

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07796

研究課題名（和文）新生児気管支肺異形成症を対象とした生体組織再生誘導医薬開発

研究課題名（英文）Regeneration-inducing medicine for Bronchopulmonary dysplasia

研究代表者

遠藤 誠之（Endo, Masayuki）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30644794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではBPDモデル新生仔動物に対して、ペプチド医薬であるHMGB1ペプチドの効果を検討した。我々は肺損傷がHMGB1ペプチドにより改善されることを示した。さらに、タンパク質レベルでは炎症性サイトカイン（IL-1、IL-6）の産生が減少し、肺の可溶性コラーゲンの減少を示した。シングルセルRNA-seqを用いた解析では、マクロファージ、好中球、単球などの炎症細胞の誘導が抑制されることを認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期医療の発展に伴い、より未熟な児が生存できるようになった。しかしながら、早産児の主な死亡原因である気管支肺異形成症は根治療法がなく、幹細胞治療がその予防や治療法と有効であることが報告されているが、細胞供給の不安定さなど課題も多い。今回の我々の研究では、自己骨髄由来間葉系幹細胞を障害組織へ誘導することで組織修復を行うペプチド医薬（HMGB1ペプチド）をBPDモデル新生仔動物に投与し、抗炎症効果と抗線維化効果を示した。これは気管支肺異形成症に対する新規治療薬になり得ると考える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to examine the effect of the HMGB1 peptide on Bronchopulmonary dysplasia (BPD)-related lung injury in a mouse model. We showed that the systemic administration of HMGB1 peptide ameliorated BPD-related lung injury in a mouse model. In addition, HMGB1 peptide reduced the production of inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and decreased soluble collagen in the lungs at the protein level. Single-cell RNA-seq analysis showed that HMGB1 peptide treatment suppressed the production of inflammatory cells, including macrophages, neutrophils, and monocytes.

研究分野：産科学婦人科学

キーワード：気管支肺異形成症 治療 幹細胞 再生誘導

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児治療の向上により、早産児の生存率は著しく向上した。しかしその一方で、早産児に対しての人工呼吸器や酸素治療によって生じる慢性呼吸疾患の気管支肺異形成症 (BPD: bronchopulmonary dysplasia) はいまだ早産児の死亡の主要な原因である。

(2) BPD に対しては根治療法がなく、現在間葉系幹細胞を用いた幹細胞治療が BPD の予防や治療法の一つとして、研究が進められているが、間葉系幹細胞の大規模な生産・輸送が困難であるといった問題点も指摘されている。

(3) 我々は HMGB1 蛋白の A box が骨髄由来の間葉系幹細胞を刺激し、これらを血中動員することで障害皮膚を修復することを世界で初めて発見した。さらに、この HMGB1 蛋白の A box のみからなる再生誘導医薬である HMGB1 ペプチドを作製した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BPD モデル新生仔動物に対して HMGB1 ペプチドを用いた幹細胞治療の効果を証明し、本邦での臨床試験へつなげることである。

3. 研究の方法

(1) BPD モデル動物の作製

新生仔 BPD モデルは C57BL6 マウスを 90%高濃度酸素に 14 日間曝露することで、作製した。新生仔 BPD モデルに生理食塩水を静脈投与した群 (O2+NS)、HMGB1 ペプチドを静脈投与した群 (O2+HMGB1)、室内気で飼育して生理食塩水を静脈投与した群 (RA+NS) の 3 群に割り付けた。

(2) HMGB1 ペプチドまたは生理食塩水の全身投与

HMGB1 ペプチドは、全身投与前に 1mg/mL の濃度になるように蒸留水に溶解した。HMGB1 ペプチドまたは生理食塩水 (それぞれ 5mL/kg/日) を、イソフルラン麻酔下で生後 4、8、12 日目に静脈投与した。生後 14 日目にイソフルラン吸入麻酔により sacrifice を行い、評価を行った。

(3) 肺の形態計測解析

肺を 4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した後、パラフィンに包埋した。厚さ 5 μ m のパラフィン包埋切片を HE 染色し、平均線形切片 (MLI: Mean Linear Intercept) と放射状肺胞数 (RAC: Radial alveolar count) を測定した。

(4) Enzyme-linked immuno-sorbent assay

凍結した右肺サンプルを RIPA 緩衝液でホモジナイズし、遠心分離し蛋白を抽出した。上清蛋白質含有量は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。炎症性サイトカイン IL-1、IL-6 は R&D Mouse Quantikine ELISA キット (R&D Systems) を使用して測定した。

(5) 可溶性コラーゲンの測定

凍結肺をペプシンと酢酸を用いてホモジナイズし、遠心分離し蛋白を抽出した。可溶性コラーゲンは可溶性コラーゲン Assay Kit (QuickZyme Bioscience) を用いて測定した。

(6) Single-cell RNA sequencing

生後 14 日目に各グループから 2 匹のマウスの肺を採取し、Single-cell RNA sequencing を実施した。

4. 研究成果

(1) 生存率と体重増加

生存率においては、RA+NS では生存率 100%、O2+NS は生存率 75%だったのに対して、O2+HMGB1 では生存率 89.3%と改善傾向にはあったが、BPD モデル群との間に統計学的に有意差は認めなかった (Fig 1)。体重増加においては、O2+NS が RA+NS と比較して、有意に体重が低下し、O2+HMGB1 では、O2+NS と比較して、有意に体重が増加した (Fig 2)。

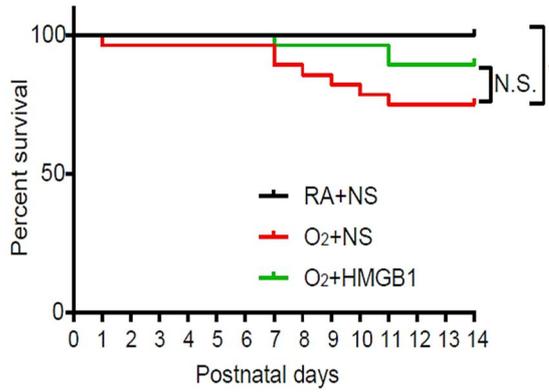


Figure 1 生存率

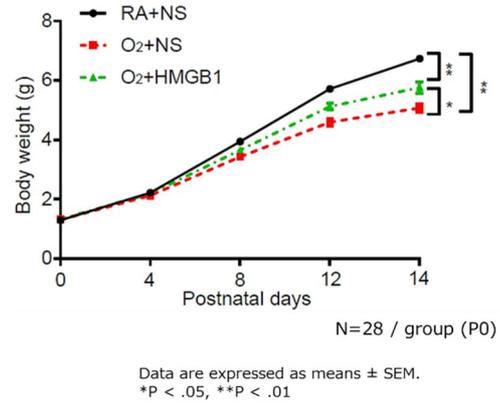


Figure 2 体重増加の推移

(2) 肺胞形態評価

HE 染色では、RA+NS は細かい肺胞を認めるのに対して、O2+NS では肺胞径は拡大し、O2+HMGB1 では細かい肺胞も散見された(Fig 3)。O2+NS は、RA+NS と比較し、MLI は有意に増加し、RAC は有意に減少した。一方、O2+HMGB1 では、O2+NS と比較して、MLI は有意に低下し、RAC は有意に増加し、形態改善を示す結果となった(Fig 4)。

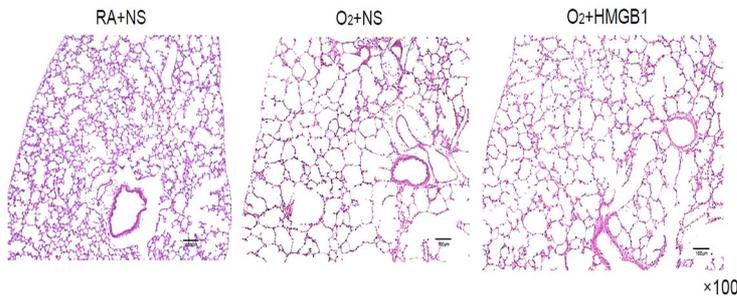


Figure 3 HE 染色

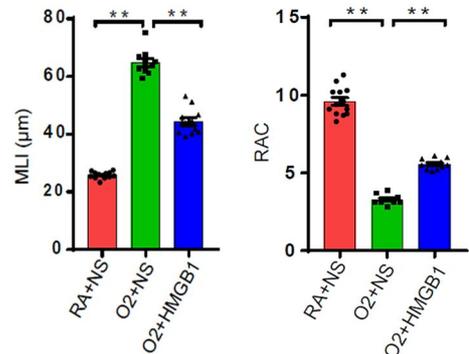


Figure 4 MLI、RAC

(3) 肺組織の炎症評価

IL-1、IL-6 とともに O2+NS は RA+NS と比較して有意にその値が上昇したが、O2+HMGB1 では、O2+NS と比較して有意に低下した(Fig 5)。

(4) 肺組織の線維化評価

可溶性コラーゲンは、O2+NS は RA+NS と比較して有意にその値が上昇したが、O2+HMGB1 では、O2+NS と比較して有意に低下した(Fig 6)。

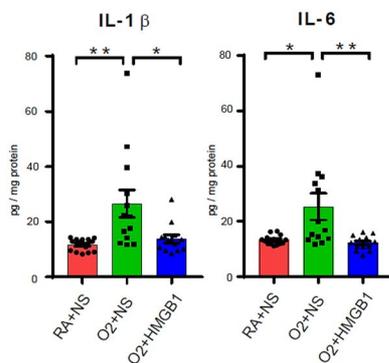


Figure 5 IL-1、IL-6

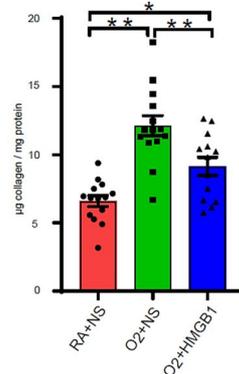


Figure 6 可溶性コラーゲン

(5) Single-cell RNA sequencing

マーカー遺伝子を用いて15個のクラスターに分類した(Fig 7)。Cell population 分析では、O2+NS は RA+NS と比較して、好中球、単球、マクロファージを含む炎症細胞の数が増加した。O2+HMGB1 では O2+NS と比較してこれらの細胞は減少した(Fig 8)。

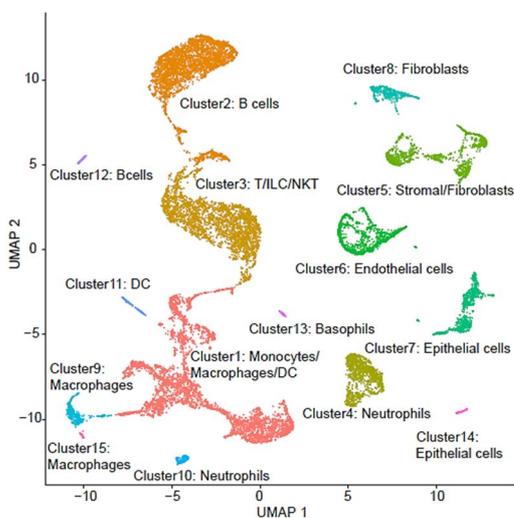


Figure 7 UMAP

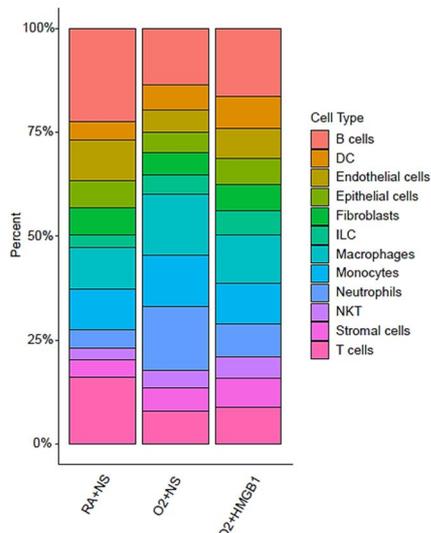


Figure 8 Cell population 分析

HMGB1 ペプチドがどの細胞の遺伝子発現に影響を与えているのかを検討するために、発現変動遺伝子 DEG を調べたところ、マクロファージクラスターで多くの DEG を認めた(Fig 9)。さらにマクロファージクラスターでの Gene Ontology 解析を実施すると、BPD に関連する IL-1 signaling pathway に enrich していることがわかった(Fig 10)。

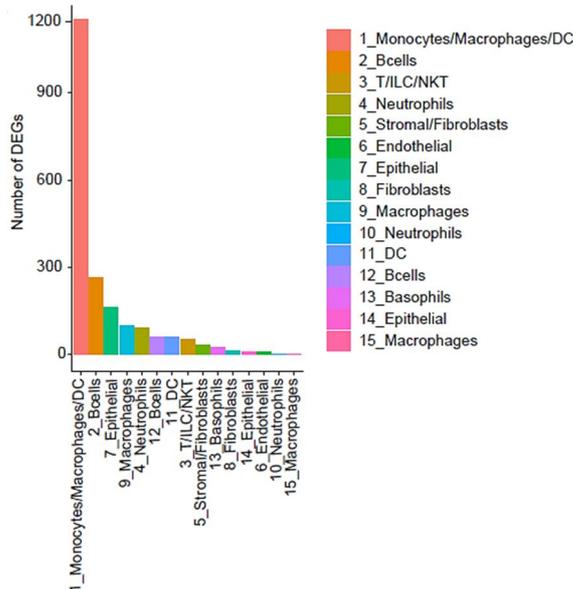


Figure 9 発現変動遺伝子の数

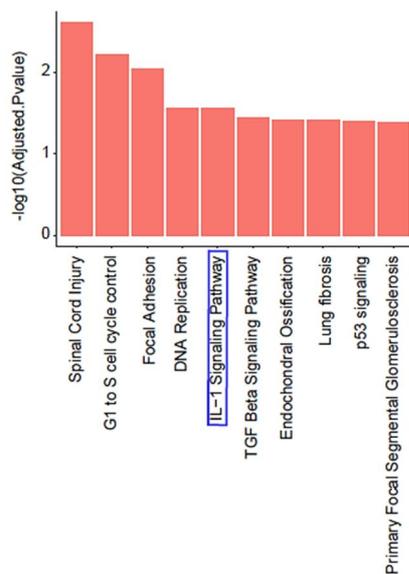


Figure 10 マクロファージクラスターの Gene Ontology 解析

HMGB1 ペプチドが抗線維化作用に関与する遺伝子を同定するために、線維芽細胞クラスターに注目した。その中でも線維化に関与する筋線維芽細胞を同定するため、Acta2 の発現をみたところ、サブクラスター3 で高発現していることがわかった(Fig 11)。このサブクラスター3 で Gene Ontology 解析を行ったところ、肺線維化に関連する遺伝子発現パターンに enrich していることがわかった。肺線維化に関連する遺伝子の中で、Sox9 の遺伝子発現が O2+NS と比較して、O2+HMGB1 で発現低下していた(Fig 12)。

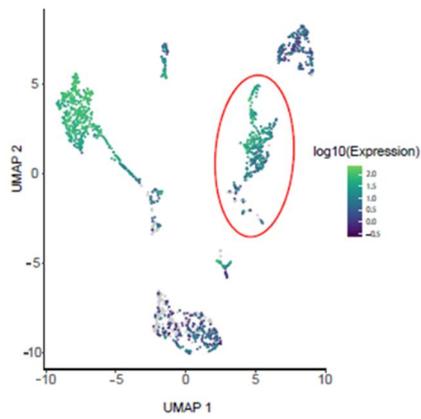


Figure 11 線維芽細胞クラスターでの Acta2 発現遺伝子細胞

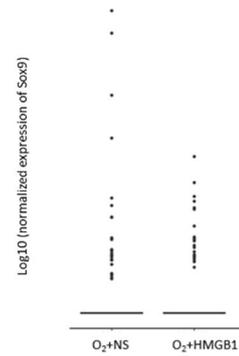


Figure 12 線維芽細胞のサブクラスター3 における Sox9 発現細胞の比較

今回の研究では、HMGB1 ペプチドの治療効果は確認できたが、障害肺への炎症細胞の誘導を抑制し、IL-1 や IL-6 の産生を抑制する機序や Sox9 遺伝子の発現を抑制、可溶性コラーゲンの産生を抑制する機序は解明できなかったため、これらのメカニズムの解明が検討課題である。また、本研究では、MSC の障害肺における集積は確認できなかったため、骨髄由来の MSC の誘導の証明が今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Maki Shintaro, Tanaka Hiroaki, Takakura Sho, Nii Masafumi, Tanaka Kayo, Endo Masayuki, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Tadalafil treatment for fetuses with early-onset growth restriction: a protocol for a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind phase II trial (TADAFER IIb)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e054925 ~ e054925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2021-054925	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 -
1. 著者名 Kakigano Aiko, Matsuzaki Shinya, Mimura Kazuya, Endo Masayuki, Osuga Keigo, Kimura Tadashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Successful management of a pregnant woman of lower limb arteriovenous malformation with chronic cardiac failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 1033 ~ 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15171	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 -
1. 著者名 Konishi Akiko, Samura Osamu, Muromoto Jin, Okamoto Yoko, Endo Masayuki, et al.	4. 巻 67
2. 論文標題 Prevalence of common aneuploidy in twin pregnancies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 261 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-01001-0	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 -
1. 著者名 Iwai Sayuri, Mimura Kazuya, Endo Masayuki, Kawanishi Yoko, Miyake Tatsuya, Hiramatsu Kosuke, Kimura Toshihiro, Tomimatsu Takuji, Kimura Tadashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Outcome of Inducing Labor in Pregnancies with Suspected Fetal Growth Restriction: Oxytocin Discontinuation during the Active Phase of Labor versus Conventional Management	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Perinatology	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) 10.1055/a-1933-7340	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 -

1. 著者名 Deguchi Koichi, Tazuke Yuko, Watanabe Miho, Toyama Chiyoshi, Nomura Motonari, Saka Ryuta, Harada Hiromi, Nagamine Yukie, Endo Masayuki, Puh Ritsuko, Okuyama Hiroomi	4. 巻 17
2. 論文標題 Prenatally diagnosed accessory scrotum: A case report and review of the literature on prenatal features	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiology Case Reports	6. 最初と最後の頁 881 ~ 885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radcr.2021.12.033	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 -

1. 著者名 Masahata Kazunori, Yamoto Masaya, Umeda Satoshi, Nagata Kouji, Endo Masayuki, et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Prenatal predictors of mortality in fetuses with congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1745 ~ 1757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-022-05232-w	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 -

1. 著者名 Hara T, Shimbo T, Masuda T, Kitayama T, Fujii M, Hanawa M, Yokota K, Endo M, Tomimatsu T, Kimura T, Tamai K.	4. 巻 671
2. 論文標題 High-mobility group box-1 peptide ameliorates bronchopulmonary dysplasia by suppressing inflammation and fibrosis in a mouse model.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 357 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.06.032.	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 -

1. 著者名 Mimura K, Endo M, Kawanishi Y, Kanagawa T, Nagata K, Terui K, Fujii M, Shiraishi M, Yamoto M, Ito M, Itakura A, Okuyama H, Usui N; Japanese Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group.	4. 巻 43
2. 論文標題 Neonatal outcomes of congenital diaphragmatic hernia in full term versus early term deliveries: A systematic review and meta-analysis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Prenat Diagn.	6. 最初と最後の頁 993 ~ 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pd.6365.	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6件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 遠藤誠之
2. 発表標題 出産の痛みを科学する「陣痛はなぜ痛いのか」
3. 学会等名 第38回日本分娩研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤誠之
2. 発表標題 日本における脊髄髄膜瘤の胎児治療のこれから
3. 学会等名 第19回日本胎児治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤誠之
2. 発表標題 「胎児治療の今」日本における胎児治療の現状
3. 学会等名 第29回日本胎児心臓病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Endo M.
2. 発表標題 Fetal surgery for Spina Bifida-The Japanese experience.
3. 学会等名 9th Asia Pacific Conference Fetal Therapy (APCFT)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠藤誠之
2. 発表標題 シンポジウム 胎児治療とその麻酔「胎児治療の現状と展望、そして麻酔科医に求めるもの」
3. 学会等名 日本小児麻酔学会第28回大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 遠藤誠之
2. 発表標題 シンポジウム1「MMC」
3. 学会等名 第20回日本胎児治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 川瀧 元良、遠藤 誠之、他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 172
3. 書名 食道閉鎖のすべて	

1. 著者名 遠藤 誠之	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカ出版	5. 総ページ数 256
3. 書名 周産期のガイドライン深掘りドリル200問	

1. 著者名 川瀧 元良, 遠藤誠之 他	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 172
3. 書名 食道閉鎖のすべて	

〔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	藤井 誠 (Fujii Makoto) (10803760)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤) (14401)	
研究分担者	玉井 克人 (Tamai Katsuto) (20236730)	大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授 (14401)	
研究分担者	新保 敬史 (Shimbo Takashi) (70780609)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教授(常勤) (14401)	

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