

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08261

研究課題名(和文) 新生児呼吸窮迫症候群の新たな成因同定と発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel identification of the etiology of neonatal respiratory distress syndrome and its pathogenesis.

研究代表者

鈴木 光幸 (Suzuki, Mitsuyoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90449059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 妊娠期の母体環境変化が直接・間接的に胎児に大きな影響を及ぼす事は広く理解されているが、具体的に胎児の発生に寄与する因子は未知の部分が多い。Cyp27a1ホモ欠損母体マウスから出生した仔体は仔体自身の遺伝子型に関わらず、出生後すぐに呼吸窮迫症候群により死亡することが判明した。逆に胎仔がホモ欠損個体であっても、母体がヘテロ欠損であれば死亡する仔体はなかった。また、ホモ欠損雄個体の精子とホモ欠損雌個体の卵子を使って人工授精したCyp27a1ホモ欠損受精卵を仮親マウスの子宮に移植したところ、健康な新生仔が得られたため、この異常は母体環境に起因するものであると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児呼吸窮迫症候群の分子メカニズム解明のため、27-Hydroxycholesterol (27-HC)が肺発生に及ぼす影響を独自の交配モデルを用いて解明することを目的とする。(1) (27-HC欠乏が新生児呼吸窮迫症候群の原因となるという報告はこれまでになく、病態生理を解析する上で非常に有用な動物モデルになり得る。また、肺形成に関わる新規転写因子やコード遺伝子などの探索から肺形成メカニズムの一端が解明できれば、(2)肺サーファクタント分泌異常や脂質トランスポーター異常による先天性肺胞蛋白症など、これまで根本的治療が存在しない難治性肺疾患に対する治療アプローチが発見できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： It is widely believed that changes in the maternal environment during gestation have significant direct and indirect effects on the fetus, but the specific factors that contribute to fetal development are largely unknown. We found that pups born from Cyp27a1 homozygous mice develop respiratory distress syndrome and die soon after birth, regardless of the genotype of the pups themselves. Conversely, even if the fetuses were homozygous, no pups died if the mother was heterozygous. In addition, when Cyp27a1 homozygous embryos artificially inseminated with sperm from homozygous males and eggs from homozygous females were implanted in the uterus of putative parental mice, healthy newborn pups were obtained, leading to the conclusion that this abnormality was caused by the maternal environment.

研究分野： 新生児学 小児栄養学 小児消化器・肝臓病学

キーワード： 新生児呼吸窮迫症候群 オキシステロール 胆汁酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児呼吸窮迫症候群は、肺の未成熟によって肺サーファクタントが欠乏し、肺コンプライアンスの低下から肺泡虚脱、肺血管抵抗増大を示す病態である。発症は生後 2-3 時間後であり、リスクファクターとして 1,500g 未満の極低出生体重児、早期産児(特に 32 週未満)がある。児の未熟性以外で呼吸窮迫症候群を発症する胎児要因として、肺発生異常(*NKX2.1* 遺伝子異常)、肺サーファクタントの産生異常(サーファクタント蛋白(SP-)B 欠損症、SP-C 異常症)、脂質合成異常(Smith-Lemli-Opitz 症候群)、脂質トランスポーター異常(ATP 結合カセット輸送蛋白 A3(*ABCA3*) 遺伝子異常)などが知られており、脂質の合成や運搬に関連する先天異常症も発症要因となる(Chai, et al. 2017)。

ヒトでは 27-HC およびその代謝物である cholestenoic acid のおよそ 80%は肺マクロファージで産生され全身に供給される(Babiker et al. 1999)。27-HC は生体内ではコレステロール異化代謝の中間生成物であるほか、核内レセプターである liver X receptor(LXR)のリガンドとしても機能しており、細胞分化、炎症、アポトーシス、ステロイド産生を含む様々な生理学的プロセスに関与している。動物実験では、胎生中期から後期にかけてマクロファージが気管および肺泡構造に沿って豊富に存在するようになり、その形成に重要な役割を担っていることが報告されている(Jones, et al. 2013)。単球からマクロファージへの分化過程においてマクロファージにおける CYP27A1 活性が次第に上昇し、それに伴い 27-HC の産生量も増加する(Hansson, et al. 2002)。また、脂肪線維芽細胞は adipocyte differentiation related protein(ADRP)の発現を特徴とし、胎生中-後期から型肺泡細胞に近接して出現する。肺泡形成の成熟とともにその数は増加し、脂肪の合成と貯蔵、および型肺泡細胞への脂質供給を担っている(Rodriguez-Castillo, et al. 2018)。本動物モデルにおける肺形成不全発症のメカニズムとして、経胎盤的な 27-HC の供給低下により LXR を介したシグナル伝達が機能せず、脂肪線維芽細胞や肺泡型細胞の分化・成熟に影響を及ぼす可能性などが考えられるが、特定の脂質欠乏が肺発生や呼吸窮迫症候群の発症に関与するという報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

「問い:なぜ、血中 27-Hydroxycholesterol (27-HC)の低下により新生児呼吸窮迫症候群が起こるのか?」

申請者らは *Cyp27a1* ホモ欠損(-/-)母体マウスモデルを用いて、酸化コレステロールの一種である 27-Hydroxycholesterol (27-HC)の経胎盤的な供給が途絶えると、出生仔体のジェノタイプに関わらず重度の呼吸障害を呈し、生後 24 時間以内に死亡することを発見した(図 1)。胃液によるマイクロバブルテストの結果からサーファクタント欠乏症が疑われ、病理学的には肺形成不全を呈していた。これまでに特定の脂質欠乏が新生児呼吸窮迫症候群の原因となるという知見はない。本モデルを利用し「27-HC が肺発生に及ぼす影響を明らかにする」ことを目的として研究を行った。

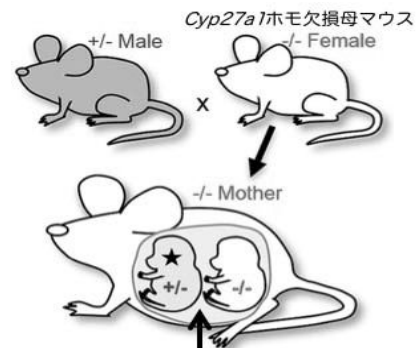


図1. *Cyp27a1*ホモ欠損母マウスはヘテロまたはホモ欠損仔体を出産するが、双方ともに肺低形成を認める。

3. 研究の方法

Phase 1: 肺低形成を示す仔体マウスの基礎データ集積とその病態解析

- (1) 電子顕微鏡を用い肺マクロファージ、型肺泡細胞、細胞小器官(lamellar body など)の観察を行う。肺組織以外(脳、肝臓、膵臓、腎臓)の形態学的評価を行う。
- (2) 免疫組織化学染色、Western Blotting または qPCR を用いて肺組織における pro-surfactant protein C(pro-SPC)、aquaporin5(AQP5)、ABCA3、FXR、LXR などの発現を検索する。
- (3) 質量分析計を用いて各臓器および血液中の胆汁酸および脂質組成とその分布を検討する。
- (4) フローサイトメトリーを用いて肺マクロファージ(CD45<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, MHC<sup>+</sup> cells)、脂肪線維芽細胞(LipidTOX<sup>+</sup> cells)の population 解析を行う。

Phase 2: レスキュー実験と新規候補遺伝子の検索

- (1) *Cyp27a1* ホモ欠損(-/-)母体マウスに 27-HC、LXR アゴニスト(GW3965)、胆汁酸、FXR アゴニスト(GW4064)などを投与し、経胎盤的な薬剤移行によるレスキュー実験を行う。
- (2) 胎児肺(E18.5)を用い三次元培養で肺オルガノイドを作成する(Zang et al. 2014)。胆汁酸と 27-HC 添加の有無が肺形成に及ぼす影響を形態学的(持続撮像による画像解析)、免疫組織学的に検討する。また、サンプルから total RNA を抽出し、胆汁酸や 27-HC 投与の有無で変化する遺伝子群を single cell レベルで解析する。

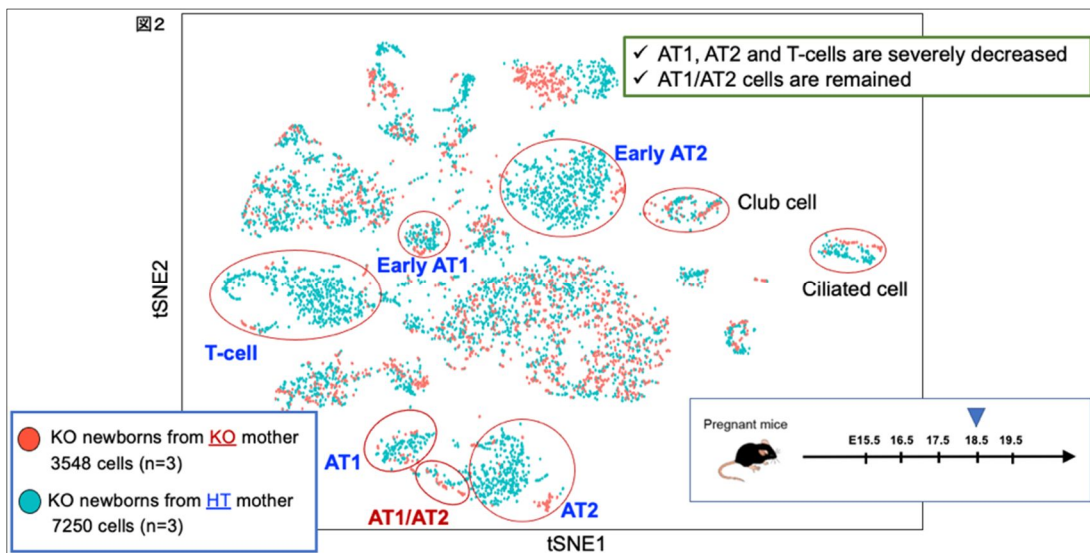
以上の実験系より、27-HC が肺形成不全および新生児呼吸窮迫症候群の原因となり得ることを証明する。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

4. 研究成果

27-Hydroxylase(CYP27A1)は胆汁酸合成に関わる酵素で、その欠損症ではケノデオキシコール酸やオキシステロールの一種である 27-Hydroxycholesterol (27-HC) の合成障害が生じ、コレスタノールや胆汁アルコールの過剰産生が起こる。Cyp27a1<sup>-/-</sup> 妊娠マウスから出生した仔体は、ジェノタイプに関わらず多呼吸や陥没呼吸などの新生児呼吸窮迫症候群に類似した症状を呈していた。仔体の生後 24 時間生存率は Cyp27a1<sup>-/-</sup> 35%、Cyp27a1<sup>+/-</sup> 70%であった。まず濾紙血を用いて胆汁酸分析を行った。Cyp27a1<sup>+/-</sup>母体から出生した Cyp27a1<sup>-/-</sup>仔体と Cyp27a1<sup>-/-</sup>母体から出生した Cyp27a1<sup>-/-</sup>仔体では、血中胆汁酸は低値であるのに対し、Cyp27a1<sup>+/-</sup>仔体では高値を示した。これは肝での胆汁酸生合成能を反映した結果と推測された。次に肺組織を採取し、病理・免疫組織学的検討、タンパク質を WB で解析した。Cyp27a1<sup>-/-</sup>妊娠マウスから生まれた仔体では、病理学的に肺胞の形成不全が確認された。免疫組織化学染色および WB では I 型肺胞細胞マーカーの aquaporin 5、II 型細胞マーカーの pro-surfactant protein C シグナルの低下を確認した。血中胆汁酸値は仔体のジェノタイプに一致していることから肺形成不全発症のメカニズムとして、経胎盤的なオキシステロールの供給不足、あるいは何らかの代謝産物の過給供が肺胞構成細胞の分化・成熟遅延に影響を及ぼしていると推測された。

Cholestenic acid またはその下流の代謝産物が肺胞細胞の分化に及ぼす影響を解析し、single cell レベルでの遺伝子解析を行うことで RDS が生じたメカニズムの解明を行った。発生後期(E18.5)では肺胞構成細胞である肺胞上皮 I 型細胞(ガス交換を担当)や II 型細胞(サーファクタント産生)が著減しており、サーファクタントの合成異常だけではなく、成熟肺胞上皮細胞の欠失が原因であると考えられた(図 2)。肺胞上皮細胞が消失した原因を探るために少し早い段階(E16.5)の胎児肺を解析したところ、アポトーシスを起こした細胞は増えておらず、むしろ死細胞は少なかった。一方で細胞周期を調べると、Cyp27a1 ホモ欠損母体由来胎仔では肺胞上皮(前駆)細胞で増殖期にいる細胞が有意に減少しており、細胞がそれ以上増殖・分化していないことが成熟肺胞上皮細胞欠失の原因であると考えられた。さらに遡って E14.5 の胎児肺のシングルセル RNA 解析を行ったところ、成熟肺胞上皮細胞を代表する遺伝子(Sftpc, Sftpb, Ager など)の RNA 発現は Cyp27a1 ホモ欠損母体由来胎仔で異常亢進していた。ところがタンパク質レベルでは Sftpc はむしろ減少しており、肺胞上皮の分化・成熟に必要な遺伝子がうまく翻訳されていない可能性が示唆された。Cyp27a1 ホモ欠損母体由来胎仔の肺胞上皮前駆細胞で発現が低い遺伝子がどういった分子経路に関連しているかを Gene set enrichment analysis(GSEA)により解析したところ、c-Myc によって制御される遺伝子群であることが判明した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木光幸、三原田賢一
2. 発表標題 Maternal oxysterol plays a critical role in fetal lung alveolarization
3. 学会等名 GLung Development, Injury and Repair, Gordon Research Seminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木光幸、三原田賢一
2. 発表標題 Maternal oxysterol plays a critical role in fetal lung development
3. 学会等名 9th European Network for Oxysterol Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野聡、鈴木光幸、三原田賢一
2. 発表標題 母体でのCyp27a1発現は胎児肺の発生に必須である
3. 学会等名 第42回胆汁酸研究会
4. 発表年 2021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	三原田 賢一  (Miharada Kenichi)  (40455366)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授    (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中野 聡  (Nakano Satoshi)  (70826453)	順天堂大学・医学部・非常勤助教    (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関