

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462769

研究課題名(和文) エリスロポエチンの先天性横隔膜ヘルニアにおける肺高血圧への有用性の検討

研究課題名(英文) The effectiveness of erythropoietin for the pulmonary hypertension with the congenital diaphragmatic hernia patients

研究代表者

高安 肇 (Takayasu, Hajime)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10359614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：先天性横隔膜ヘルニアの肺高血圧及び肺低形成の病態解明の手段としてナイトロフェン誘導のRatモデルを用いた。モデル肺血管内皮においてRhoAの高発現を認め、Rhoキナーゼ経路の肺高血圧の病態への関与とRhoキナーゼ阻害剤の有用性が示唆された。またモデル肝臓、腎臓においてエリスロポエチンの産生抑制を認め、エリスロポエチン経路の肺高血圧の病態への関与とエリスロポエチンの有用性が示唆された。Rhoキナーゼ阻害剤もエリスロポエチンもすでに臨床実用されている薬剤であり、横隔膜ヘルニア患者への臨床応用の可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our results using nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia (CDH) provide evidence that the RhoA/Rho-kinase-mediated pathway is involved in the pathogenesis of PH in the nitrofen-induced CDH rat model. Our data also suggest that the fasudil, a Rho-kinase inhibitor, could represent a therapeutic option for the treatment of PH in CDH. We also found the suppressed EPO synthesis in the CDH fetus, which may contribute to the pathogenesis of lung hypoplasia and modification of pulmonary vasculature in the CDH rat model.

研究分野：小児外科

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア ラットモデル 肺高血圧 RhoA エリスロポエチン

1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア(CDH)は依然として小児外科医や新生児科医にとって最も治療困難な疾患の一つである(Sluiser I ら, Fetal Neonatal Med. 2011. Okuyama H, Takayasu H ら, Pediatr Surg Int. 2011)。また、厚生労働省による難病対策の対象にも定められている(難治性疾患研究班情報: 研究奨励分野)。CDHの外科治療は主に横隔膜の欠損孔を縫い閉じることであり、それほど困難な手技ではないが、CDHの患児の多くは肺低形成と肺高血圧を有しており、その重症度は肺低形成と肺高血圧の程度に左右される。また、生存例における生活の質も肺低形成と肺高血圧の程度に左右されることも明らかとなった(Sluiser I ら, Fetal Neonatal Med. 2011. Okuyama H, Takayasu H ら, Pediatr Surg Int. 2011)。

特に最近10年間は、高頻度人工換気、一酸化窒素吸入療法などに加え、低形成肺の圧損傷を最小限とする gentle ventilation(GV)という概念の導入により、生存率が向上した。さらに、多くのCDH症例は出生前に正確な診断が可能となった。しかしながら重症例における死亡率や重篤な合併症の発生率は依然として高い(Sluiser I ら, Fetal Neonatal Med. 2011. Okuyama H, Takayasu H ら, Pediatr Surg Int. 2011)。米国で開始された胎児治療(胎児気管閉塞)についても米国ではメリットを見いだせず中断したままである(Harrison MR ら, N Engl J Med. 2003)。胎児気管閉塞はヨーロッパにおいて一定の効果が認められている(Deprest J ら, J Pediatr Surg. 2012)。

本邦においてもCDH出生前診断例の診療成績や出生前予後因子に関する**初の大規模多施設臨床調査**が行われ、**申請者も分担研究者として参加した**。その結果、90日生存率は78.6%と欧米に遜えない好成績を認めた。一方で合併症のない退院率は63.2%であり、合併症なき退院を目指すには乗り越えるべき課題が多いと考えられた。また、出生前に評価の出来る様々な予後因子の有用性が確認され、**胎児治療や出生後の治療の戦略に有用であることが示唆された**(文献は申請者研究業績参照)。

以上より、**胎児期に重症例を選別できるようになった現在こそ、重症例胎児に対する外科的治療のみならず内科的治療(母胎への投薬)の検討が重要であり、出生後の治療にもさらなる発展が必要である**と考えられた。

妊娠ラットやマウスにナイトロフェンを投与すると胎児の60%にCDHが生じることが知られている。同時に、このモデル(CDHモデル)は肺低形成や肺高血圧をも再現し、肺低形成や肺高血圧の病態を解明するためのモデルとして利用されてきた。申請者は、**同**

モデルの低形成肺にて障害されている肺の成熟や機能のパラメーターを明らかにしてきた(文献は申請者研究業績参照)。本研究では肺高血圧の病態を明らかにし、**有効なパラメーターを見出す**。さらに、**母胎や新生児ラットへの薬剤投与によるパラメーターの動きを検討することにより、CDH治療の可能性を探る**。

2. 研究の目的

先天性横隔膜ヘルニアにおける肺高血圧、肺低形成のメカニズムを解明し新しい治療法(特に胎児治療)の開発を目的とする。母胎にナイトロフェンを投与することにより作成されるラットの横隔膜ヘルニアモデルを用いて肺高血圧の病態を解明する。さらに、その結果を利用しエリスロポエチンを含む薬剤の肺高血圧への効果を評価し、治療の発展を目指す。

3. 研究の方法

- 1) ナイトロフェンCDHモデル(CDHモデル)を確立する
- 2) CDHモデルにおける肺胞、肺血管の形態異常、各種血管作動物質の発現異常を検討する。特にエリスロポエチン(Epo)やRhoキナーゼが関連するカスケードの異常を検討する。
- 3) CDHモデルにおいてEpoを生後に、Rhoキナーゼ阻害剤を母胎へ投与し、その効果を検討する。また各薬剤を組み合わせる投与し、上記の異常への影響を検討する。各薬剤の投与至適量、もっとも効果の得られる投与時期について検討を行う。
- 4) CDHモデルを確立する。SDラットの妊娠を確認し、妊娠9あるいは10日目に母胎にナイトロフェンを投与し、CDHモデルを作成する。最も効率良くCDHが作成される条件を検討する。
- 5) CDHモデルにおける肺血管の形態異常をSMA免疫染色などにより気道や血管の平滑筋の異常を含めて検討する。
- 6) CDHモデルの胎児の肝臓においてEpoが十分に産生されているか検討する(血中濃度の測定)。
- 7) CDHモデルの肝臓や腎臓におけるHIFの発現、腎臓におけるGATA familyの発現を検討する(Real Time RT-PCR、免疫染色)。
- 8) エリスロポエチン(Epo)の作用の影響を受け、肺血管のリモデリングに関わるHemo Oxygenase 1の活性化、VEGFやVEGF受容体の発現、肺高血圧の指標となる右室のmyosin-heavy chainの / の発現を検討する(Real Time RT-PCR、免疫染

- 色)。
- 9) CDHモデルにおける Rho キナーゼのカスケードの異常 (IL-6, PAI-1, TGF- β , eNOS などの発現) を検討する。
 - 10) また、エンドセリン、レニン・アンギオテンシン系の異常についても、過去の報告の再現性の検討を含めて免疫染色と Real Time RT-PCR を主体に発現量を検討する。
 - 11) 上記により、薬剤の投与の効果を評価するにあたり、適切なパラメーターと、その評価方法を決定する。

4. 研究成果

まず、ナイトロフェン投与による横隔膜ヘルニアモデルの作成にとりかかった。2013年8月頃から順調にモデルが作成できるようになり、予定通り妊娠17日目、19日目、21日目の胎児から肺、心臓、肝臓、腎臓、横隔膜を冷凍切片用、核酸抽出用に採取した。

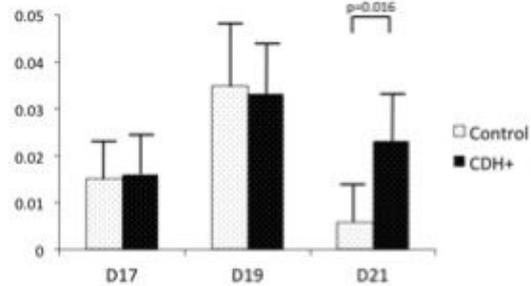
まず、Wnt Family の発現量を調べたところ、Wnt4 のラット胎児肺における発現量は経時的に上昇しており、胎生後期の肺の成熟への Wnt4 の関連が示唆された。また、Wnt4 の発現は胎生21日目において CDH 群で有意に低下しており、Wnt4 の発現量が低下するメカニズムが CDH の病態に何らかの形で関与している可能性が示唆された (学会発表1)。

また、他の肺高血圧モデルで示されている GSK3beta の mRNA レベルの発現亢進やベータカテニンの核への移行と蓄積は認めなかった。

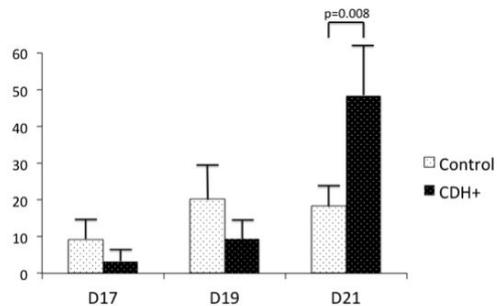
ついで Rho Kinase 関連が横隔膜ヘルニア (CDH) における肺高血圧に関わっているか否かを評価した。RT-PCR にて Rho-A と、その上流に位置する Wnt11 のモデル肺における高発現を認めた (図1)。さらに、その結果は免疫染色に手も確認された。肺の血管における RhoA の発現を正確に評価するために vWF と RhoA の共染色を行い、モデル肺の血管、とくに末梢の血管における RhoA の高発現を認め (図2) RT-PCR の結果と矛盾しなかった。以上より Rho Kinase Pathway の CDH 肺高血圧への関与が示唆され、Rho Kinase 阻害剤の治療への応用の可能性が示唆された。

RhoA Pathway の系で有意な結果を得た。RhoA 及び、その上流遺伝子である Wnt11 の発現が胎生21日目において、CDH モデル肺で高発現していることが確認され、RhoA 経路の CDH における肺高血圧への関与と Rho キナーゼ阻害剤の CDH における肺高血圧への治療の有用性が示唆された (論文1、学会発表2)。

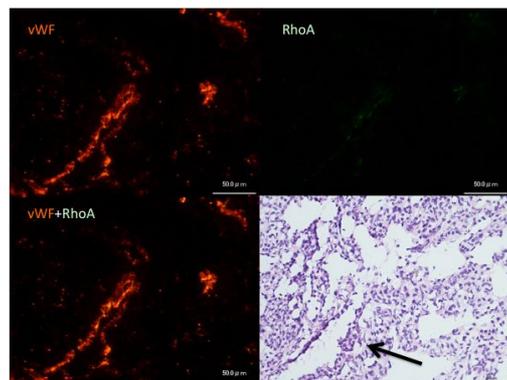
mRNA Expression Level of Wnt11



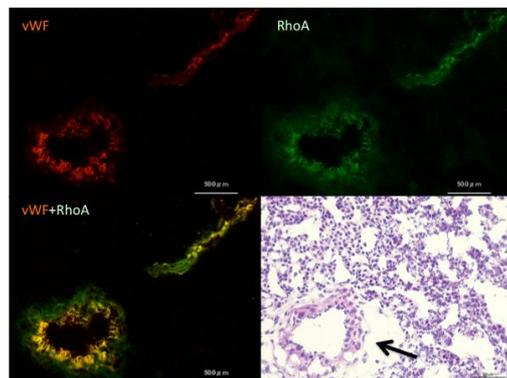
mRNA Expression Level of RhoA



(図1)

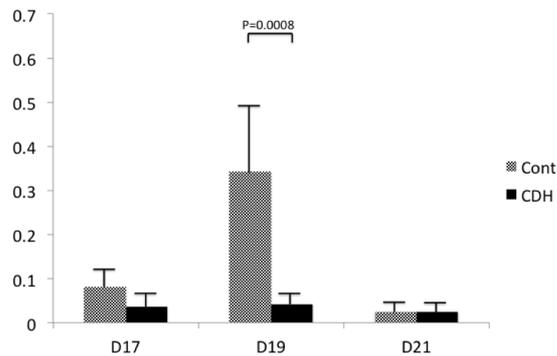


RhoA の肺血管における発現 (緑色)
コントロールラット (図2a)

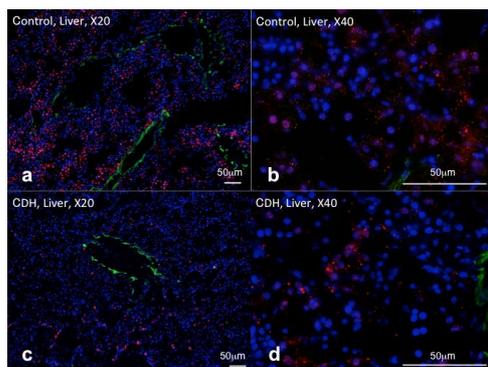


RhoA の肺血管における発現 (緑色)
CDH ラット (図2b)

ついで、胎生 19 日目において、ラット胎児は肝臓におけるエリスロポエチン産生のピークを迎え、過去の知見に矛盾しない結果であった。同時に CDH モデル肝臓でエリスロポエチンの産生が抑制されていることを認めた。さらに同時期の肝臓におけるエリスロポエチン受容体の発現が低下していることも認めた(図3、学会発表3)。また、胎生 21 日に目において腎臓におけるエリスロポエチンの産生はピークを迎え、造血システムの変化の一つとしてエリスロポエチン産生の場合が肝臓から腎臓に移行する、という知見に矛盾しない結果であった。また、CDH モデル腎臓でエリスロポエチンの産生が抑制されていることを認めた(図4、学会発表4)。一方で肺におけるエリスロポエチン受容体の発現はコントロール群と CDH 群に差がなく、エリスロポエチンを補充すれば、肺の低形成や肺高血圧の進行を阻止できる可能性が示唆された(図5、学会発表4)。

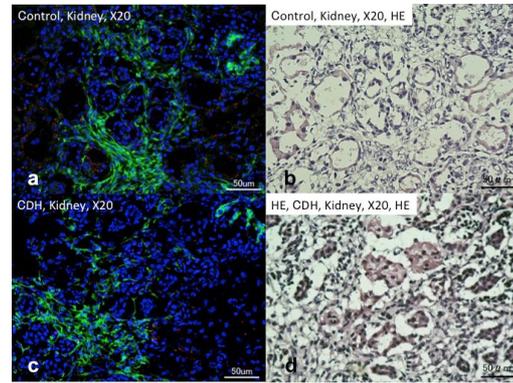
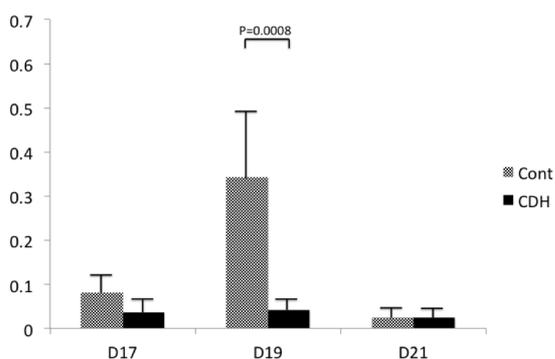


(図3a) エリスロポエチンの発現：肝臓、mRNA



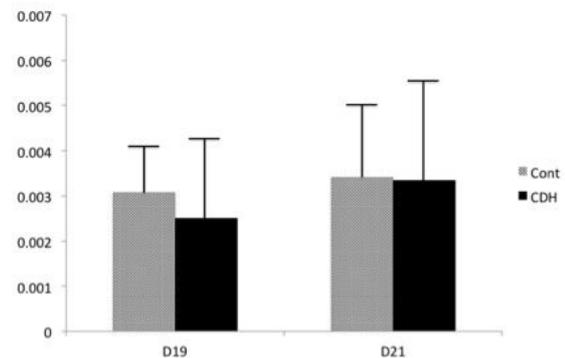
(図3b) エリスロポエチンの発現(赤)：肝臓

a,b: コントロールラット
c,d: CDH ラット



(図4) 腎臓におけるエリスロポエチンの mRNA 発現および、免疫染色によるエリスロポエチンの発現(赤)

a,b: コントロールラット
c,d: CDH ラット



(図5) エリスロポエチン受容体の発現：肺、mRNA

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 1 件)

1: Takayasu H, Masumoto K, Hagiwara K, Sasaki T, Ono K, Jimbo T, Uesugi T, Gotoh C, Urita Y, Shinkai T, Tanaka H. Increased pulmonary RhoA expression in the nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. J Pediatr Surg. 2015 Sep;50(9):1467-71. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1: 先天性横隔膜ヘルニアラットモデル腎臓におけるエリスロポエチン産生の抑制
Suppressed Erythropoietin Expression in the Kidney in Nitrofen-induced Congenital Diaphragmatic Hernia

高安 肇 増本幸二 萩原幸輝 南 洋輔
後藤悠大 千葉史子 坂元直哉 五藤 周
瓜田泰久 新開統子 田中秀明

第53回日本小児外科学会総会 ヒルトン福岡
シーホーク(福岡県福岡市)2016年5月24
日~26日

2: Suppressed Erythropoietin Expression in the
Liver in Nitrofen-induced Congenital
Diaphragmatic Hernia.

Hajime Takayasu, Kouji Masumoto, Koki
Hagiwara, Takato Sasaki, Fumiko Chiba, Naoya
Sakamoto, Chikashi Gotoh, Yasuhisa Urita,
Makoto Nakao, Toko Shinkai, Hideaki Tanaka
アジア太平洋小児外科学会 2015(チェジュ島、
韓国)2015年5月18日

3: Increased pulmonary RhoA expression in the
nitrofen-induced congenital diaphragmatic
hernia

Hajime Takayasu, Kouji Masumoto, Kouki
Hagiwara, Takahiro Jimbo, Takato Sasaki,
Kentaro Ono, Toru Uesugi, Chikashi Gotoh,
Yasuhisa Urita, Toko Shinkai Hideaki Tanaka
ヨーロッパ小児外科学会 2014(アイルランド、ダ
ブリン)2014年6月18日~21日

4: Nitrofen ラットモデルにおける Wnt4 遺伝子発
現の検討

高安 肇, 増本 幸二, 新開 統子, 田中 秀明,
瓜田 泰久, 五藤 周, 上杉 達, 神保 教広,
小野 健太郎, 佐々木 理人

第51回日本小児外科学会 大阪国際会議場
(大阪府大阪市)2014年5月8日~10日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高安 肇 (TAKAYASU Hajime)

筑波大学・医学医療系小児外科・講師

研究者番号: 10359614

(2) 研究分担者

増本 幸二 (MASUMOTO Kouji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 20343329

上杉 達 (UESUGI Toru)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 30380421

五藤 周 (GOTOH Chikashi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 80598889