

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09101

研究課題名（和文）気管支軟骨・平滑筋に着目した先天性横隔膜ヘルニア低形成肺の病態解明と治療戦略

研究課題名（英文）The elucidation of the pathogenesis of lung hypoplasia with CDH, focusing on the abnormalities of the bronchial cartilage and smooth muscle

研究代表者

丹藤 創（Tando, So）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80423870

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）：先天性横隔膜ヘルニア(CDH)に伴う肺低形成の病態解明のため、ヒトCDH剖検肺の解析を行い、肺内気管支軟骨の異常を明らかにし、論文化した。次に、軟骨形成異常を示すニトロフェン誘発CDHラットE18胎仔気管を用い、bulkのRNA-seq解析を行い、CDH群において、有意な繊毛関連遺伝子群の発現低下を認めた。また、異常軟骨において、一次繊毛は短縮していた。さらに、E18胎仔気管を用いて、PIC法を行い、異常軟骨におけるMAPKAP1（SIN1）やpAKTの発現低下を見出した。CDHに伴う軟骨形成異常には、一次繊毛やmTOR2シグナリング経路が関与していると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性横隔膜ヘルニア(CDH)の重症度は、肺低形成の程度によって左右される。近年、救命率は向上しているが、依然として約20%の重症例は救命できていない。我々は、肺内気管支軟骨の異常が、CDHに伴う肺低形成の病態に深く関与していることを明らかにし、その病因として、一次繊毛の異常があることを示した。CDHの病態を繊毛の異常という観点からとらえなおすことは、新規治療法を考える上で、意義がある。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathogenesis of lung hypoplasia with Congenital diaphragmatic hernia (CDH), we analyzed autopsied lungs using morphological techniques to assess the bronchial cartilage and alveolar maturity. The results indicated that opposite directional cartilage abnormalities around the distal and more proximal bronchi support our hypothesis that abnormal development of bronchial cartilage might play an essential role in the hypoplastic lung in CDH. Next, we showed the abnormalities of the tracheal cartilage in the nitrofen-induced CDH rat and performed the bulk RNA-seq using the E18 trachea of the CDH rat. The data indicated the downregulation of the cilia-related genes. Histologically, the primary cilia lengths in the abnormal cartilage were shorter than those of the control. Moreover, we found the downregulation of MAPKAP1 and pAkt in the abnormal cartilage, suggesting that primary cilia and the mTOR2 might be related to the pathogenesis of the abnormal cartilage in CDH.

研究分野：Pathology

キーワード：CDH lung hypoplasia primary cilia

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア(CDH)は、胎児期に横隔膜欠損が生じ、胸腔内に腹腔内臓器が嵌入する疾患である。その重症度は肺低形成の程度に左右されており、CDHの最も重要な死因の一つである。CDHは新生児疾患の中でも救命率が低い疾患であったが、様々な治療法の開発により、その救命率は約80%にまで達している。しかし、依然として約20%の重度肺低形成症例は救命できていない。有効な胎児治療を含む新規治療法を開発することは救命率のさらなる改善のためには重要である。我々は、重症CDHの病理解剖症例において、気管支軟骨の異常を観察した。そこで、肺低形成における間葉系組織の異常に着目し、研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、CDH低形成肺の気道軟骨や平滑筋に着眼し、これら間葉系組織の異常が呼吸障害の一因になっているとの仮説を検証することである。重症例の剖検肺組織の解析により、ヒト気管支軟骨の異常を形態学的に明らかにする。さらに、CDHラットモデルを用い、気道軟骨形成異常を引き起こす分子メカニズムの解明を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト胎児剖検肺の組織学的定量解析

ヒトCDH剖検肺10症例、コントロール肺9症例を解析対象とし、組織学的定量解析を行った。最初に、肺泡未熟性を評価するため、radial alveolar count (RAC)、気管支軟骨胸膜間距離(CP distance)、免疫組織化学によるTTF-1やKi-67の定量を行った。さらに、肺内気管支軟骨に着目し、軟骨面積の定量解析を行った。

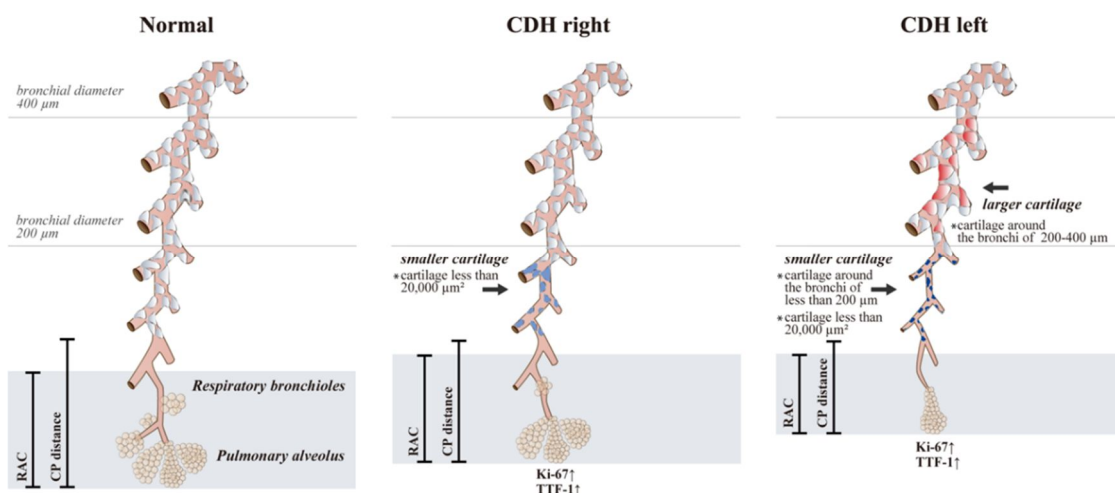
#### (2) ニトロフェン誘発CDHラットモデルを用いた異常軟骨の解析

気管支軟骨形成異常の病態メカニズム解明のため、CDHモデルとして広く用いられているニトロフェン誘発CDHラットモデルを作製した。妊娠SDラットE9にニトロフェン100mgを経口投与し、E16, E17, E18, E21胎仔を取り出した。げっ歯類では、肺内気管支軟骨が欠如しているため、ヒト気管支軟骨に組織学的に対応する胎仔気管軟骨に焦点を当て、網羅的遺伝子解析(bulk RNA-seqやPIC法)および組織学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト胎児剖検肺の組織学的定量解析

肺泡未熟性を評価するため、radial alveolar count (RAC)、気管支軟骨胸膜間距離 (CP distance)、免疫組織化学によるTTF-1やKi-67の定量を行い、CDH肺におけるRACやCP distanceの減少、TTF-1、Ki-67の発現上昇を明らかにした。次に、肺内気管支軟骨の画像解析を行い、 $20,000\mu\text{m}^2$ 以下の平均軟骨面積は、CDH患側肺(CDH left)で有意に減少し、非患側肺(CDH right)においても減少傾向を示した。また、径 $200\mu\text{m}$ 以下の気管支周囲平均軟骨面積も患側肺(CDH left)において減少傾向を示した。それに対し、径 $200-400\mu\text{m}$ の気管支径に対する気管支周囲総軟骨面積の比は患側肺(CDH left)において高い傾向を示した。さらに、この比は、肺成熟の形態学的指標であるRACと負の相関を示した。即ち、ヒトCDH低形成肺における気管支軟骨形成異常が明らかとなった(下図)。

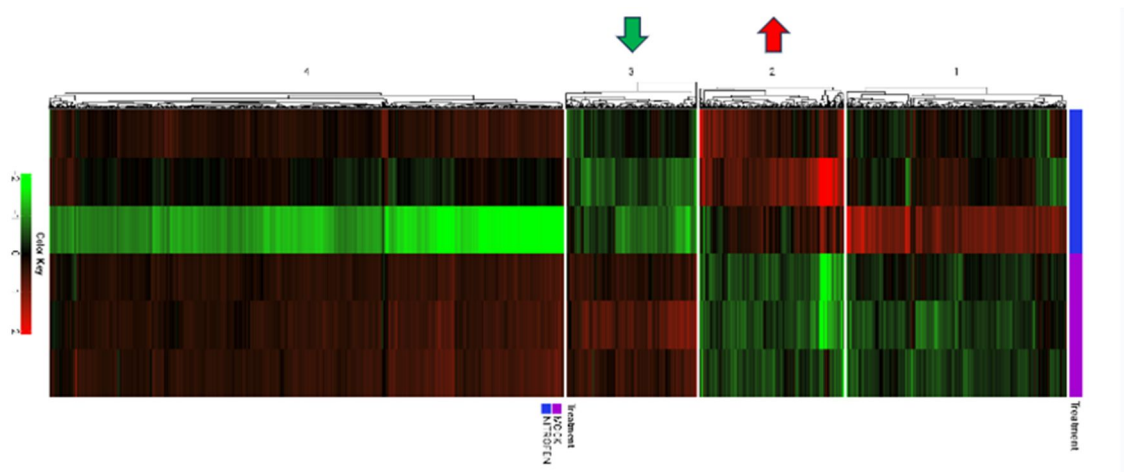


これらの結果は、肺内気管支軟骨の発達していないげっ歯類のCDHモデルでは得られない知見であり、ヒトCDH肺低形成の病態を考える上で重要と考える。

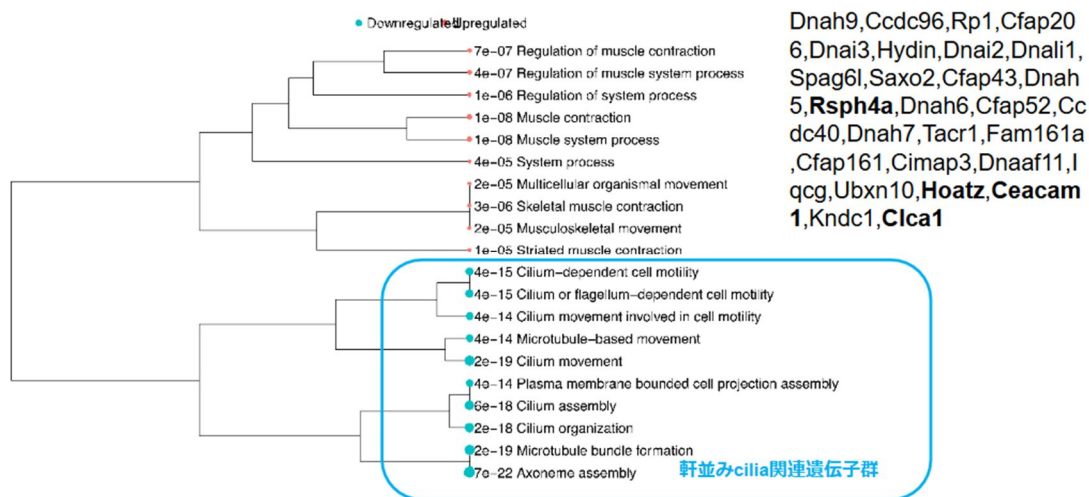
#### (2) ニトロフェン誘発CDHラットモデルを用いた異常軟骨の解析

先天性横隔膜ヘルニア(CDH)に伴う気管支軟骨形成異常の病態メカニズム解明のため、ニトロフェン誘発CDHラットモデルを用い、E17, E18, E21ラット胎仔気管における軟骨形成異常(ヒトの病態に対応する小型および大型異常軟骨の出現)を見出した。次に、気管軟骨の異常が明らかになったE18胎仔気管を用いて、bulkのRNA-seqを行った。E18胎仔3個体由来気管をプールし(ニト

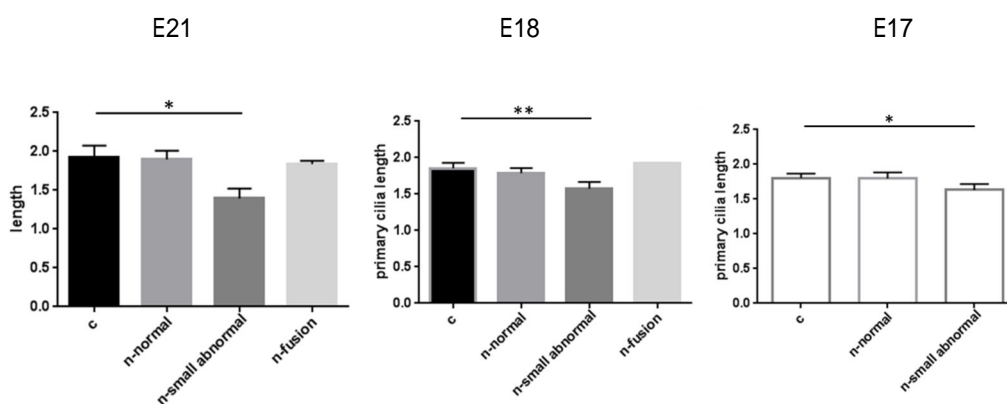
ロフェン投与群・mock群 各々 3プール)、total RNAを抽出し、strand-specific mRNA-seq (阪大微研・ゲノム解析室)を行った。in silico 解析では、Ensemble/Referece Transcriptsを参照に、DEGsの抽出(2群比較)、WGCNA解析、Cluster解析、Enrichment解析を行った。Top 20000遺伝子のk-Means clusteringで4つのclusterに分類され、発現上昇を示す遺伝子群と発現低下を示す遺伝子群を認めた(下図)。



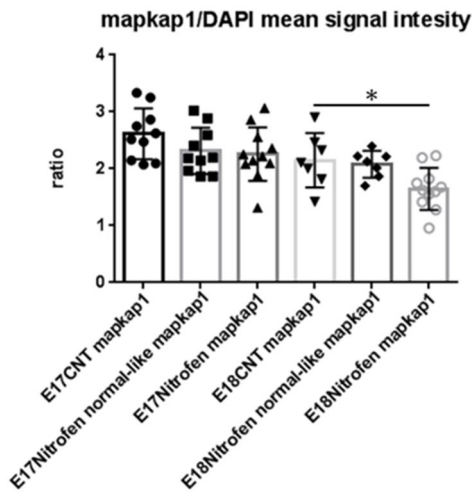
PCA (主成分解析)では、第1主成分だけでデータの全情報量のうち、約75%を説明できた。DEGs (Differentially Expressed Genes)の抽出では、発現上昇を示す157遺伝子と発現低下を示す80遺伝子が認められた。発現上昇を示す遺伝子群は muscle contraction に関する遺伝子、発現低下を示す遺伝子群は、軒並み cilia 関連の遺伝子であった(下図)。



そこで、発生期気管軟骨の一次繊毛に着目した。E17, E18, E21のニトロフェン投与胎仔気管異常小軟骨における一次繊毛の長さは、有意に短縮していた。しかし、ニトロフェン投与群においても、形態的に正常に見える軟骨においては、一次繊毛の長さは著変なかった。癒合状の大きな軟骨においても一次繊毛の長さには有意な差はなかった(下図、軟骨細胞の一次繊毛の長さ(c: control, n-normal: ニトロフェン投与群で正常の形態を示す軟骨, n-small abnormal: ニトロフェン投与群で小さな異常軟骨, n-fusion: 異常な大きな軟骨、\* p<0.05、\*\* p<0.01))



次に、E18 胎仔気管を用いて、PIC (Photo-Isolation Chemistry)法を行い、UV 照射した小型異常軟骨部位特異的に発現変動する遺伝子の網羅的解析を行い、mTORC2 サブユニットである MAPKAP1 (SIN1) に着目した。E18 胎仔気管軟骨の免疫染色において、MAPKAP1 の発現低下 (左



図、CNT: コントロール、Nitrofen: ニトロフェン投与群、Nitrofen normal-like: ニトロフェン投与群で正常にみえる軟骨、\*  $p < 0.05$ ), シグナルの最大粒子径、平均粒子径の減少を認めた。さらに、蛍光免疫染色において、E18 胎仔気管異常軟骨の Phospho-Akt (Ser473) (pAkt)シグナルの有意な低下を認めた。一次繊毛の短縮と mTOR2/pAkt シグナル伝達系の関連が示唆される結果であった。

以上の結果から、CDH に伴う気道軟骨形成異常には、気管発達期における軟骨一次繊毛の異常が関与していることが示唆された。一次繊毛の異常と mTOR2/pAkt シグナルとの関係性については、現在、さらなる解析を進めている。また、これまで CDH に一次繊毛が関与するとの報告はなく、障害される低形成肺の実質や横隔膜等、一次繊毛の異常が他の臓器にも及んでいるのかどうかは興味深い点である。

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 0件）

1. 著者名 So Tando, Kohei Sakai, Shohei Takayama, Kenji Fukunaga, Mayumi Higashi, Shigehisa Fumino, Shigeyoshi Aoi, Taizo Furukawa, Tatsuro Tajiri, Hiroshi Ogi, Kyoko Itoh	4. 巻 -
2. 論文標題 Maldevelopment of intrapulmonary bronchial cartilage in congenital diaphragmatic hernia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric pulmonology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------