D: Air-21d; B,E: O₂-Air-21d; C,F: Ang1-21d black bar: 10μm white bar: 500nm



これら BAB の肥厚について定量化した結果を図 5 に示す。O₂-Air-21d 群では、BAB が有意に肥厚していたが、3 層すべてが有意に肥厚していた。BAB 内の各構成層の分布を比較したところ、特に、血管内皮細胞層の肥厚が顕著であった(図 6)。Ang1-21d では、これら構造異常が改善していた。

図 5： 各群の血液空気関門 (BAB) 内における上皮細胞層、基底膜、内皮細胞層、BAB の厚さ (nm)
*P<0.05

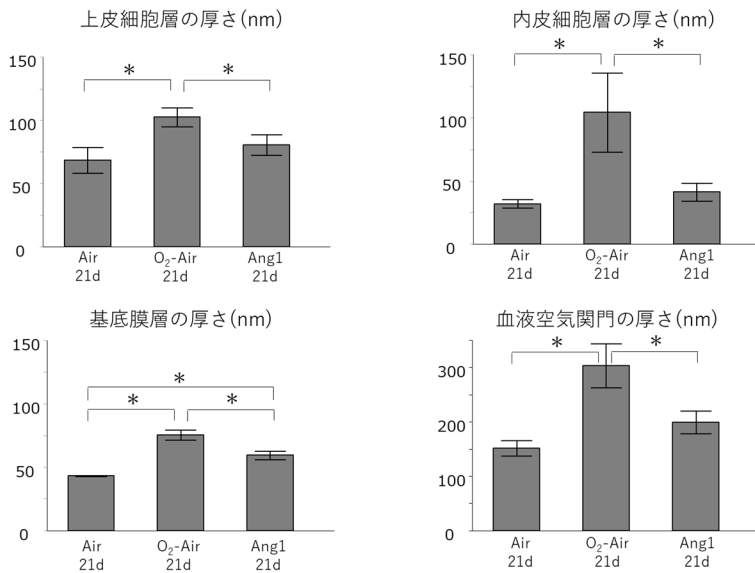
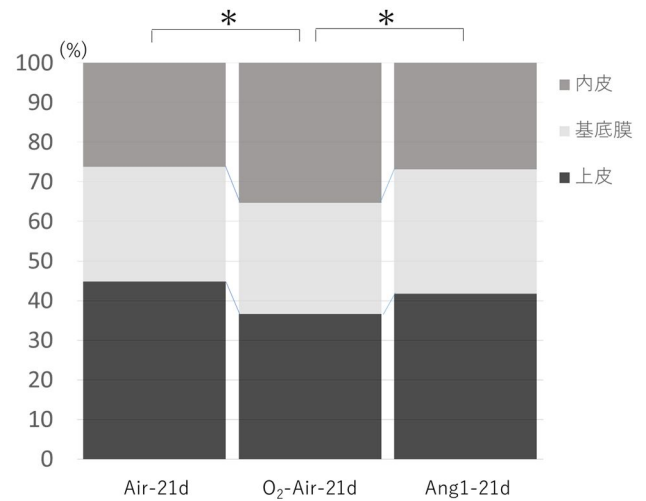


図 6： 各群の血液空気関門 (BAB) 内における上皮細胞層、基底膜、内皮細胞層が占める割合
*P<0.05

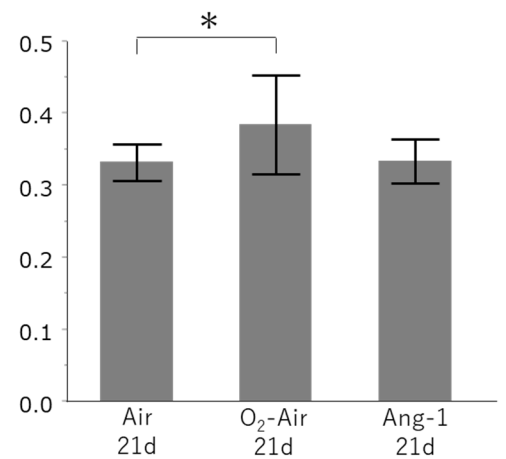


(5) **Ang-1 投与は、高濃度酸素暴露後回復期に遷延する肺高血圧を改善させる。**

図 7 に示すように、O₂-Air-21d 群では Air-21d 群と比較して、RV/(LV+IVS) が有意に上昇していたが、Ang1-21d 群は Air-21d 群と比較して差は認めなかった。Ang-1 投与は、肺泡微小血管の構造改善をもたらす、その結果、高濃度酸素暴露後に続発する肺高血圧を改善させる可能性が示唆された。

図 7： 各群における右室心筋重量/左室心筋および心室中隔重量比 (RV/(LV+IVS)) *P<0.05

RV/LV+IVS



(6) **Ang1 投与による肺泡微小血管障害のメカニズムには、免疫関連遺伝子が関与する可能性がある。**

CAGE 解析により、肺組織に含まれる全 RNA (total RNA) について、網羅的な遺伝子発現解析を行った。カットオフの方法としては、数万に及ぶ遺伝子データ母集団のうち、各遺伝子の発現変動が、高濃度酸素で 4 倍以上の上昇を示したものを示すもの (すなわち LogFC>=2) かつ、治療群で 4 倍以下の減少を示したもの (すなわち LogFC<=-2) との閾値を設け、絞りこんだ。

その結果、Sh2b2、Steap1、Grin2c、Gata4、Cxcl13、Tff2、Tnf、Bpifa1、Cxcl9、Oas2、Ccl2、Muc5ac、Ptger3、Ctsg、Ccl21a、Ikvk8-30 が挙げられた。これらピックアップされた遺伝子群には、免疫系や恒常性にかかわる遺伝子が含まれていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakanishi Hidehiko, Morikawa Shunichi, Kitahara Shuji, Yoshii Asuka, Uchiyama Atsushi, Kusuda Satoshi, Ezaki Taichi	4. 巻 51
2. 論文標題 Morphological characterization of pulmonary microvascular disease in bronchopulmonary dysplasia caused by hyperoxia in newborn mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0182-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 4.Nakanishi H. Morikawa S, Kitahara S, Yoshii A, Uchiyama A, Kusuda S, Ezaki T
2. 発表標題 Morphological characterization of pulmonary microvascular disease in bronchopulmonary dysplasia caused by hyperoxia in newborn mice.
3. 学会等名 The 8th TAKAO International Symposium on Molecular Mechanism of Cardiopulmonary Disease (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidehiko Nakanishi
2. 発表標題 Ultra-structural characterization of pulmonary vascular disease in bronchopulmonary dysplasia ~Angiopoietin-1 might improve injured pulmonary microcirculation in the developing lung~
3. 学会等名 GLOBAL EXPERT MEETING (招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北原 秀治 (Kitahara Shuji) (40510235)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	森川 俊一 (Morikawa Shunichi) (70339000)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	