

平成21年5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592061
 研究課題名（和文） 先天性横隔膜ヘルニアの新しい胎児治療戦略—細胞外マトリックス代謝の観点から—
 研究課題名（英文） New strategy for congenital diaphragmatic hernia based on the metabolism of extracellular matrix
 研究代表者
 増本 幸二（MASUMOTO KOUJI）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：20343329

研究成果の概要：

先天性横隔膜ヘルニアの新たな胎児治療戦略として、細胞外マトリックス代謝からの戦略を行うための基礎実験を行った。低形成肺のモデルとして、通常使用される Nitrofen-induced モデルや新たなモデルとして Gja-1 knock-out モデルを使用し、その発達の程度を検討した。またコラーゲンなどの細胞外マトリックスやその分解酵素について、分布やタンパク発現量を検討した。どちらの低形成肺でも、発達がきわめて遅れており、組織培養を行い、成長因子などの投与によりこの発達の遅れが改善する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児外科

科研費の分科・細目：小児外科（7311）

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア、肺低形成、細胞外マトリックス、ギャップジャンクション

1. 研究開始当初の背景

新生児外科疾患において、先天性横隔膜ヘルニア（CDH）における肺低形成の機序解明は、小児外科医にとっての責務である。我々は、新たなCDHの治療戦略の開発を最終的な目標として、細胞外マトリックス、細胞間接着因子、細胞増殖因子を中心とした肺低形成の機序解明に取り組んでいる。分子生物学的研究の進歩に伴い、臓器発生機序について、各種ノックアウトマウスを用いた研究が盛んに行われている。肺の発生についてもその類であ

り、細胞増殖因子、細胞外マトリックスや細胞間接着因子が肺発生に大きく関与している事が、現在明らかになっている。そのため、細胞外マトリックスや接着因子をターゲットとし、CDHを含む、様々な低形成肺を呈する疾患への胎児治療戦略を模索するにいたった。

2. 研究の目的

1) Gja-1(gap junction protein alpha-1) knock-out マウスに関する研究

肺低形成発生機序の解明のために、細胞外

接着因子であるgap junction protein alpha-1(:以下Gjal)の関与に着目した。

Gjal マウスのhetero typeの親マウスを交配した結果得られた仔マウスは、wild typeとhetero typeの仔マウスが正常に生存可能であるのに対し、knock-out typeの仔マウスは出生直後にチアノーゼを呈して死亡する。このGja-1のknock-out マウスは、現在まで低形成肺が生じることが報告されておらず、今回まず、この肺の発達の程度を確認することとした。

2) Nitrofen-induced rat modelに関する細胞外マトリックスに関する検討

CDHの動物モデルとして、Nitrofen-induced rat modelを使用し、このモデルで生じる低形成肺における、細胞外マトリックス分解酵素や酵素を阻害する酵素について胎生期からの分布などについて検討した。

3. 研究の方法

1) Gja-1(gap junction protein alpha-1) knock-out マウスに関する研究

Gja-1 knock-outマウスは、pEF6/V5-His TOPOベクターを用いて作成されたマウスを用い、親、仔のtypingについては各々DNA typingを行った。このknock-out typeについて、wild typeやhetero typeと比較し、免疫組織学、生化学的に比較し、肺発達の程度を検討した。このknock-out typeについて、wild typeやhetero typeと比較し、形態学的、生化学的に比較し、肺胞構造形成と肺血管の発達を中心に肺発達の程度を検討した。

使用したマーカーは、I型肺胞上皮細胞をaquaporin-5(AQ-5)、II型肺胞上皮細胞をsurfactant protein C(Sp-C)、血管平滑筋を α -smooth muscle actin(α -SMA)を用いて形態学的、生化学的に検討した。

2) Nitrofen-induced rat modelに関する細胞外マトリックスに関する検討

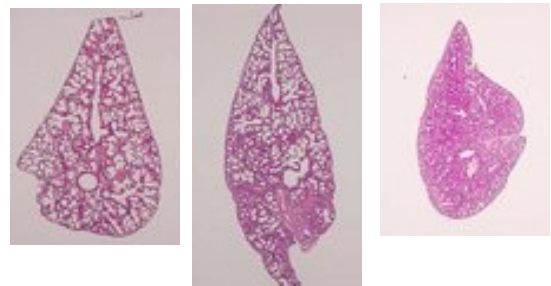
Nitrofen-induced rat modelを使用し、このモデルで生じる低形成肺における、細胞外マトリックス分解酵素や酵素を阻害する酵素について胎生期からの分布などについて検討した。さらに I型肺胞上皮細胞をAQ-5、II型肺胞上皮細胞をsurfactant protein C(Sp-C)、血管平滑筋を α -SMAを用いて、組織培養系で培養したCDHモデル肺について、その発達について形態学的、生化学的に検討した。

4. 研究成果

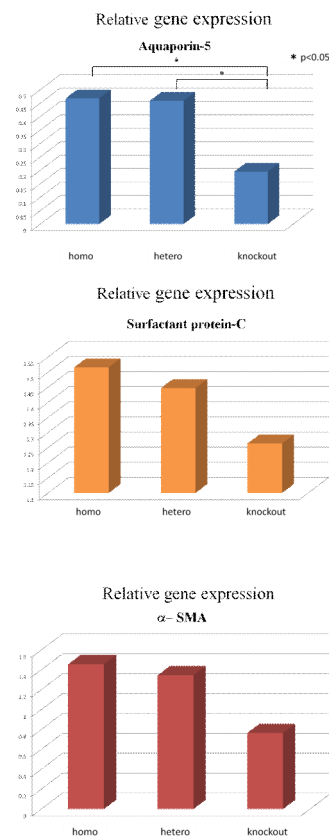
1) Gja-1(gap junction protein alpha-1)

knock-out マウスに関する研究

Wild type, hetero type, knock-out typeの仔マウスの摘出肺を比較検討したところ、形態学的所見として、wild typeとhetero typeの仔マウスの肺は、肺胞中隔の薄化に伴う血液ガス交換表面積の拡大した所見を呈していた。このことから気道系・血管系の発達は良好なcanalicullar stageからalveolar stageに至っていると考えられた。一方、knock-out typeの仔マウスは、末梢側の肺胞が拡張しきれずに外分泌腺様構造を呈していた。また、肺胞中隔の肥厚が顕著であり、内腔は狭小化し、血管系の発達も未熟であった。肺発達過程におけるpseudograndullar stageに相当するものと考えられた。



上図は左から Wild,Hetero,Knock-out type



Knock-out typeでは、wildやhetero typeと比較してAQ-5やSp-C、 α -SMAにおいて発

現の低下が認められた。

以上より、Gja-1knock-out type では肺発達における過程で、発生初期に gap junction を通過する細胞増殖因子などの細胞間情報伝達障害などのために、肺発達が胎生期において遅れているのではないかと考えられた。

2) Nitrofen-induced rat modelに関する細胞外マトリックスに関する検討

Nitrofen誘導性CDHモデルでは出生後すぐの低形成肺において、正常仔の肺に比べ、すでにI型及びIII型コラーゲンなどの細胞外マトリックスが増加しており、これらを分解する酵素matrix metalloproteinases (MMPs)の一部の増加とその阻害酵素Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)の一部に異常が生じていることが判明した。CDHモデル肺では、特に肺血管でのMMPsの異常が強く、肺動脈内中膜において細胞外マトリックス(特にIV型コラーゲン)の増加に伴い、MMP-2やMMP-9が増加していた。しかしながら、特にMMP-2のCDHモデルでの胎生期の経時的変化では、正常に比べ、胎生後期での肺間質や細動脈以上の肺動脈系血管にて細胞外マトリックスの増加が著しく、それに伴いMMPsも増加しているが、その増加は出生時近くで認められ、反応が遅れている可能性が考えられた。

組織培養系で培養したCDHモデル肺について、AQ-5、Sp-C、 α -SMAでの検討は現在進行中であり、肺胞や血管系の発達の遅れが、組織培養により少しずつ発達していくことは確認された。

最終的な胎児治療に関する研究までには至らなかったが、新しい低形成肺のモデルの確認、Nitrofen-induced rat modelでの細胞外マトリックス分解酵素の分布など、新たな知見が得られた。今後これらの知見をもとに、低形成肺で分布の遅れている可能性のある酵素について、それらの分布を促す成長因子などを投与するなどの検討を加えていきたい。

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 8 件)

1. Masumoto K, Nagata K, Souzaki R, Uesugi T, Takahashi Y, Taguchi T. Effectiveness of diaphragmatic repair using an abdominal muscle flap in patients with

recurrent congenital diaphragmatic hernia. J Pediatr Surg 42(12): 2007-11, 2007, 査読あり

2. Uesugi T, Masumoto K, Nagata K, Taguchi T, Suita S. The effect of fetal stabilization using morphine hydrochloride on neonatal rats.

Pediatr Surg Int 23(10): 961-5, 2007, 査読あり

3. Nagata K, Masumoto K, Uesugi T, Yamamoto S, Yoshizaki K, Fukumoto S, Nonaka K, Taguchi T. Effect of insulin-like-growth factor and its receptors regarding lung development in fetal mice. Pediatr Surg Int 23(10): 953-9, 2007, 査読あり

4. Masumoto K, Nagata K, Higashi M, Nakatsuji T, Uesugi T, Takahashi Y, Nishimoto Y, Kitajima J, Hikino S, Hara T, Nakashima K, Nakashima K, Oishi R, Taguchi T. Clinical features of selenium deficiency in infants receiving long-term nutritional support. Nutrition 23(11-12): 782-7, 2007, 査読あり

5. 増本幸二, 田口智章, 水田祥代, 絹川直子, 長崎 彰, 有馬 透, 財前善雄, 飯田則利, 浅部浩史, 山田耕治. 九州大学小児外科および関連病院における新生児横隔膜ヘルニアの最近5年間の治療成績. 臨牀と研究 84(11): 1545-9, 2007, 査読あり

6. Masumoto K, Nagata K, Uesugi T, Yamada T, Kinjo T, Hikino S, Hara T, Taguchi T. Risk of respiratory syncytial virus in survivors with severe congenital diaphragmatic hernia. Pediatr Int 50(4): 459-63, 2008, 査読あり

7. 増本幸二, 手柴理沙, 江角元史郎, 永田公二, 高畑 靖, 原 寿郎, 月森清己, 和気徳夫, 田口智章. 低出生体重児に合併した先天性横隔膜ヘルニアの治療成績. 日本周産期・新生児医学会雑誌 44(4): 1064-1068, 2008, 査読あり

り

8. Masumoto K, Teshiba R, Esumi G, Nagata K, Takahata Y, Hikino S, Hara T, Hojo S, Tsukimori K, Wake N, Kinukawa N, Taguchi T. Improvement in the outcome of patients with antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia using gentle ventilation and circulatory stabilization. *Pediatr Surg Int*, (2009 accepted), 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1. Masumoto K, Nagata K, Sozaki R, Uesugi T, Takahashi Y, Taguchi T. Effectiveness of diaphragmatic repair using an abdominal muscle flap in patients with recurrent congenital diaphragmatic hernia. 40th annual meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (2007. 4. 15-19, Queenstown, New Zealand)
2. 増本幸二、江角元史郎、手柴理沙、永田公二、田口智章 出生前診断された先天性横隔膜ヘルニアにおける治療方針第5回日本胎児治療学会 (平成19年10月19-20日、大阪)
3. Masumoto K, Teshiba R, Esumi G, Nagata K, Takahata Y, Hara H, Hojo S, Tsukimori K, Wake N, Kinukawa N, and Taguchi T. Dramatic improvement in the outcome of patients with antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia using gentle ventilation and circulatory stabilization. 15th congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies. (2008. May 20-24, Nagoya)
4. Masumoto K, Teshiba R, Esumi G, Nagata K, Takahata Y, Hara T, Hojo S, Tsukimori K, Wake N, Kinukawa N, Taguchi T. Dramatic improvement in the outcome of patients with antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia using gentle

ventilation and circulatory stabilization. 41st Annual meeting of Pacific Association of Pediatric Surgeons (2008. June 29-July 3, Jackson, Wyoming, USA)

5. 増本幸二、手柴理沙、江角元史郎、永田公二、田口智章. 低出生体重児に合併した先天性横隔膜ヘルニアの治療成績. 第44回日本周産期・新生児医学会総会 ワークショップ 横隔膜ヘルニアの治療ストラテジー (平成20年7月13-15日、横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増本 幸二 (MASUMOTO KOUJI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：20343329

(2) 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI TOMOAKI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20197247

木下 義晶 (KINOSHITA YOSHIAKI)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：80345529

永田 公二 (NAGATA KOUJI)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：20419568

(3) 連携研究者

なし