

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870542

研究課題名(和文)高濃度酸素暴露マウスを用いた新生児慢性肺疾患長期合併症の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Long-term effects of exposure to neonatal hyperoxia on lung function in mice

## 研究代表者

難波 文彦(NAMBA, Fumihiko)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20643323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高濃度酸素は未熟児に対して新生児慢性肺疾患を生じさせる。その発症と重症度には性差が存在するが、原因は分かっていない。本研究では、成獣マウス肺に対する新生仔期高濃度酸素の影響の性差について検討した。新生仔マウスを95%酸素に96時間暴露し、以降生後8週までルームエアで回復させた。成獣マウス肺に対する新生仔期高濃度酸素の影響について検討した。新生仔期高濃度酸素後の成獣雄マウスでは呼吸抵抗が上昇し、メサコリンに対する反応性が低下した。新生仔期高濃度酸素暴露後の成獣雌マウスでは肺胞化遅延を認めた。本研究の結果から、新生仔期高濃度酸素暴露は雌雄成獣マウスの呼吸機能に異なる形で影響を与えることが示された。

研究成果の概要(英文)：Premature infants are often exposed to hyperoxia, which may lead to the development of chronic lung disease (CLD). Sex-specific differences exist in the development and severity of CLD. The aim of this study is to examine the sex-related long-term effects of neonatal hyperoxia on the lungs of adult mice. Newborn mice were exposed to 95% oxygen for 96 hours and were allowed to recover in room air to adulthood. Sex-related differences in pulmonary function, airway hyper-responsiveness, and lung structure in adult mice were assessed. Respiratory resistance was increased and sensitivity to methacholine was decreased in male adult mice following exposure to neonatal hyperoxia, whereas delayed alveolarization was observed in female adult mice following exposure to neonatal hyperoxia. The findings of the present study demonstrate that neonatal hyperoxia differentially affects pulmonary outcome in female and male adult mice.

研究分野：周産期・新生児医学

キーワード：未熟児医学 小児呼吸器学 高濃度酸素 新生児慢性肺疾患 性差 新生児 長期予後

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児慢性肺疾患 (chronic lung disease of infancy, 以下 CLD) は、めざましい新生児医療の発展にもかかわらず、未熟児にとって高頻度で重篤な合併症の一つであり、神経学的後遺症を残す。出生体重 1000g 未満の超低出生体重児に限っては 50%以上が CLD に罹患する。中でも近年、新生児期のみならず、幼・小児期にも呼吸器合併症が引き続くことが問題となっており、呼吸器感染症や喘息様疾患で頻回の再入院を必要とする。この症状は思春期・青年期でも引き続き、長期の薬剤によるコントロールを必要とすることもあり、医療経済学上大きな問題となっている。

(2) CLD の発症・重症度には性差が存在する。他の交絡因子を調整後も早産女児では CLD 発症率は低く、男児は CLD 発症の独立した予測因子であると考えられている。男児の新生児期および 1 歳時の呼吸機能は女児よりも悪い。このヒト CLD の性差については、抗酸化防御機構の違いや肺サーファクタント構成の違い等が考えられているが、よく分かってはいない。

## 2. 研究の目的

(1) 新生仔期高濃度酸素暴露により CLD マウスモデルを作製し、新生仔期高濃度酸素に暴露した週齢 8 週の成獣マウスにおける呼吸機能・気道過敏性・肺構造の性差を解析することにより、「新生仔期高濃度酸素性肺傷害は雌よりも雄で生じやすい」という仮説を検証することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) すべての実験プロトコールは埼玉医科大学動物実験委員会により承認された (承認番号: 1186)。生後 12 時間以内に、C57Bl6/J 新生仔マウスをランダムにルームエアまたは 95%酸素 (高濃度酸素) 暴露に割り付けた。高濃度酸素暴露は酸素・二酸化炭素濃度モニター下で、96 時間行った。高濃度酸素暴露による母獣の肺傷害を回避させるため、母獣を 24 時間毎にルームエア群とローテ とさせた。暴露後は週齢 8 週までルームエア下で回復させた。

(2) 日齢 4、日齢 14、週齢 8 に麻酔下 (ペントバルビタール、50 mg/kg、腹腔内投与) に両肺を摘出した。右肺は mRNA 解析用に液体窒素にて凍結後、-80 で凍結保存し、左肺は組織解析用に 10%中性緩衝ホルマリンで 25 cmH<sub>2</sub>O 加圧固定後 (オーバーナイト) パラフィン包埋・薄切した。

(3) 肺組織のパラフィン切片をヘマトキシ

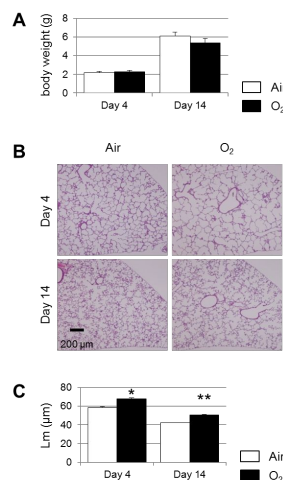
リン・エオジンで染色した。光学顕微鏡下で、肺胞径の指標となる Mean linear intercept (Lm) と平均気管支上皮厚を測定した。

(4) 摘出した肺組織より TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) および RNeasy Plus Mini Kits (QIAGEN) を使用して、RNA を抽出した。Heme oxygenase (HO)-1、p21、cholinergic receptor, muscarinic (Chrm) 2、Chrm3 の遺伝子発現を定量 RT-PCR (7500 Fast Real-Time PCR System、Applied Biosystems、Tokyo、Japan) を用いて定量した。内因性コントロールは、-glucuronidase を用いた。各プローベの Assay ID は以下の通り。HO-1, Mm00516005\_m1; p21, Mm04205640\_g1; Chrm2, Mm01701855\_s1; Chrm3, Mm00446300\_s1; -glucuronidase, Mm01197698\_m1。

(5) 週齢 8 週の成獣マウスを麻酔下 (ペントバルビタール、50 mg/kg、腹腔内投与) で気管切開し、気管挿管を行った。挿入した気管カニューレを flexiVent system (SCIREQ Inc., Montreal, Canada) に接続し、呼吸機能 (レジスタンスおよびコンプライアンス) を測定した。さらに、気道過敏性を評価するため、メサコリン (2.5-50 mg/mL) を吸入させ、レジスタンスの変化を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 96 時間の新生仔期高濃度酸素暴露は日齢 4 および日齢 14 の体重に影響を与えなかった (図 1A)。96 時間の新生仔期高濃度酸素暴露は肺胞発達を停止し、有意な Lm 増加を伴う肺胞の単純化を生じさせた (図 1B、C)。新生仔期高濃度酸素暴露は HO-1 および p21 の遺伝子発現を有意に増加させ、これは過去の CLD マウスモデルの報告と一致した (図 1D、E)。



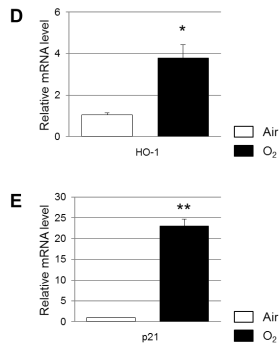


図 1

(2) 新生仔期高濃度酸素暴露の長期的影響を検討するため、週齢 8 週の成獣マウスを用いた。新生仔期高濃度酸素暴露とルームエア・コントロールの成獣では新生仔期同様、雌雄ともに体重差は認めなかった (図 2A)。成獣雌肺において、新生仔期高濃度酸素暴露はルームエアと比較して有意に Lm を増加させ、拡大した肺胞を生じさせた (図 2B、C)。一方、同様の病理所見は成獣雄マウスでは認めなかった。

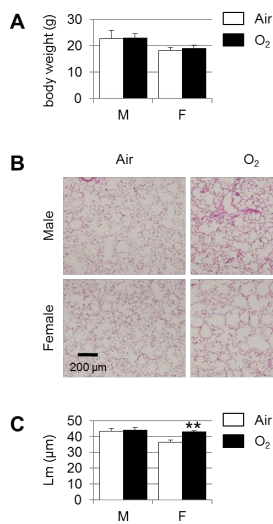


図 2

(3) 週齢 8 週の成獣マウスの呼吸機能を flexiVent system を用いて測定した。新生仔期高濃度酸素暴露は成獣雄マウスのレジスタンスを増悪させた (図 3A)。コンプライアンスは雌雄ともに、新生仔期高濃度酸素暴露による影響を認めなかった。気道過敏性を評価するためにメサコリン試験を行った。成獣雄マウスにおいて、新生仔期高濃度酸素暴露はメサコリンに対する気道の反応性を低下させた (図 3B)。雌マウスではメサコリンに対する反応性は新生仔期高濃度酸素暴露で変化がなかった。

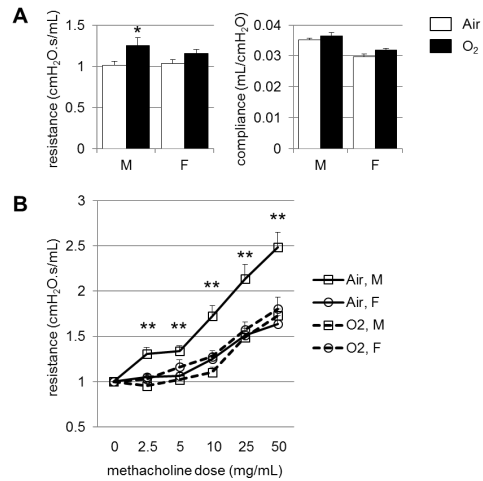


図 3

(4) メサコリン受容体である Chrm2 および Chrm3 の肺内遺伝子発現を定量 RT-PCR で定量した。ルームエア・コントロールと比較して、新生仔期高濃度酸素暴露後、雌マウス・雄マウスともに両遺伝子の有意な発現変化は生じなかった (図 4A、B)。また、新生仔期高濃度酸素暴露は雌雄成獣マウスともに、気管支壁厚も変化させなかった (図 4C)。

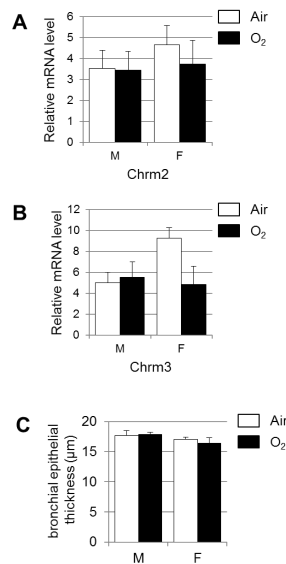


図 4

< 引用文献 >

**Fumihiko Namba**, Hayato Go, Jennifer A Murphy, Ping La, Guang Yang, Shaon Sengupta, Amal P. Fernando, Mekdes Yohannes, Chhanda Biswas, Suzanne L. Wehrli, Phyllis A. Dennery, Expression level and subcellular localization of heme oxygenase-1 modulates its cytoprotective properties in response to lung injury: a mouse model. PLoS One. 2014 Mar 5;9(3):e90936. doi:10.1371/journal.pone.0090936.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

**Fumihiko Namba**, Ryo Ogawa, Masato Ito, Takaaki Watanabe, Phyllis A. Dennery, Masanori Tamura, Sex-related differences in long-term pulmonary outcomes of neonatal hyperoxia in mice, *Exp Lung Res*, 査読有, 2016 Mar;42(2):57-65  
doi: 10.3109/01902148.2016.1141264

〔学会発表〕(計1件)

**Fumihiko Namba**, Masato Ito, Ryo Ogawa, Yukio Arai, Hayato Go, Ineko Kato, Phyllis A. Dennery, Masanori Tamura, Long-term effects on lung function and identification of a novel biomarker, HAPLN-1, in neonatal hyperoxic lung injury in mice, *Pediatric Academic Societies Annual Meeting 2016*, 2015年4月25日~2015年4月28日、San Diego

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

難波 文彦(NAMBA, Fumihiko)

埼玉医科大学・小児科・講師

研究者番号： 20643323