

博士論文

高濃度酸素性肺障害および新生児慢性肺疾患における
肺内代謝および修復に関する研究

田中 広輔

高濃度酸素性肺障害および新生児慢性肺疾患における
肺内代謝および修復に関する研究

東京大学大学院 医学系研究科

生殖・発達・加齢医学専攻 小児医学講座

指導教員：高橋 尚人 教授

田中 広輔

目次

| | |
|--|-----------|
| 図一覧 | 7 |
| 表一覧 | 9 |
| 略語一覧 | 10 |
| 要旨 | 12 |
| I. 序文 | 13 |
| 1. 高濃度酸素性急性肺障害について | 13 |
| 2. 高濃度酸素曝露の肺への影響 | 14 |
| 3. 高濃度酸素曝露における齧歯類の成獣と新生仔の酸素耐性の違い | 16 |
| 4. 新生仔マウスの高濃度酸素耐性の機序解明におけるメタボローム解析を用いたアプローチ | 18 |
| 5. 新生児慢性肺疾患（Bronchopulmonary Dysplasia: BPD）について | 20 |
| 6. BPD におけるバイオマーカー探索 | 23 |
| II. 目的 1 | 25 |
| III. 方法 1 | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 1. 動物 | 25 |
| 2. マウスに対する高濃度酸素曝露 | 26 |
| 3. 肺の組織検体の採取 | 27 |
| 4. 代謝物の抽出..... | 28 |
| 5. メタボローム解析 | 29 |
| 6. ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) 酵素活性アッセイ | 30 |
| 7. RNA 抽出と定量的 PCR 解析..... | 31 |
| 8. タンパク抽出、ウェスタンブロット | 32 |
| 9. 免疫組織染色..... | 33 |
| 10. 統計学的解析 | 33 |
| IV. 結果 1 | 34 |
| 新生仔および成獣マウス肺における高濃度酸素曝露の代謝物への影響 | 34 |
| 高酸素曝露を行なった肺において変化を示した代謝経路は新生仔と成獣で異なる | 36 |
| 高濃度酸素曝露を受けた成獣マウス肺における PDH 酵素活性の低下 | 39 |
| 高濃度酸素曝露後の肺における Pdk4 mRNA およびタンパク質発現量の違い..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| V. 考察 1 | 45 |
| 1. 高濃度酸素曝露後の新生仔と成獣マウスに対するメタボローム解析について | 45 |
| 2. 高濃度酸素曝露後の PDH 活性の変化および PDK による調節について | 50 |
| 3. 高濃度酸素性肺障害における成獣と新生仔の解糖系代謝の違いに関する今後 の研究の展開 | 53 |
| VI. 小括 1 | 55 |
| VII. 目的 2 | 56 |
| VIII. 方法 2 | 56 |
| 1. 動物 | 56 |
| 2. 新生児慢性肺疾患 (BPD) モデル | 58 |
| 3. 肺組織検体の採取 | 60 |
| 4. 網羅的遺伝子発現解析アレイと定量的 PCR 解析..... | 61 |
| 5. 免疫組織染色..... | 62 |
| 6. Hapln1 欠損ホモ接合体マウスの表現型解析および形態学的評価 | 63 |

| | |
|--|-----------|
| 7. 肺の細胞外マトリクス構成成分の測定 | 64 |
| 8. <i>Hapln1</i> 欠損マウスと野生型マウスの遺伝子発現の比較 | 65 |
| 9. 統計解析 | 66 |
| IX. 結果 2 | 66 |
| BPD マウスモデルを用いた BPD 関連遺伝子、遺伝子セットの探索 | 66 |
| <i>Hapln1</i> タンパクはマウス肺においては主に終末細気管支の上皮細胞で発現 | 72 |
| <i>Hapln1</i> 欠損マウスは四肢短縮、頭蓋顔面奇形を呈し、肺は低形成である | 73 |
| <i>Hapln1</i> 欠損マウスは気道・肺胞嚢内腔が狭く、実質および間質が密である | 75 |
| <i>Hapln1</i> 欠損マウスは肺内ヒアルロン酸およびコラーゲン含有量が多い | 76 |
| <i>Hapln1</i> 欠損マウスを用いた網羅的遺伝子発現解析アレイによる関連遺伝子、遺伝子セットの探索 | 77 |
| X. 考察 2 | 81 |
| 1. BPD マウスモデルを用いた関連遺伝子の探索、 <i>Hapln1</i> 遺伝子に関して | 81 |
| 2. <i>Hapln1</i> 欠損マウスの表現型に関して | 87 |
| 3. <i>Hapln1</i> 欠損マウスを用いた関連遺伝子の探索に関して | 88 |
| 4. <i>Hapln1</i> の機能解析に関する今後の研究の展開 | 90 |

| | |
|----------------|----|
| XI. 小括 2 | 93 |
| XII. 結論 | 94 |
| 謝辭 | 95 |
| 引用文献 | 96 |

図一覧

| | | |
|------|--|----|
| 図 1 | 高濃度酸素性急性肺障害の病態 | 15 |
| 図 2 | BPD の発生機序 | 23 |
| 図 3 | メタボローム解析に用いたマウスの各群の処置..... | 27 |
| 図 4 | メタボローム解析の結果 | 35 |
| 図 5 | メタボローム解析で得られた代謝物データに対する階層的クラスタ分析、主成分分析 | 36 |
| 図 6 | 代謝経路マップ (一部抜粋) 上に示した解糖系、TCA 回路に関するメタボローム解析の結果 | 38 |
| 図 7 | 酸素曝露マウスにおける PDH 酵素活性 | 40 |
| 図 8 | 酸素曝露マウスにおける <i>Pdk1</i> 、 <i>Pdk2</i> 、 <i>Pdk3</i> 、 <i>Pdk4</i> の mRNA の発現量 | 42 |
| 図 9 | ウェスタンブロットおよび免疫組織染色による Pdk4 発現の確認 | 44 |
| 図 10 | 解糖系から TCA 回路に至る代謝経路の概略図..... | 48 |
| 図 11 | <i>Hapl1</i> 欠損ホモ接合体マウスの胎仔の作成方法..... | 58 |
| 図 12 | 慢性肺疾患マウスモデル各群の処置..... | 60 |
| 図 13 | BPD モデルマウスに対する網羅的遺伝子発現解析アレイによる発現変動 | |

| | |
|---|----|
| 遺伝子の同定 | 69 |
| 図 14 BPD モデルマウスにおける発現変動遺伝子に対する GO 解析 | 70 |
| 図 15 野生型マウス肺における Hapln1 タンパクの局在 | 73 |
| 図 16 <i>Hapln1</i> 欠損マウスの胎仔の肉眼的所見 (A) および出生後の生存率 (B) | 74 |
| 図 17 <i>Hapln1</i> 欠損マウスと野生型マウスにおける肺体重比および肺湿乾重量比 | 74 |
| 図 18 肺の形態学的評価、肺胞嚢領域の分画の定量 | 76 |
| 図 19 細胞外マトリクス構成成分の測定 | 77 |
| 図 20 <i>Hapln1</i> 欠損胎仔マウス肺に対する網羅的遺伝子発現解析アレイによる発 現変動遺伝子の同定 | 78 |
| 図 21 <i>Hapln1</i> 欠損マウスにおける発現変動遺伝子に対する GO 解析の結果 ... | 79 |
| 図 22 定量的 PCR 解析によるマイクロアレイの結果の確認 | 80 |
| 図 23 アグリカン/ヒアルロン酸凝集体におけるヒアルロン酸プロテオグリカ ン結合タンパク質 1 概略図 | 84 |
| 図 24 Cre/lox, テトラサイクリン遺伝子発現誘導系概略図 | 92 |

表一覧

表 1 *Hapln1* 欠損マウスの発現変動遺伝子 (DEGs) の中から選択した 7 遺伝子

.....80

略語一覽

ADP: adenosine diphosphate

ALI: acute lung injury

ARDS: acute respiratory distress syndrome

ATP: adenosine triphosphate

Acetyl CoA: acetyl coenzyme A

BPD: bronchopulmonary dysplasia

CE- TOFMS: capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry

DCA: dichloroacetate

DEGs: differentially expressed genes

ECMO: extracorporeal membrane oxygenation

GO: gene ontology

HALI: hyperoxic acute lung injury

HAPLN1: hyaluronan and proteoglycan link protein 1

NADH: nicotinamide adenine dinucleotide

PBS: phosphate buffer saline

PCR: polymerase chain reaction

PDH: pyruvate dehydrogenase

PDK: PDH kinase

PEP: phosphoenolpyruvate

PG: phosphoglyceric acid

ROS: reactive O₂ species

SOD: superoxide dismutase

TCA: tricarboxylic acid

要旨

高濃度酸素曝露後の新生仔および成獣マウスの肺を用いたメタボローム解析において、成獣肺では解糖系に関連する代謝物が増加するが、新生仔肺では同様の反応は認められなかった。これらの代謝物の増加は、酸素曝露による Pdk4 の発現上昇に伴い PDH の酵素活性が低下することが原因と考えられた。以上の結果は、新生仔と成獣の酸素耐性の違いの機序解明において重要な手掛かりとなる。また、BPDモデルマウスの肺を用いた網羅的遺伝子発現解析アレイにより、酸素曝露直後から修復期にかけ高発現となる *Hapln1* 遺伝子を同定した。同遺伝子の欠損がマウス肺に与える影響を *Hapln1* 欠損マウスの表現型を解析することにより明らかとした。

I. 序文

1. 高濃度酸素性急性肺障害について

酸素療法は、呼吸不全の患者の治療において重症度を問わず日常的に用いられている中心的な治療である。低酸素性肺障害の管理では、十分な血中酸素濃度を維持するためにしばしば生理学的範囲を超える濃度の酸素が用いられている。その一方で、重度の呼吸不全などの治療の過程において、肺が高濃度酸素に曝露されることの悪影響についても古くから知られている。集中治療医学の発展とともに機械的人工換気が確立し、長期間にわたり酸素投与下での人工呼吸器管理が可能になったことで、高濃度酸素投与による肺障害はますます注目されるようになってきている(1)。高濃度酸素の使用は短期的には救命に繋がる可能性が期待されるが、長期間にわたる高濃度酸素投与は、多くの場合機械的人工換気による呼吸管理を伴い、重度の高濃度酸素性急性肺障害 (Hyperoxic Acute Lung injury : HALI)、急性呼吸窮迫症候群 (Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS) を引き起こし、特に超高濃度酸素 ($\text{FiO}_2 \geq 0.9$) の長期使用は患者を死に至らしめる(1, 2)。

集中治療領域における急性低酸素性呼吸不全の管理においては、適切な血中酸素化を確保するために吸気中に生理学的範囲を超える酸素濃度の使用が必要とな

ることが多い(3)。低酸素性呼吸不全に対して酸素療法に代替可能な治療としては体外式膜型人工肺（Extracorporeal Membrane Oxygenation: ECMO）が挙げられるが、ECMOは非常に侵襲性の高い治療であり適応も可逆的な病変に限られているため、酸素療法は低酸素性呼吸不全の治療において欠かすことのできない治療であると言える。成人の集中治療領域では、HALIの重症度は酸素分圧（特に FiO_2 0.6 以上）と高濃度酸素への曝露時間によって決まることが知られている。臨床的にはHALIのリスクは FiO_2 0.7 以上で生じ、特に FiO_2 が 0.8 以上が一定時間続くと特に問題となることが多い。また、集中治療を受けている重症患者において、酸素投与に伴う高酸素血症に晒されることがその後の予後不良と関連することも報告されている(4)。

2. 高濃度酸素曝露の肺への影響

酸素は細胞内の ATP 合成において重要な役割を果たしているが、一方で高濃度となると肺胞上皮細胞の傷害を引き起こす活性酸素種（reactive O_2 species: ROS）の産生の原因ともなる。長期的な高濃度酸素曝露は、生体の持つ抗酸化防御機構を上回る過剰な ROS の産生を引き起こし、肺胞上皮細胞における細胞内伝達経路の活性化と炎症誘発性サイトカインの分泌を誘導する(5)。この結果、肺胞での炎症が惹起され、

肺胞毛細血管閥門の破綻を招き、肺胞の透過性亢進による肺浮腫、血管内皮および肺胞上皮細胞の細胞死、肺胞腔への多形核白血球の流入、フィブリンの肺胞内への沈着を引き起こし、肺の細胞構造の破壊に至らせる(3, 6, 7) (図 1)。このように高濃度酸素は肺に対し障害を引き起こすものではあるが、先述のように低酸素性呼吸不全における酸素療法は代替可能な治療は存在せず欠かすことはできないため、その影響を軽減する治療法が期待されている。

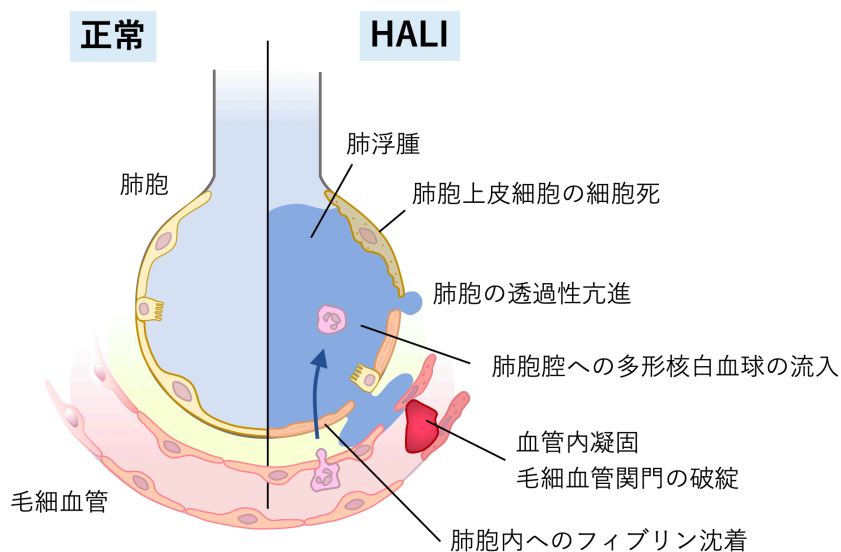


図 1 高濃度酸素性急性肺障害の病態

HALI: Hyperoxic Acute Lung injury

3. 高濃度酸素曝露における齧歯類の成獣と新生仔の酸素耐性の違い

著者らの研究室では、高濃度酸素性肺障害に注目して研究を行っており、マウスに対し高濃度酸素曝露を行う実験系を用いてきた。高濃度酸素は齧歯類においてもヒトと同様に急性の肺障害を生じ、ALI/ARDSを発症させる(1)。また、出生直後の齧歯類の新生仔に対する高濃度酸素曝露は、後述するように新生児慢性肺疾患のモデルとしてしばしば用いられている。以上のように齧歯類に対する高濃度酸素曝露はこれまでに種々の肺障害のモデルと用いられており、齧歯類の新生仔が成獣に比して高濃度酸素に対する耐性を有し、高濃度酸素環境下においてより長期に生存可能であるという現象は以前より報告されていた(8)。我々の実験においても、マウスに対し高濃度酸素を用いた場合、新生仔マウスの多くが4日間以上の高濃度酸素曝露を耐え生存するのに対して、成獣マウスに同様の酸素曝露を行うとその多くが数日の曝露で死に至ることが観察される。このような齧歯類の新生仔が有する高濃度酸素曝露に対する耐性に関して、その機序についてはこれまでもいくつかの着眼点から説明する試みが行われている。活性酸素の産生能という面に着目した研究では、Ischiropoulosらは新生仔と成獣のラットの肺において高濃度酸素曝露後の細胞内面分のスーパーオキシドアニオン生成能力を比較し、100%酸素投与下のミクロソームおよびミトコンド

リア分画におけるスーパーオキシドの生成が、成獣では酸素曝露開始後 8~24 時間にかけて新生仔の約 3 倍となることを明らかにした。彼らは新生児の高濃度酸素に対する耐性は、細胞内スーパーオキシド生成能力と抗酸化防御との間のバランスによって説明されると結論づけた(9)。また、Keeney らは成獣および新生仔ラットの肺胞 II 型細胞を用いて、in vivo における高濃度酸素曝露のグルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) といった抗酸化酵素へ与える影響を調べた。その結果、新生仔の II 型肺胞上皮細胞では高濃度酸素曝露後に SOD 活性が 170% 増加したのに対し成獣では同酵素の活性が低下しており、この抗酸化酵素応答の違いが新生児の酸素耐性の強化に寄与している可能性があるとして報告した(10)。

高濃度酸素による肺の炎症に着目した研究としては、齧歯類の新生仔の肺では成獣に比して Chemokine 発現の程度、時期や分布(11)、好中球表面の接着分子 (L-selectin) の酸素曝露に対する反応(12)に違いがあり、高濃度酸素によって惹起される炎症反応が軽度となることが原因ではないかと推測する研究の報告がある。しかし、以上のような先行研究はあるものの、その理解は部分的な説明に留まり、新生仔の高濃度酸素に対する耐性の機序は十分に解明されているとは言えないのが実情である。従って、この機序を明らかにすることは、酸素療法に伴う肺障害の新規治療法開発において重

要な手がかりとなることが期待される。

4. 新生仔マウスの高濃度酸素耐性の機序解明におけるメタボローム解析を用いたアプローチ

代謝物は、生体の遺伝子発現プロセスにおける中間および最終生成物であり、ゲノムと生体のおかれた環境との相互作用の結果であるとともに、単なる最終産物に止まらず生体の調節システムの一部を構成している。代謝物の総体であるメタボロームは、遺伝子発現過程の最も下流の発現を表すため、その上流のゲノム、トランスクリプトームおよびプロテオームに比べて特定の時間における生物の表現型を密接に反映している(13)。従って、対象の代謝物を包括的に解析することにより、対象がおかれた環境における生理機能を瞬間的なスナップショットとして理解することが可能となる(14)。このような、特定の条件下の細胞、組織、体液といった生体試料において、低分子量の代謝物を網羅的に測定し解析する技法がメタボローム解析である。メタボローム解析は、細胞内で生じている生化学的な反応の手がかりとなることから、疾患の発症に関連する代謝経路を明らかにする際に重要であり、新たなバイオマーカーの同定や様々な病気の背景機序の解明といった目的で、近年広く用いられるように

なっている(15, 16)。

メタボローム解析の過程は、試料からの代謝物の分離と、分離した代謝物の質量分析計による定性および定量に分けられ、それぞれにいくつかの方法が開発されている。Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE- TOFMS)は、代謝物の分離にはキャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis: CE)、質量分析には飛行時間型質量分析法 (time-of-flight mass spectrometry: TOFMS) を用いる方法である。CEでは、試料を含む緩衝液をキャピラリーに満たし両端に高電圧を加え、化合物が各物質の質量電化比 (mass-to-charge ratio : m/z) に基づいて移動させることで分離を行う。また、TOFMS では、分離された化合物をイオン化して電極間の電位差で加速しフライトチューブ内を飛行させ、検出器に達するまでの飛行時間を測定する。化合物の飛行時間は m/z に応じた値をとるため、飛行時間から化合物の質量を算出することができる。このようにして得られた結果を既知の代謝物質データベースと照合することにより代謝物を同定する(16)。この CE を用いた質量分析は、代謝物の分解能が非常に高い、代謝プロファイルを分析するための汎用性に優れる、サンプル中のほぼすべての荷電低分子量化合物を同時に定量化することが可能である、という特徴をもつ。従って、エネルギー代謝に関わる化合物は、極性が高い、揮発性がない、検出性が難し

いという共通の性質をもつため、エネルギー代謝の包括的な解析においては CE を用いた質量分析が適している(17)。

これまでに高濃度酸素曝露を受けた肺や、新生仔と成獣のマウスの高濃度酸素曝露に対する感受性の違いに着目しメタボローム解析を行なった研究は報告されていない。メタボローム解析は他の Omics 解析と比べ環境に伴う生体の変化を反映しやすく、高濃度酸素曝露による影響をより鋭敏に捉えることが可能である。また、新生仔と成獣の環境への反応の違いという後天的な獲得形質の理解には、メタボローム解析のような遺伝子発現過程の下流のオーム情報解析が重要であると考えられる。以上の点より、メタボローム解析により酸素曝露後の肺の代謝物を測定することは、新生仔が高濃度酸素曝露に対する耐性を有する機序を明らかにするのに際して有効な手法であると考えた。

5. 新生児慢性肺疾患 (Bronchopulmonary Dysplasia: BPD) について

高濃度酸素を用いた治療は、成人の呼吸障害のみならず、早産児の集中治療においてもしばしば用いられている。しかし、早産児では肺の未熟性という要素が加わるため、成人と異なり BPD という特有の病態を発症する。BPD とは、早産児にお

いて日齢 28 以上または受胎後週数 36 週以上の酸素療法を要する状態と定義され、在胎期間 28 週未満で出生した早産児に好発する慢性の呼吸器疾患である。BPD は、早産に伴う肺の未熟性に加え、胎児発育不全、子宮内炎症、出生後の蘇生、酸素投与、人工呼吸器管理、感染症といった種々の因子に曝露されることにより生じる、肺血管および肺胞の発育の遅滞および停止を主体とした疾患である（図 2）(18)。新生児慢性肺疾患は早産児の急性期管理における問題であると同時に、幼・小児期の呼吸器疾患による再入院の増加、生涯にわたる呼吸機能の低下といった長期にわたる呼吸器合併症を生じる。さらに、早産児の神経学的予後の悪化にも関連することが示されている。近年、周産期医療の進歩に伴い早産児の生命予後は大幅に改善し、多くの周産期合併症は頻度が減少している。しかし、BPD はその中で唯一発症率が上昇しており、在胎期間 28 週未満出生の早産児の 45%に発症すると報告されている(19)。BPD に対しては、これまでにカフェインやビタミン A、抗炎症薬、ステロイド等の治療法が試みられたが、いずれの治療法も限定的な治療効果や副作用による臨床使用の制限といった問題を抱えている(20)。

また、近年は BPD に対する幹細胞治療、中でも間葉系幹細胞の経気道投与による予防的治療の治験が開始され、有効性を示す報告も出始めている。間葉系幹細

胞とは、中胚葉性組織（間葉）に由来する体性幹細胞の一種である。間葉系幹細胞は、結合組織の前駆細胞となることに加えて免疫機能の制御など多くの機能を果たすことがわかっており、近年再生医療への臨床応用が進められている。しかし、BPDに対する間葉系幹細胞を用いた治療はまだ研究段階の治療であり、治療には未だ解決しなければならない問題点が残されている。そのうちの 하나가、治療に用いる間葉系幹細胞の品質における細胞特性の不均一性（heterogeneity）に関する問題である。間葉系幹細胞は、自己複製および系統分化のメカニズムなど基本的な生物学的な側面は未だ十分に解明されていない点が多く、培養により細胞の増殖を行うに際し、細胞集団の組成や機能の変化を予測する方法や治療目的に適した生物学的特性を持つ系統のみを拡大する技術が確立されていない(21)。従って、間葉系幹細胞の集団は、由来する細胞（骨髄、脂肪組織、臍帯血や羊水、臍帯のワルトン膠質などの胎児由来組織など）やドナー間、培養集団内において細胞の特性が様々であり、一定の品質を担保することが困難で(22)、使用した細胞製剤によって治療効果がばらつき期待されるような結果が得られない可能性がある。間葉系幹細胞を用いた治療では、その他にも、間葉系幹細胞の大量生産や流通に関わる問題など、臨床使用に向けてはまだ越えなければならない障壁が残されている(23)。

以上のように、BPDはその生涯にわたる呼吸機能への影響、高い発症頻度にも関わらず、十分な治療は確立されておらず、発症児、医療経済の双方の視点で負担が大きいため、周産期医療における喫緊の問題となっている(19)。

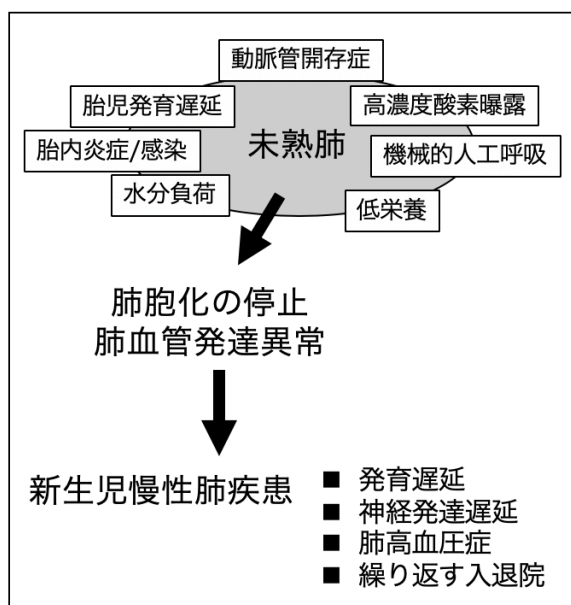


図 2 BPD の発生機序

BPDは、未熟肺を背景として高濃度酸素曝露、機械的人工呼吸、動脈管開存症、胎内炎症/感染など多くの要素が重なることにより生じる。肺胞化の停止、肺血管発達異常といった肺発達の障害を受けることにより、早産児は生涯にわたり呼吸器のみでなく神経発達も含めた悪影響を受けることとなる。

6. BPD におけるバイオマーカー探索

BPDはいまだに十分な治療法がなく有効な新規治療法の確立が望まれているが、その研究においてはいくつかの問題点があり、研究を困難としている。1点目

として、BPD の病態には先述のように肺の未熟性、出生後の呼吸管理、遺伝的背景など多くの要素が関連し、発症機序が複雑であることが挙げられる。また2点目として、肺組織は気管および肺胞、血管系、間質からなる複雑な3次元構造をとるため *in vitro* の実験系の作成が難しい点が挙げられる。近年は3次元肺オルガノイドなどを用いた実験系が作成され肺発生に関する研究などにおいて用いられ始めているが(24-26)、病態が複雑で血管系、間質の関わりも大きい新生児慢性肺疾患においては実験系として不十分な面もある。以上の問題点を抱えていることもあり、BPD の発症機序に関しては、これまで発生学、炎症関連、酸化ストレス、non-coding RNA、細胞外基質といった様々な着眼点による研究が行われてきたが(18)、未だに断片的な理解に留まり、得られた知見を有効な治療に結びつけることができていないのが現状である。

齧歯類の新生仔に対する高濃度酸素曝露は、曝露後の急性期に肺障害を生じるとともに、その後成獣となった以降も永続的に肺胞の単純化、肺機能の低下、肺血管のリモデリング、ウイルス感染への感受性の上昇といった症状を呈する(27-29)。このような新生仔に対する酸素曝露モデルはヒトのBPDとの病理学的な類似性が高く、しばしば同疾患の動物モデルとして用いられている(30,31) 著者らの研究室でも、これまでに生後96時間の高濃度酸素曝露が新生仔マウスの肺胞化を停止し、長期間呼

吸機能を悪化させ、BPDと同様の病態を呈することを報告しており(32)、同疾患の動物モデルとして使用している。本モデルを用いて高濃度酸素曝露後の回復期に肺内で発現変化を示す遺伝子の網羅的解析を行い、新生児慢性肺疾患の機序解明および新規バイオマーカーの開発の足掛かりとすることとした。

II. 目的 1

新生仔と成獣のマウスの高濃度酸素曝露に対する感受性の違いに関して、高濃度酸素曝露を行なったマウス肺を用いたメタボローム解析を行い、代謝経路という観点からその機序を明らかとする。

III. 方法 1

1. 動物

全ての実験の手順は埼玉医科大学動物実験委員会の承認(実験承認番号 1691)のもと、アメリカ国立衛生研究所(National Institutes of Health)の「実験動物の管理と使用に関する指針」および埼玉医科大学のガイドラインに準拠して行われた。C57BL/6J マウス(SLC, Hamamatsu, Shizuoka, Japan)を12時間の明暗サイクルの環境

下で飼育し、餌と水は自由摂取とした。

2. マウスに対する高濃度酸素曝露

新生仔（生後 12 時間以内）と成獣（8 週齢）のマウスを正常酸素群（対照群）と高濃度酸素群の 2 群にランダムに割り当てた。正常酸素群では酸素曝露を行わず室内気で飼育し、高濃度酸素群では 95%酸素曝露を 96 時間行った。新生仔の高濃度酸素群は出生直後より酸素曝露を開始した。新生仔と成獣いずれも酸素曝露終了後は速やかに肺を摘出し解析のための処理を行った（図 3）。高濃度酸素への曝露は、酸素濃度および二酸化炭素濃度の持続モニタリング・調節が可能なチャンバー（BioSpherix, Redfield, NY）内で行った。母獣への高濃度酸素の影響を軽減するため、出産日の近いマウスの母仔 1 組を別に正常酸素環境で並行して飼育し、母獣のみ 24 時間ごとに正常酸素環境と高濃度酸素環境で入れ替えを行った。チャンバー内は大気圧に保ち、酸素曝露中も含め 12 時間の明暗サイクルの環境下で飼育した。

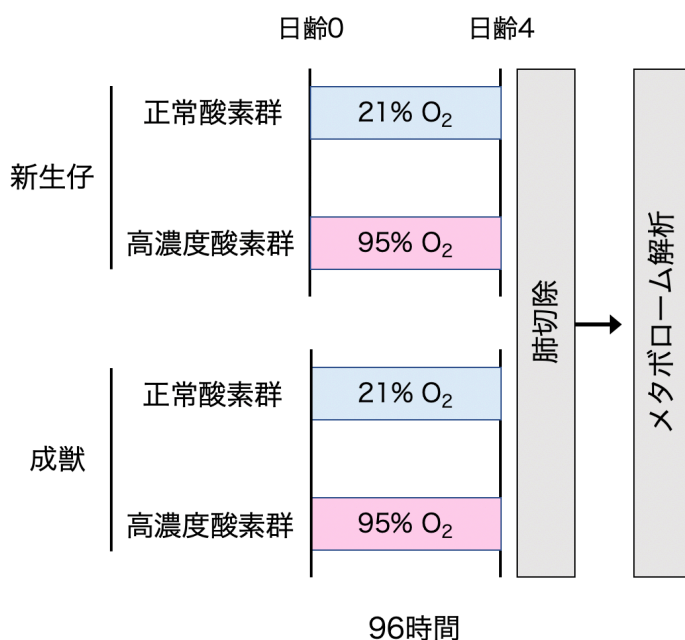


図 3 メタボローム解析に用いたマウスの各群の処置

新生仔と成獣のマウスをそれぞれ正常酸素群と高濃度酸素群の2群に割り付けた。正常酸素群は室内気で飼育、高濃度酸素群では95%酸素曝露を96時間行った。新生仔の高濃度酸素群は出生直後より酸素曝露を開始した。新生仔および成獣ともに酸素曝露終了後速やかに肺を切除し解析を行なった。

3. 肺の組織検体の採取

肺の組織検体の採取に際して、マウスはペントバルビタール腹腔内投与(50 mg/kg)により麻酔を行い右肺切除により安楽死させた。右肺は右心室を介して肺を phosphate buffer saline (PBS) で十分に灌流した後で速やかに切除し、液体窒素で急速冷凍し-80°Cで保存した。右肺切除後のマウスは、気管を切開して24G 静脈留置カテーテルを挿入し、残った左肺に25cm H₂O 圧で10%中性緩衝ホルマリンを注入し肺門

部で結紮して固定した。左肺はホルマリン注入後に摘出し4°Cで一晩固定した後、パラフィン包埋標本とし、5 μ mの切片を切り出して使用した。実験に際しては、実験動物の苦痛をできる限り軽減できるように最大限の配慮をして実施した。

4. 代謝物の抽出

代謝物の抽出およびメタボローム解析は Human Metabolome Technologies (HMT) (Tsuruoka, Yamagata, Japan)において実施した。メタボローム解析では、性別不明の新生仔（生後12時間以内、n=8）、雄と雌の成獣（8週齢、雄雌それぞれn=4）に対して96時間の酸素曝露を行ない解析に用いた。各群4匹の凍結肺組織約50mgを0°Cの internal standards (Solution ID: 304-1002, HMT)を含む50% acetonitrile/Milli-Q water 1500 μ Lに浸し、酵素を不活化した。これらの組織に組織用ホモジナイザー（Micro Smash MS100R, Tomy Digital Biology Co., Ltd., Tokyo, Japan）によるホモジナイズ（1500rpm、120秒）を5回行い、その後ホモジネートを2300 \times g 4°Cで5分間遠心した。続いて800 μ Lの上清に対して Millipore 5-kDa cutoff フィルター を用いて9100 \times g 4°Cで120分間遠心による濾過を行い、タンパク質を除去した。濾液は遠心分離により濃縮し、CE-TOFMS analysis に用いるため50 μ L Milli-Q water で再懸濁した。

5. メタボローム解析

メタボローム解析は、HMT 社の CE-TOFMS を用いた BasicScan パッケージによって実施した。CE-TOFMS 解析では、ハードウェアとして Agilent 6210 TOFMS、Agilent 1100 isocratic high-performance liquid chromatography HPLC pump、Agilent G1603A CE-MS adapter kit、および Agilent G1607ACE-ESI-MS sprayer kit を備えた Agilent CE システム (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を使用し、ソフトウェアは Agilent G2201AA ChemStation software version B.03.01 for CE (Agilent Technologies) を用いた。電気泳動管は fused silica capillary (内径 50 μm \times 全長 80 cm) を電気泳動バッファ (カチオン測定: H3301-1001, アニオン測定: H3302-1021, HMT) を満たして使用した。質量分析計では質量電荷比 (m/z) 50–1000 の範囲で測定を行った(16)。質量分析計で得られたデータに対して、解析ソフトウェアである MasterHands (Keio University, Tsuruoka, Yamagata, Japan) を用いたピークの抽出および自動積分、データの整列 (アラインメント) を行い、各ピーク毎の質量電荷比、ピーク面積、泳動時間をデータとして記録した(15)。このようにして得られた各ピークの情報に関して、質量電荷比 (m/z) の値と泳動時間を HMT 社の代謝物質データベースと照合し、個々に代謝物質名を付

与（アノテーション）した。代謝物質名が付与されたピークの面積に対し、内部標準物質（internal standard）の値とサンプル量に応じた補正を行い、各代謝物の相対レベルを決定した。

6. ピルビン酸脱水素酵素（PDH）酵素活性アッセイ

ピルビン酸脱水素酵素（pyruvate dehydrogenase : PDH）酵素活性を PDH 酵素活性マイクロプレートアッセイキット（ab109902; Abcam, Cambridge, UK）を用いて測定した。室内気で飼育または 96 時間の高濃度酸素曝露を行なった新生仔マウス（生後 12 時間以内、n=24）および雄と雌の成獣（8 週齢、雄雌それぞれ n=12）から採取した肺組織抽出物（800 μ g）を、PDH 酵素活性アッセイ用の 96 ウェルプレートに分注した。PDH 酵素複合体の構成成分はそれぞれのウェルの壁にコーティングされたモノクローナル抗体によって免疫学的に捕捉され、酵素活性は NADH 産生に伴う WST-1（レポーター色素）の還元による黄変に基づいて検出される。それぞれのウェルにおけるレポーター色素の V_{max} および 450nm の吸光度を、マイクロプレートリーダー(Corona Grating Microplate Reader SH-9000, Corona Electric, Ibaraki, Japan)のカイネティックプログラムを用いて 30 分間室温で測定した。

7. RNA 抽出と定量的 PCR 解析

ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDH kinase : Pdk)アイソザイムの mRNA における発現を評価するため、定量的 PCR 解析を行った。定量的 PCR 解析では、室内気で飼育または 96 時間の高濃度酸素曝露を行なった新生仔マウス (生後 12 時間以内、n=12) および雄と雌の成獣 (8 週齢、雄雌それぞれ n=6) から採取した肺を用いた。-80°Cで保存していた右肺組織を液体窒素中で破碎し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands)を用いて total RNA を抽出した(32)。抽出した total RNA は Qubit Fluorometer および Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて RNA 濃度測定を行った。

TaqMan fluorogenic detection system および 7500 Fast Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いた定量的 polymerase chain reaction (PCR) 解析により、*Pdk1* (Assay ID: Mm00554300_m1)、*Pdk2* (Assay ID: Mm00446681_m1)、*Pdk3* (Assay ID: Mm00455220_m1)、*Pdk4* (Assay ID: Mm01166879_m1; Applied Biosystems, Tokyo, Japan)の mRNA の発現レベルを測定した。

キット製造元の推奨するハウスキーピング遺伝子 (*Hprt1*, *Hsp90ab1*, *Gapdh*,

Actb) は高濃度酸素曝露により発現が変化するため、全ての条件において発現レベルが比較可能なものであることを確認した上で *β-glucuronidase* (Mm01197698_m1) を補正に用いた。

8. タンパク抽出、ウェスタンブロット

PDK4 のタンパクにおける発現を評価するためウェスタンブロット解析を行った。室内気で飼育または 96 時間の高濃度酸素曝露を行なった新生仔マウス（生後 12 時間以内、n=12）および雄の成獣（8 週齢、n=12）から採取した肺を用いて実験を行った。mRNA の発現において雌雄の差を認めなかったことから、ウェスタンブロット解析では雄のみを用いて解析を行った。肺組織を tissue extraction buffer（78510; Thermo Fisher Scientific）内でホモジナイズし、溶解液を 10000×g 5 分間の遠心で清澄化した。タンパクを含むサンプル（50 μg）を SDS/PAGE を行なって分離し、メンブレンへと転写した。メンブレンはブロッキング処理を行った後、anti-PDK4 一次抗体（1:500; ab172920; Abcam）、anti-β-actin 抗体（1:5000; GTX26276; GeneTex, Irvine, CA, USA）、引き続き horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体とともにインキュベーションした。Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent（GE Healthcare,

Chicago, IL, USA) を用いた化学発光を digital imaging system (Bio-Rad ChemiDoc XRS+; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)によって検出した。

9. 免疫組織染色

室内気で飼育または 96 時間の高濃度酸素曝露を行なった新生仔マウス（生後 12 時間以内、n=2）および雄の成獣（8 週齢、雄雌それぞれ n=1）から肺を採取し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋による処理を行い、肺組織切片を作成した。肺組織切片に対して脱パラフィン、浸水を行なった後、Antigen Unmasking Solution pH6（H-3300; Dako, Glostrup, Denmark）によって処理し、3%過酸化水素水に 30 分間浸漬した。切片を anti-PDK4 一次抗体（1:200; PDK4（12949-1-AP）; ProteinTech, Rosemont, IL, USA）とともに室温で 1 時間インキュベートした。免疫反応性を、HRP 標識 anti-rabbit IgG 二次抗体を用いた EnVision+ System（K4003; Dako）により検出した。切片は Mayer's Hematoxylin によって対比染色を行なった。

10. 統計学的解析

群間の比較は Welch's t test を用いて行なった。主成分分析 (Principal component

analysis : PCA) および階層クラスター分析 (hierarchical cluster analysis : HCA) は、HMT 社独自のソフトウェアである SampleStat と PeakStat を用いて行なった。検出された代謝物は VANTED software を用いて代謝経路マップ上に表した(33)。PDH 酵素活性、遺伝子発現、タンパク質発現の解析は R statistical package (version 3.5.2)を用いて実行した。値は means \pm standard error of the mean (SEM)として表現した。2群間の比較は帰無仮説に対して Student's t test を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

IV. 結果 1

新生仔および成獣マウス肺における高濃度酸素曝露の代謝物への影響

室内気で飼育または高濃度酸素曝露を行なった新生仔および成獣のマウス肺から抽出された代謝物を、メタボローム解析を用いて同定した。質量電荷比の値と補正した泳動時間を標準代謝物と照合することにより、258 のピークが同定、定量された。これらのうち、130 がカチオン、128 がアニオンであった。新生仔肺では 63、成獣肺では 113 の代謝物が高濃度酸素曝露によって有意に変化した。正常濃度酸素の環境下の新生仔と成獣マウスの肺では 114 の代謝物の量において有意な差を認められたが、高濃度酸素曝露後では 99 の代謝物の量で有意差を示した (図 4)。

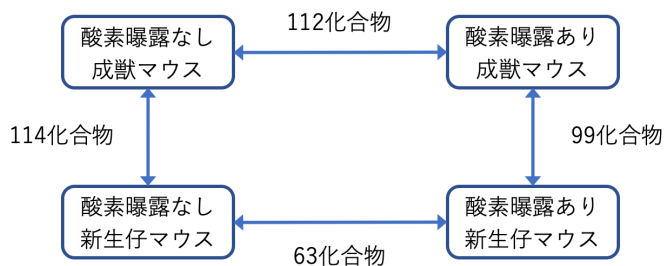


図 4 メタボローム解析の結果

高濃度酸素曝露によって新生仔肺では 63、成獣肺では 113 の代謝物の発現量が有意に変化した。正常酸素濃度における新生仔と成獣マウスの肺では 114 の代謝物の量において有意な差を認めたが、高濃度酸素曝露後では 99 の代謝物の発現量で有意差を示した。新生仔 n=8、成獣は雄雌それぞれ n=4。

個々のサンプルについて代謝物データを用いた階層クラスター分析を行ったところ、サンプルは 4 群のクラスターにまとめることができた。これらの 4 群のクラスターは肺の採取された条件（室内気・新生仔、高濃度酸素・新生仔、室内気・成獣、高濃度酸素・成獣）と一致しており（図 5A）、各条件においてそれぞれ特有の代謝産物のプロファイルを示すことが示された。主成分分析では、第 1 主成分によって新生仔および成獣の肺の代謝物プロファイルを明確に区別することができ、第 2 主成分によって高濃度酸素曝露群と正常濃度酸素群の代謝物プロファイルを明確に区別することが可能であった（図 5B）。第 1、第 2 の 2 つの主成分の累積寄与率は 59.5% であった。

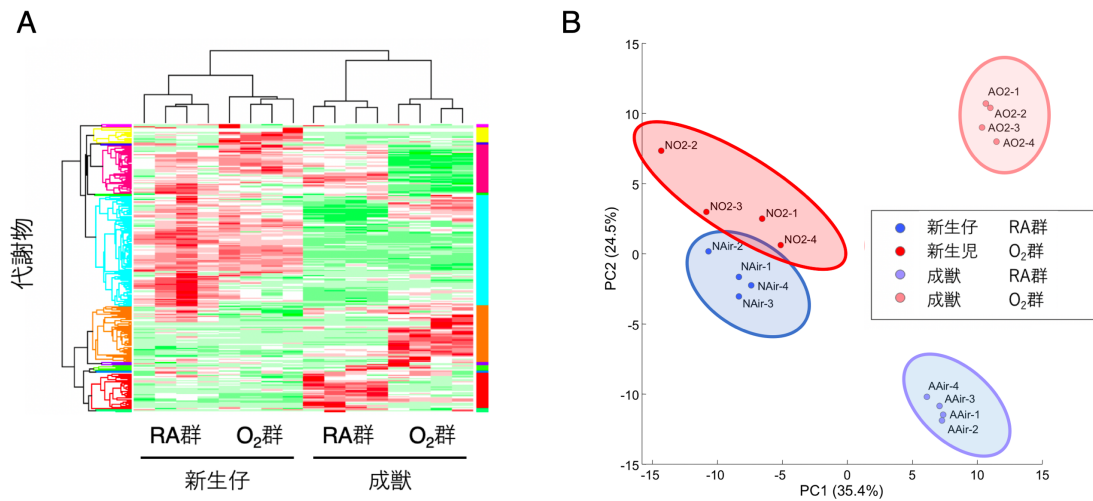


図 5 メタボローム解析で得られた代謝物データに対する階層的クラスター分析、主成分分析

(A) メタボローム解析で得られた代謝物データを heat map により視覚化するとともに階層的クラスター解析を行なった結果。代謝物データは 4 群のクラスターにまとまり、各クラスターは肺の採取された背景（室内気・新生仔、高濃度酸素・新生仔、室内気・成獣、高濃度酸素・成獣）の 4 群と一致した。(B) メタボローム解析で得られた代謝物データに対する主成分分析の結果。第 1 主成分 (X 軸) で成獣と新生仔マウス、第 2 主成分 (Y 軸) で酸素曝露の有無をそれぞれ分別可能であった。第 1,2 主成分までの累積寄与率 59.5%であった。新生仔 n=8、成獣は雄雌それぞれ n=4。

Air 群：正常酸素群、O₂ 群：高濃度酸素曝露群、PC1：第 1 主成分、PC2：第 2 主成分

文献(34)より引用一部改変。

高酸素曝露を行なった肺において変化を示した代謝経路は新生仔と成獣で異なる

CE-TOFMS によって検出されたピークを、候補化合物に基づいて、解糖系／糖新生、ペントースリン酸回路、TCA 回路、尿素回路、プリン／ピリミジン代謝、補酵素代謝、その他種々のアミノ酸代謝経路に分類し、代謝経路マップ上に表現した(図

6)。代謝経路および機能的分類は KEGG pathway database に基づいて作成した。主成分分析の第 1、第 2 主成分の双方において解糖系を構成する多くの代謝物の負荷量が高値であったため、著者らは解糖系に着目することとした。解糖系を構成する 3-phosphoglyceric acid (PG)、2-PG、phosphoenolpyruvate (35)、lactic acid は、高濃度酸素曝露を受けた成獣の肺において新生仔の肺よりも高い値を示した。また、これらの代謝物は高濃度酸素により成獣マウスの肺において増加を認めたが、新生仔マウスの肺においては有意な変化を示さなかった。

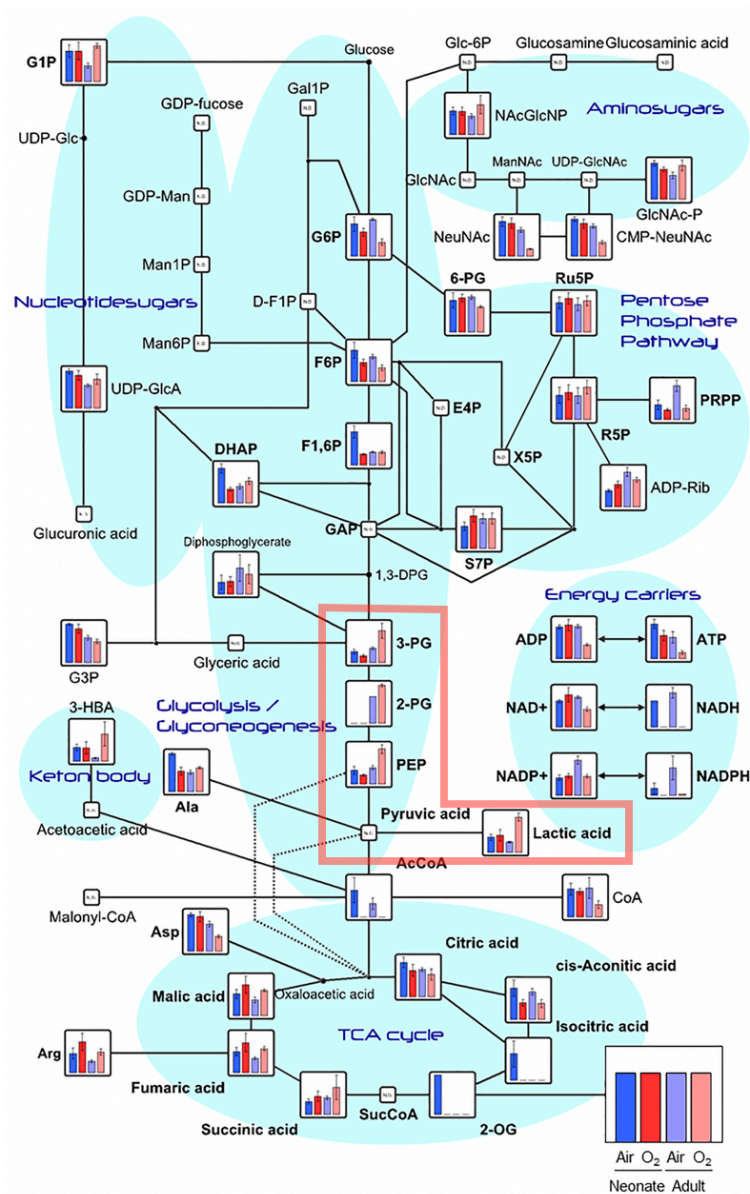


図 6 代謝経路マップ（一部抜粋）上に示した解糖系、TCA 回路に関するメタボローム解析の結果

解糖系を構成する 3- phosphoglyceric acid (PG)、2-PG、phosphoenolpyruvate (35)、lactic acid は、高濃度酸素曝露を受けた成獣の肺において新生仔の肺よりも高い値を示した。新生仔 n=8、成獣は雄雌それぞれ n=4。

文献(34)より引用一部改変。

高濃度酸素曝露を受けた成獣マウス肺における PDH 酵素活性の低下

代謝経路マップ上に示したメタボローム解析の結果から酸素曝露による代謝物の変化を俯瞰し、これまでに明らかとなった高濃度酸素曝露後の新生仔と成獣マウスの肺における解糖系の代謝の違いは、ピルビン酸を acetyl-CoA (acetyl coenzyme A) へと変換する酸化的脱炭酸反応の変化に起因するのではないかと推測した。同反応は、PDH によって促進されていることが知られている。そこで、この PDH の酵素活性を測定したところ、室内気に比べて高濃度酸素曝露を受けた成獣マウスの肺において有意に活性が低下していることが明らかとなった (図 7)。一方、新生仔の肺においては高濃度酸素曝露による酵素活性の低下は認められなかった。

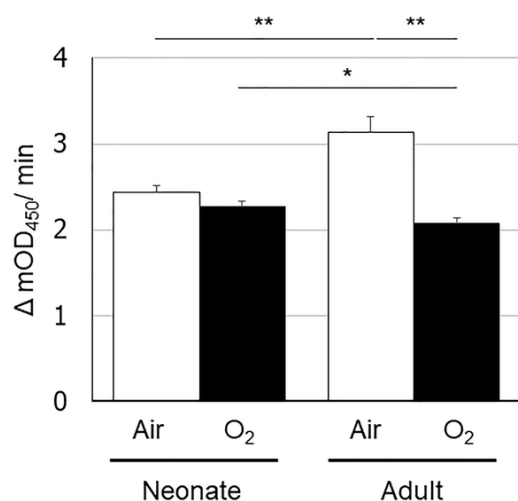


図 7 酸素曝露マウスにおける PDH 酵素活性

PDH の酵素活性は、成獣の肺では酸素曝露後には低下するが、新生仔では同様の変化は認められない。新生仔 n=24、成獣は雄雌それぞれ n=12。2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。* p<0.05、** p<0.01

Air：正常酸素群、O₂：高濃度酸素曝露群、Neonate：新生仔、Adult：成獣
文献(34)より引用一部改変。

高濃度酸素曝露後の肺における Pdk4 mRNA およびタンパク質発現量の違い

高濃度酸素曝露後の成獣の肺において酵素活性が低下することが明らかとなった PDH は、PDK によるセリン残基の可逆的リン酸化によるピルビン酸脱炭酸反応の阻害を介して活性の制御が行われている(36)。PDK は組織特異的な 4 つのアイソザイムが存在し、PDK1 および PDK2 は多くの細胞に発現し、PDK3 は主に精巣、PDK4 は主に代謝ストレス下の筋肉に発現しているということが知られている(37)。このうち PDK4 はミトコンドリアマトリクスに存在し、哺乳類の細胞において PDH 複合体

を直接的に阻害することによりグルコース酸化や脂肪酸の代謝の速度の調節を行なっている。そこで、室内気で飼育ないし高濃度酸素曝露を受けた新生仔および成獣マウスの肺において *Pdk1*、*Pdk2*、*Pdk3*、*Pdk4* の mRNA の発現を定量的 PCR 解析で定量し、酸素曝露が *Pdk* の各アイソザイムの発現に及ぼす影響を調べた（
図 8）。酸素曝露後の肺では、*Pdk4* の mRNA の発現量のみが有意な変化を示し、*Pdk1*、*Pdk2*、*Pdk3* については、新生仔と成獣いずれにおいても酸素曝露によって有意な変化を認めなかった。正常酸素濃度における成獣マウス肺の *Pdk4* の発現は、新生仔に比して高値であった。さらに、*Pdk4* の発現は高濃度酸素曝露によって成獣と新生仔のいずれにおいても上昇を示すが、新生仔肺の *Pdk4* は高濃度酸素曝露による上昇後であっても、正常濃度酸素下の成獣肺の *Pdk4* の発現量より低値であった。*Pdk4* の酸素曝露による発現の変化を変化率で評価すると、成獣において変化率が大きい傾向を認めたが有意差は認めなかった。

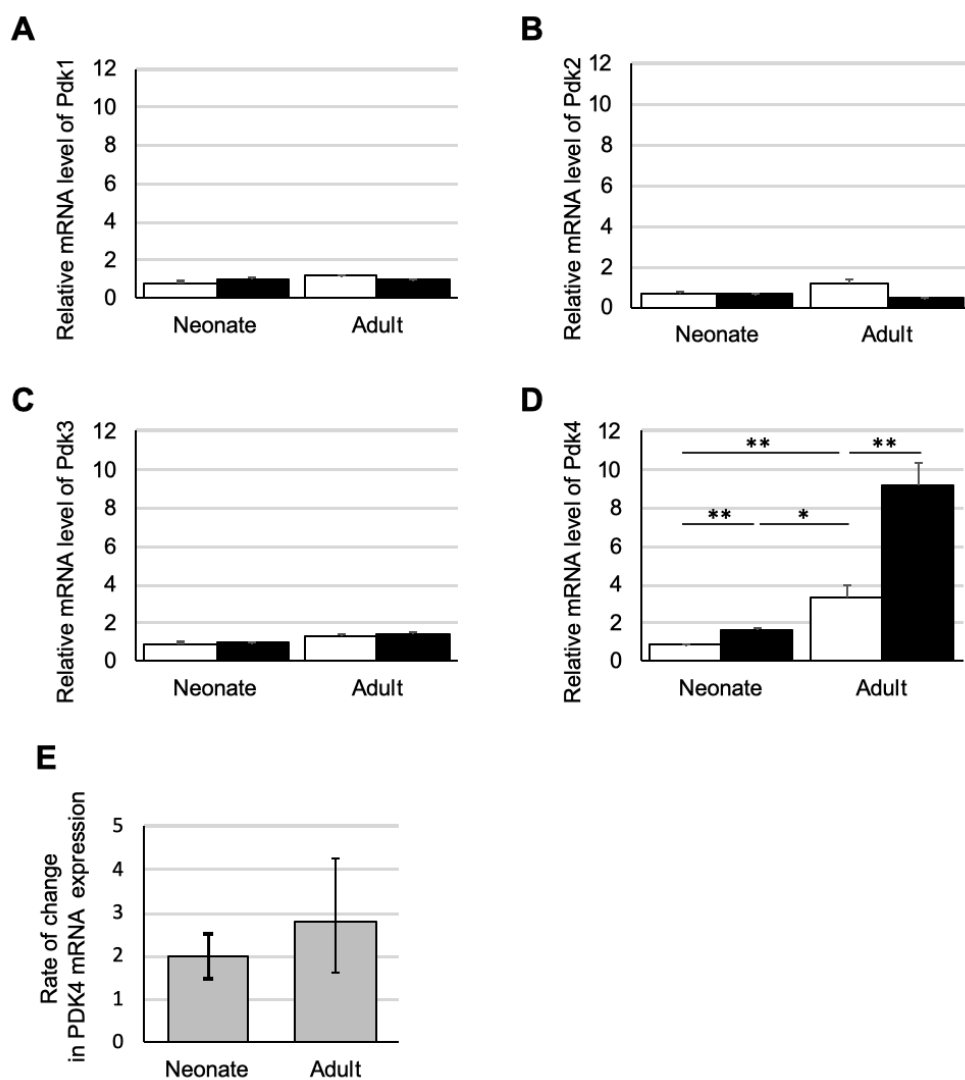


図 8 酸素曝露マウスにおける *Pdk1*、*Pdk2*、*Pdk3*、*Pdk4* の mRNA の発現量

(A-D) 定量的 PCR 解析により新生仔および成獣における高濃度酸素曝露後の *Pdk1* (A)、*Pdk2* (B)、*Pdk3* (C)、*Pdk4* (D) の mRNA の発現量を測定した。酸素曝露後の肺では *Pdk4* の mRNA 発現は上昇し、上昇は特に成獣において顕著であった。*Pdk1*、*Pdk2*、*Pdk3* の mRNA の発現は酸素曝露により変化しなかった。(E) *Pdk4* の酸素曝露の有無による発現の変化率を示した。成獣において変化が大きい傾向を認めたが、有意差は認めなかった。新生仔 n=12、成獣は雄雌それぞれ n=6。2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。変化率の比の信頼区間はデルタ法により算出。

* p<0.05、** p<0.01

Air：正常酸素群、O2：高濃度酸素曝露群、Neonate：新生仔、Adult：成獣
文献(34)より引用一部改変。

定量的 PCR 解析において酸素曝露後に発現が上昇した Pdk4 について、マウス肺を用いてウェスタンブロットによるタンパク質発現の評価を行なった。高濃度酸素の曝露を受けた成獣のマウス肺では Pdk4 のタンパクの発現が上昇するが、新生仔の肺では酸素曝露を受けても Pdk4 タンパクの有意な発現上昇は見られなかった (図 9A、B)。また、Pdk4 タンパクの発現の局在について、肺組織の免疫組織染色で評価を行った。免疫組織化学的な染色は 4 群全てにおいて主に終末細気管支の上皮に見られた (図 9C)

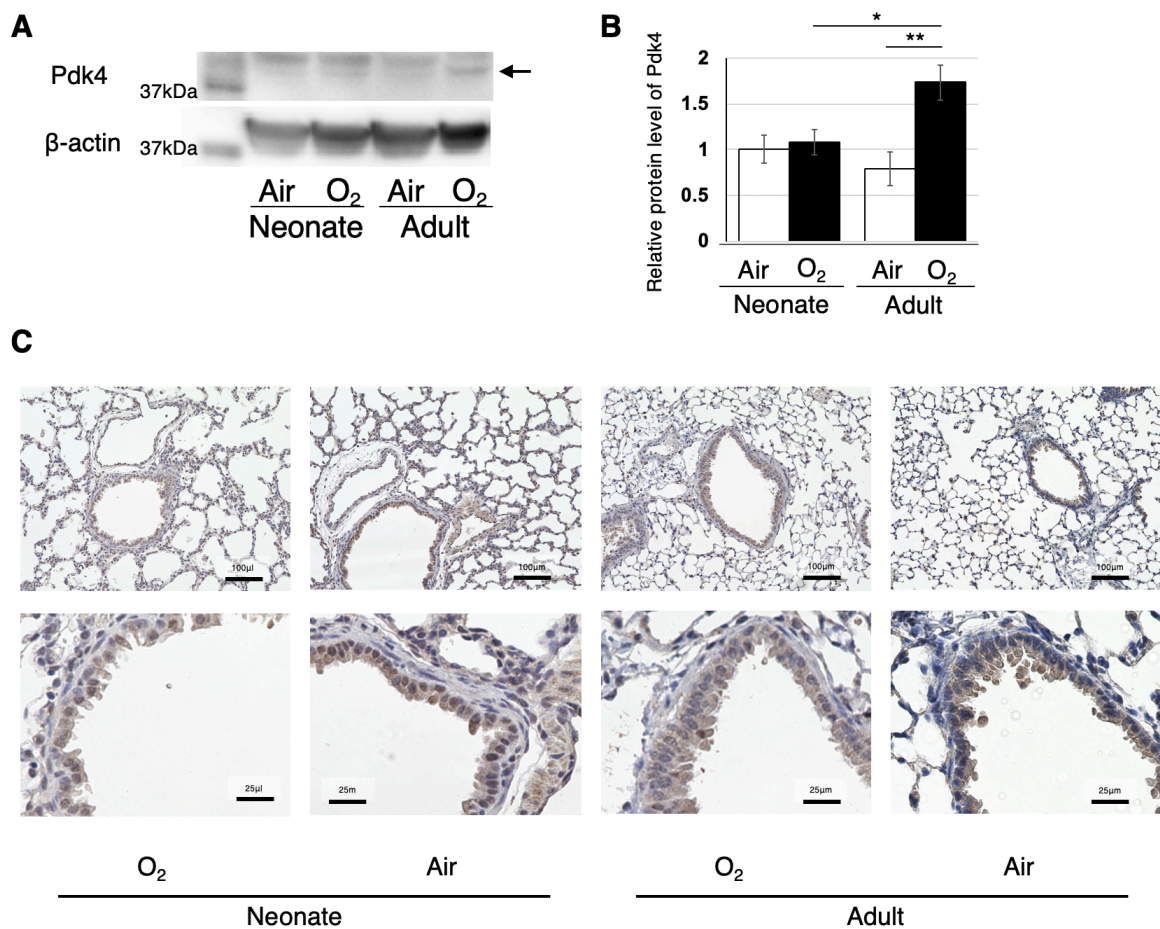


図 9 ウェスタンブロットおよび免疫組織染色による Pdk4 発現の確認

(A,B) 酸素曝露後の肺における Pdk4 の発現をウェスタンブロットで解析した。成獣のみで酸素曝露により Pdk4 タンパク質の発現が上昇した。新生仔 n=12、成獣は雄 n=6。2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。* p<0.05、** p<0.01

(C) 酸素曝露後の肺における Pdk4 タンパク質の免疫染色では、成獣/新生仔、酸素曝露の有無に関わらず 4 群全てにおいて主に終末細気管支の上皮で染色を認めた。scale bar = 100μm (上段)、25μm (下段)

文献(34)より引用一部改変。

V. 考察 1

1. 高濃度酸素曝露後の新生仔と成獣マウスに対するメタボローム解析について

本研究はメタボローム解析を用いて新生仔と成獣マウスの肺における代謝物プロファイルの違いを同定した最初の研究である。著者らの解析により酸素曝露後の新生仔と成獣マウスの肺において解糖系-TCA 回路を構成する 3-PG、2-PG、PEP、lactic acid といった代謝物プロファイルに大きな差異があることが明らかとなった。

また、このような成獣における高濃度酸素曝露に伴う解糖系の亢進は、高濃度酸素曝露による肺の Pdk4 の発現上昇とそれにより引き起こされる PDH の活性低下に起因すること、そして同様の現象は新生仔においては見られないことを発見した。これらの知見は成獣と新生仔における高濃度酸素への感受性の違いに関わる機序の一端を説明するものと考えられる。

酸素曝露が肺へ及ぼす影響について、トランスクリプトーム解析やプロテオミクス解析といったメタボローム解析以外のオミックス解析の技法を用いた研究は、これまでも様々な条件において行われている。特に、我々が注目している早産児における BPD や成人における HALI といった病態では、男性性が独立したリスク因子であることが知られていることから、高濃度酸素曝露への感受性の性差に関してオミク

ス解析を用いた比較が行われている(38-40)。Coarfa らは RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を用いて高濃度酸素曝露後の新生仔マウスの雄雌間の比較を行い、血管新生、低酸素応答、炎症反応、p53 に関する経路に性特異的な変化を認めたことを報告した(38)。また、Cheng らは高濃度酸素曝露後の新生仔マウスの雄雌においてプロテオーム解析による比較を行い、酸素曝露後のプロテオーム発現プロファイルが性特異的に異なること、雄において p53 に関連する経路の発現が上昇し、雌において酸化リン酸化に関する発現が低下することを報告した(39)。Lingappan らは成獣を対象として高濃度酸素曝露後の雌雄のマウス肺を用いてマイクロアレイ解析を行い、性特異的なトランスクリプトームの違いを同定し、MAP kinase および NF- κ B に関連するシグナル経路が肺の酸素障害への感受性の違いに関わっている可能性があることを報告した(40)。以上のように性差に関する研究は進んでいるものの、我々が着目した齧歯類の成獣と新生仔間における高濃度酸素曝露に対する耐性の違いに関してオミックス解析による研究は行われておらず、これまでに酸素曝露後の成獣と新生仔の間のオミックス解析により比較したデータは報告されていない。

著者らのメタボローム解析では、高濃度酸素曝露後の成獣のマウス肺においてピルビン酸を acetyl-CoA へと変換する酸化的脱炭酸反応よりも上流に位置する解

糖系の代謝物（3-PG、2-PG、PEP、lactic acid）が上昇していることを示した。一方、新生仔マウスの肺では同様の代謝物の上昇は認められなかった。解糖系は 10 段階の反応によってグルコースをピルビン酸へと変換し、2分子の adenosine triphosphate (ATP) と 2 分子の還元型 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) を生成する反応である (41)。解糖系の最終段階では中間代謝物である 3-PG は 2-PG と PEP へと合成された後にピルビン酸に変換され、同時に adenosine diphosphate (ADP) から ATP が産生される。その後、ピルビン酸は PDH によって acetyl CoA に変換され TCA (tricarboxylic acid) 回路へ流入する (図 10)。解糖系およびミトコンドリアの電子伝達系における酸化リン酸化は細胞内のエネルギー産生において重要な経路であるため、齧歯類の成獣を用いて高濃度酸素曝露が解糖系およびミトコンドリア代謝に与える影響について検討した研究はこれまでも報告が行われてきた(42-46)。

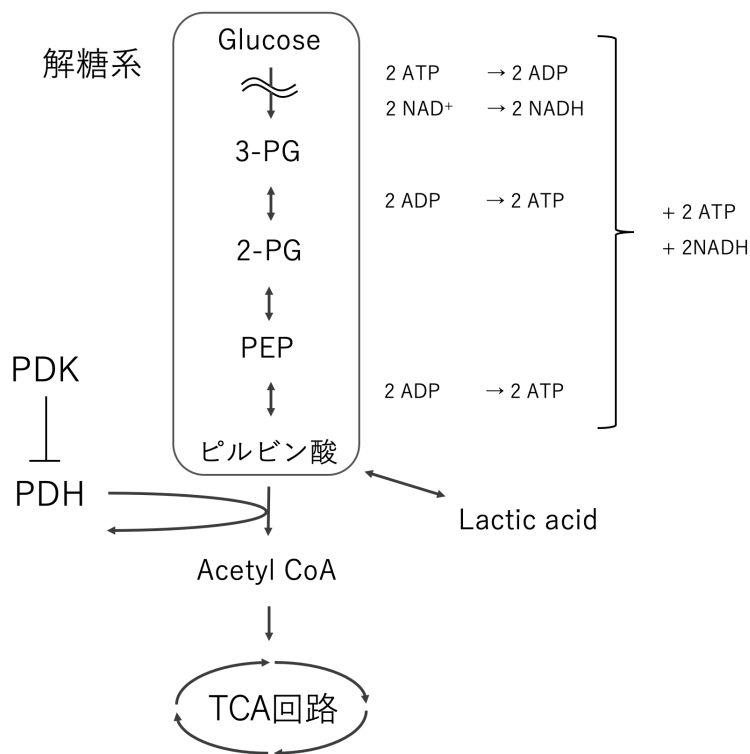


図 10 解糖系から TCA 回路に至る代謝経路の概略図

3-PG： phosphoglyceric acid、2-PG： phosphoglyceric acid、
 PEP： phosphoenolpyruvate、PDH： Pyruvate dehydrogenase、
 PDK: PDH kinase、Acetyl CoA： acetyl coenzyme A

高濃度酸素曝露の解糖系に関しては、未だ不明な点が多いものの、高濃度酸素曝露下では解糖速度が上昇すること、TCA 回路における代謝が阻害されることが報告されている(42, 47-49)。また、Simon らの研究により解糖系の重要な酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホフルクトキナーゼといった酵素の活性は高濃度酸素曝露により低下しないことも示されている(48)。これらの結果は、今回我々が得たメタボローム解析の結果と一致する。

ミトコンドリア代謝に着目した研究では、Bassett らが高濃度酸素曝露後グルコース灌流を行なったラット肺においてミトコンドリア活性とグルコース代謝の変化を測定しており、ピルビン酸分解の速度が低下し、lactic acid 生成が増加したことを報告している(43,44)。この結果は、高濃度酸素によるエネルギー代謝阻害の主要な段階は解糖系ではなくピルビン酸のミトコンドリア代謝である可能性を示しており、著者らの結論と矛盾しないものであった。Bassett らは、さらに肺のミトコンドリアのエネルギー生成経路に着目してさらに研究を進め、酸素曝露によってミトコンドリアにおけるピルビン酸とパルミチン酸の代謝が障害を受けること、また TCA 回路の中間代謝物の比較からイソクエン酸脱水素酵素が高濃度酸素による酵素活性の低下を受ける部位と推測されることを報告した(45)。しかし、後者の点においては著者らのメタボローム解析の結果はこの点を裏付けるものではなかった。また、Kumuda らも同様にミトコンドリア機能に着目した研究を行っており、2型肺胞上皮細胞におけるミトコンドリア機能の解析において高濃度酸素曝露は解糖系のエネルギー代謝を有意に低下させるとともに、ミトコンドリア複合体 I と II の機能不全によりミトコンドリア電子伝達系の障害を引き起こすことを示している(46)。以上のような研究はあるものの、現時点では高濃度酸素曝露がミトコンドリア代謝に与える影響に関しても

十分には解明されているとは言えない。

2. 高濃度酸素曝露後の PDH 活性の変化および PDK による調節について

著者らはメタボローム解析の結果を受けて、① 高濃度酸素曝露に対する感受性の違いは上記の解糖系における代謝の違いが寄与している、② この解糖系における代謝の違いは、成獣マウス肺において高濃度酸素曝露により PDH が阻害されることによるものである、という仮説を立て検証を行なった。PDH の酵素活性の測定では、室内気では新生仔に比して成獣で酵素活性が高いが、酸素曝露後は成獣マウスの肺においてのみ有意に活性が低下し新生仔よりも低値となった。PDH の酵素活性の制御を行っている主要な機序としては、Pdk を介したものが知られている。Pdk の 4 つのアイソザイムに対して定量的 PCR 解析を行ったところ、Pdk4 のみが新生仔、成獣ともに高濃度酸素曝露に伴い上昇していた。ただし、酸素曝露の有無に関わらず、新生仔では成獣に比して Pdk4 の mRNA は低発現であった。また、酸素曝露による Pdk4 の発現の変化は、新生仔 (2.0 倍) に比して成獣 (2.8 倍) において変化率が大きい傾向を認めたが、二変量の比の比較であることもあり新生仔と成獣間で変化率に有意差を示すことはできなかった。一方、Pdk4 のタンパクレベルでの酸素曝露による発現変

化を比較すると、成獣では mRNA の結果と一致して有意な上昇を認めたが、新生仔では mRNA レベルでは有意な上昇を示したにも関わらず変化は認めなかった。

今回得られたこれらの結果は、高濃度酸素曝露の結果、成獣においてのみ Pdk4 タンパクが上昇し、結果として成獣においてのみ PDH の活性が低下していたという点において、解糖系における成獣と新生仔間の代謝に違いがあるとする仮説に合致するものであった。しかし、定量的 PCR 解析の結果は、Pdk4 mRNA は成獣と新生仔ともに有意に上昇しており、その上昇率も成獣と新生仔において有意な差を認めず、Pdk4 タンパクにおける高濃度酸素への反応が成獣と新生仔の間で異なることを明確に説明できるものではなかった。定量的 PCR 解析の結果がウェスタンブロット解析、PDH の酵素活性アッセイの結果と乖離した理由については、まず、成獣と新生仔の間で mRNA の転写後調節が異なり、タンパク発現に違いが生じている可能性が挙げられる。mRNA の発現定量によるタンパク発現の推定は、microRNA による翻訳抑制など転写後調節による影響を受けるため間接的な推定に過ぎず、mRNA の発現量は必ずしもタンパク発現とは相関しないことが報告されている(50)。また、新生仔の Pdk4 の mRNA 発現は酸素曝露の前後いずれの条件においても成獣に比して低いレベルの発現に留まっており、新生仔においては酸素曝露よりもベースの発現の低さがタンパク

の発現量に影響している可能性も考えられた。mRNA 発現の結果は我々の仮説を十分に裏付けるものではなかったものの、タンパク質発現はセントラルドグマの最終過程にあたり表現型をより反映するものと考えられるため、Pdk4 による負の制御によって成獣では PDH の活性が低下したと結論づけた。

酸素曝露と PDH 活性の関連に関しては、1980 年代に Kimura らが酸素曝露を行なったラットにおいて PDH 活性の測定を行ない、生後 6 日間にわたって酸素曝露を受けた新生仔ラットの PDH 活性は対照群と比較して 45%低下したことを報告している(51)。我々の実験でも、高濃度酸素曝露を行なった成獣マウスの肺において PDH の活性は有意に低下しており、Kimura らの結果と一致するものであった。一方、同様の変化は高酸素に晒された新生児の肺では認められなかった。

肺の酸素障害における Pdk4 の役割に着目した研究としては、先に挙げた高濃度酸素性肺障害への感受性の性特異的な違いに関する Lingappan らの研究で触れられている(40)。同研究では、高濃度酸素曝露を行った雌雄の成獣マウスの肺を用いてマイクロアレイ解析による比較を行い、高濃度酸素性肺障害への感受性の性差を生じる肺内トランスクリプトームの違いの検討、候補遺伝子の同定を行なっている。マイクロアレイ解析の結果、雄のマウスにおいてのみ上昇した発現変動遺伝子の一つとし

て Pdk4 遺伝子が同定されている。この結果は酸素に対する耐性が低い群において Pdk4 の発現が高いという点で著者らの行った結果と一致するものである。また、我々の定量的 PCR 解析でも、性差を比較する目的ではなく比較に十分なサンプル数ではないため統計学的に有意な差は認められなかったものの、高濃度酸素曝露後の雄の Pdk4 の発現が雌に比して高い傾向が確認された。

3. 高濃度酸素性肺障害における成獣と新生仔の解糖系代謝の違いに関する今後の研究の展開

本研究では、高濃度酸素曝露後の成獣および新生仔のマウス肺を用いてメタボローム解析を行なった。メタボローム解析は特定の条件における代謝物を包括的に解析することで生理現象を瞬間的なスナップショットとして理解することを可能とするが、それら反応の経路や因果関係を指し示すものではない。我々の研究においても、高濃度酸素曝露への感受性が異なる成獣と新生仔において、酸素曝露による解糖系を構成する代謝物のプロファイルの変化に違いがあることを示し、さらには、これらの代謝物の違いを生じている機序について、既に制御の経路が知られている範囲で検討を行なったものである。しかし、本研究で得られた結果からは、高濃度酸素曝

露がどのような機序で成獣において Pdk4 の発現を誘導しているか、解糖系の代謝の違いがどのような機序で呼吸予後を悪化させているのか、また、成獣と新生仔における解糖系の代謝の違いはどのような生物学的な意味を持つのかは不明である。新生仔と成獣のマウスの高濃度酸素曝露に対する感受性の違いを理解していくためには、これらのギャップについてさらなる検討を行なっていく必要がある。

今後、本研究の明らかにしていくべき課題として、今回明らかとなった高濃度酸素曝露による Pdk4 の発現上昇とそれに伴う PDH の酵素活性の低下という現象と成獣における低い酸素耐性の因果関係を示す必要がある。この点については、高濃度酸素曝露下の成獣において Pdk4 を阻害することで HALI の重症度へ及ぼす影響の評価を行う予定である。Pdk4 の阻害に際しては、ジクロロ酢酸 (dichloroacetate:DCA) を用いた実験系および Pdk4 欠損マウスを用いた実験系を計画している。DCA は Pdk の低分子阻害剤で、以前よりヒトの遺伝性ミトコンドリア代謝性疾患および乳酸アシドーシスの治療に使用されている(52)。高濃度酸素曝露下の成獣において飲水中に DCA を加えることにより Pdk4 の発現を阻害し、酸素曝露終了後の生存率や動脈血液ガスによってその効果の評価を行う。また、Pdk4 欠損マウスは既に同遺伝子の欠損マウスの系統が確立されており入手も容易である。そこで、この遺伝子改変マウスを用

いることで Pdk4 の発現を抑制下における酸素曝露を行い、酸素曝露終了後の生存率や動脈血液ガスといった評価を行う。これらの実験により、高濃度酸素曝露下において Pdk4 を介した PDH の活性低下を抑制することで HALI の重症化そして高濃度酸素に対する耐性低下を軽減することが可能であるかを検証する。以上の課題を明らかにすることで、Pdk4 抑制などの解糖系代謝への介入による高濃度酸素性肺障害の予防的治療という新たな治療戦略を切り開くものになり得ると考える。

VI. 小括 1

高濃度酸素曝露により成獣マウスの肺において 3-PG、2-PG、PEP、lactic acid などの解糖に関連する特定の代謝物が増加するが、新生仔マウスの肺においては同様の反応は見られない。成獣マウスの肺におけるこれらの代謝物レベルの増加は、PDH の負の調節因子である Pdk4 の高濃度酸素曝露による発現上昇に伴い PDH の酵素活性が低下することが原因であると考えられる。以上の結果は、マウスの新生仔と成獣における高濃度酸素曝露に対する耐性の違いの機序について一つの説明となるとともに、今後の高酸素性の急性肺損傷および急性呼吸窮迫症候群を予防するための新たな治療戦略に繋がるものと期待される。

VII. 目的 2

1. 新生児慢性肺疾患動物モデルを用いて、高濃度酸素曝露後回復期に肺内で発現変化を示す遺伝子の解析を行い、新生児慢性肺疾患の機序解明および新規バイオマーカーの開発の足掛かりとする。
2. 上記 1 で同定されたヒアルロン酸プロテオグリカン結合タンパク質 1 (Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1 : *Hapln1*) 遺伝子の高濃度酸素性肺傷害・修復過程における果たす役割および機能を調べることで、新生児慢性肺疾患の病態および発症機序を細胞外基質の関わりという視点で明らかにする。

VIII. 方法 2

1. 動物

全ての実験の手順は埼玉医科大学動物実験委員会の承認(実験承認番号 2780)のもと、アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health) の「実験動物の管理と使用に関する指針」および埼玉医科大学のガイドラインに準拠して行われた。実験に際しては、実験動物の苦痛をできる限り軽減できるように最大限の配慮を行なった。各マウスは 12 時間の明暗サイクルの環境下で飼育し、餌と水は自由摂取とした。

BPD マウスモデルにおける網羅的遺伝子発現解析アレイおよび *Hapln1* 定量 PCR では、野生型マウスとして C57BL/6J マウス (SLC, Hamamatsu, Shizuoka, Japan) の新生仔 (生後 12 時間以内) を用いた。 *Hapln1* 欠損マウスを対象とした実験においては、欠損マウスとして B6N(Cg)-*Hapln1*^{tm1.1(KOMP)Mbp}/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) のホモ接合体を用いた。後述するように *Hapln1* 欠損ホモ接合体は出生後速やかに死亡するため、同改変遺伝子のヘテロ接合体である成獣を掛け合わせて得られた母体より胎齢 18.5 の胎児肺を採取し、genotyping により遺伝子型を決定して *Hapln1* 欠損ホモ接合体の胎児肺のみを用いた (図 11)。Genotyping は尾の先端の組織を用いた PCR により確定した。

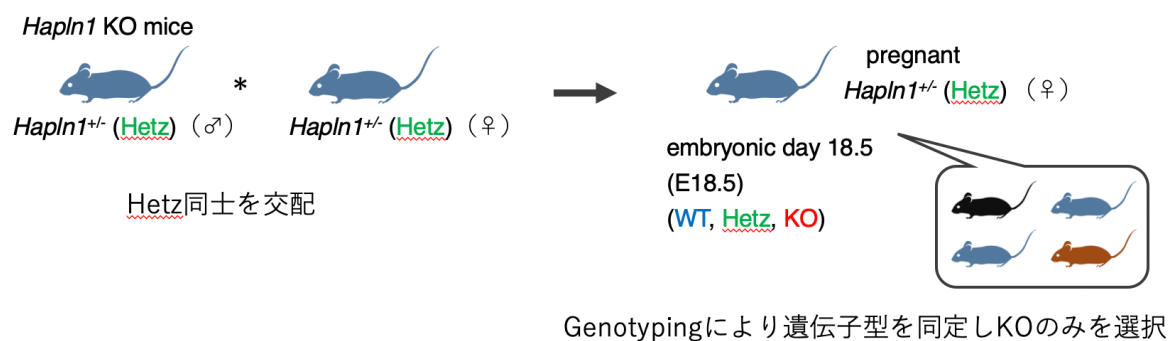


図 11 Hapln1 欠損ホモ接合体マウスの胎仔の作成方法

Hapln1 欠損ホモ接合体のマウスは致死性であるため、Hapln1 欠損遺伝子ホモ接合体の胎仔はヘテロ接合体同士の交配によって得た。

KO：欠損ホモ接合体、 Hetz：欠損ヘテロ接合体、 WT：野生型

2. 新生児慢性肺疾患（BPD）モデル

BPD モデルとして、新生仔マウスに対して出生直後から 96 時間の高濃度酸素曝露（95%）を行うモデルを用いた。高濃度酸素への曝露は酸素濃度および二酸化炭素濃度の持続モニタリング・調節が可能なチャンバー（BioSpherix, Redfield, NY）内で母獣とともにを行い、出生後速やかに酸素曝露を開始し 96 時間で終了とした。母獣への高濃度酸素の影響を軽減するため、出産日の近いマウスの母仔を室内気で並行して

1 組飼育し、母獣のみ 24 時間ごとに室内気環境と高濃度酸素環境で入れ替えを行った。チャンバー内は大気圧に保たれ、酸素曝露中もマウスは 12 時間の明暗サイクル

の環境下で飼育した。

高濃度酸素曝露は遺伝子の発現変化へ大きな影響を与えるため、酸素曝露中
ないし終了直後の遺伝子発現解析では非常に多くの遺伝子の変動を示し、候補遺伝子
の絞りこみが困難となることが予想された(53)。そこで、著者らは酸素曝露終了から
3日間の回復期をおいた日齢7の肺組織を用いて網羅的遺伝子発現解析アレイを行う
ことで、主に肺障害からの回復という視点で候補遺伝子を絞り込むことにした(図
12A)。その後に行なった候補遺伝子に対する定量的PCR解析では、mRNA発現の経
時的変化を見るため酸素曝露前、曝露終了直後(日齢4)、日齢7、日齢14、週齢8の
肺を採取して評価を行なった(図12B)。

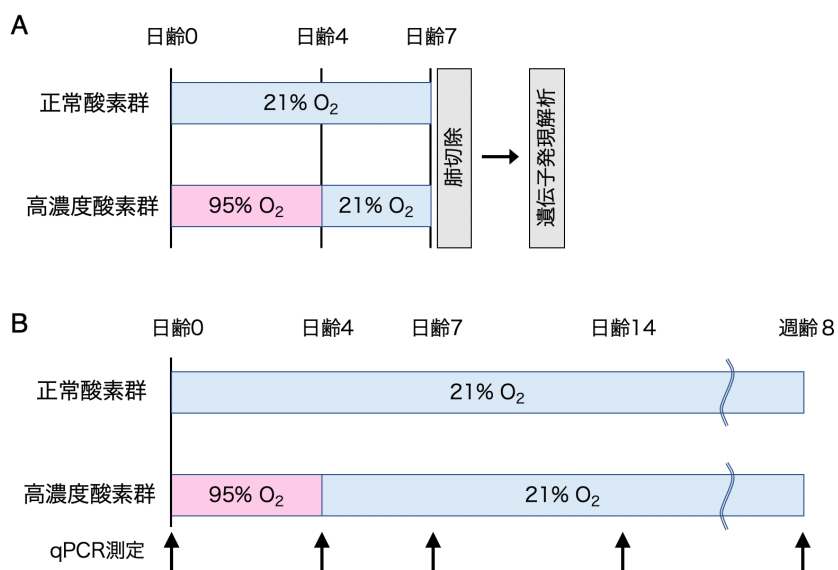


図 12 慢性肺疾患マウスモデル各群の処置

(A) 網羅的遺伝子発現解析アレイにおける慢性肺疾患マウスモデルの各群の処置。正常酸素群（対照群）では酸素曝露を行わず室内気で飼育、高濃度酸素群では日齢 0 より 96 時間の 95% 酸素曝露を行った。両群とも日齢 7 で肺を切除し解析を行なった。

(B) 定量的 PCR 解析における慢性肺疾患マウスモデルの各群の処置。高濃度酸素曝露は (A) と同様に行い、肺組織の採取を両群とも日齢 0、4、7、14、週齢 8 に行なった。

3. 肺組織検体の採取

マウスはペントバルビタール腹腔内投与(50 mg/kg)による麻酔を行い、右心室を介して肺を PBS で十分に灌流し、速やかに右肺を切除することで安楽死させた。

切除した右肺は液体窒素で急速冷凍し、以降の解析のために -80°C で保存した。その後、マウスを気管切開して 24 G 静脈留置カテーテルを挿入し、左肺に 10% 中性緩衝

ホルマリンを 25cm H₂O 圧で注入し肺門部で結紮して固定した。左肺は摘出し 4°C で一晩固定した後、パラフィン包埋標本とし、5 μm の切片を切り出して使用した。胎仔肺の採取に際しては、母体マウスは頸椎脱臼により安楽死させ、取り出した胎仔から上記方法で肺の採取を行った。

4. 網羅的遺伝子発現解析アレイと定量的 PCR 解析

網羅的遺伝子発現解析アレイでは、野生型マウスの新生仔（生後 12 時間以内）を正常酸素群（室内気）（n=6）と BPD モデルである高濃度酸素群（95%O₂）（n=6）の 2 群にランダムに割り当てた。肺の酸素障害からの回復期に着目するため、網羅的遺伝子発現解析アレイは酸素曝露終了から 72 時間後に採取した肺を用いて行なった。-80°C で保存していた右肺組織を液体窒素中で破碎し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は濃度測定、および品質チェックを行った。アレイは GeneChip Mouse Gene 2.0 ST Array (Thermo Fisher Scientific) を使用した。GeneChip 3' IVT PLUS Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) および GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてアレイの染色および洗浄を行い、専用スキャナによりアレイの画像を取得した。

Affymetrix GeneChip Command Console Software (Thermo Fisher Scientific) を用いて画像データを数値化し Raw データを得た。Affymetrix Expression Console Software (Thermo Fisher Scientific) によりデータの正規化などの前処理を行ない、遺伝子発現データを得た。GeneSpring GX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用して、遺伝子ごとの群間の比較、および Gene Ontology (GO) 解析を行った。発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes (DEGs)) は Welch の T 検定で $P\text{-value} \leq 0.05$ かつ発現量が 1.5 倍以上または 0.67 倍以下であった遺伝子とした。

定量的 PCR 解析では、正常酸素群 (室内気) と高濃度酸素群 (95%O₂) の 2 群において日齢 0、4、7、14、週齢 8 に肺組織の採取行なった (各条件いずれもそれぞれ $n=3$)。方法 1-7 と同様に酸素曝露後の肺より抽出した total RNA で cDNA を合成し、*Hapln1* 遺伝子について TaqMan fluorogenic detection system を用いた PCR 解析を行なった。また遺伝子の発現量は、高濃度酸素曝露により発現が変化しない *β -glucuronidase* によって補正を行なった。

5. 免疫組織染色

野生型マウスの肺組織を用いて、免疫組織染色による *Hapln1* の局在の評価

を行った。胎齢 18.5、日齢 4、週齢 8 のマウスより肺を採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋した肺組織切片に対して、脱パラフィン、浸水を行なった。切片を Antigen Unmasking Solution pH6 (H-3300; Dako, Glostrup, Denmark) によって処理し、3%過酸化水素水に 30 分間浸漬した。切片を一次抗体 (1:1000; Hapln1 (SY02-17) ; Novusbiochemicals, Centennial, CO, USA) とともに室温で 1 時間インキュベートした。免疫反応性を、HRP 標識 anti-rabbit IgG 二次抗体を用いた EnVision+ System (K4003; Dako) により検出した。切片は Mayer's Hematoxylin によって対比染色を行なった。

6. Hapln1 欠損ホモ接合体マウスの表現型解析および形態学的評価

胎齢 18.5 の Hapln1 欠損ホモ接合体の胎仔を用いて表現型の比較を行なった。Hapln1 欠損ホモ接合体 (n=5) および野生型の胎仔 (n=5) において、胎仔の肉眼的観察、摘出肺の肺体重比および肺湿乾重量比の測定を行なった。また、胎仔肺のパラフィン包埋肺組織切片を Mayer's hemalum solution と 1%Eosin-Ysolution を用いて Hematoxylin-eosin 染色し、光学顕微鏡による肺の形態学的評価、肺胞囊領域の分画の定量を行なった。肺胞囊領域の分画の評価法は、各群 5 匹ずつのマウスの肺それぞれにおいて 20 倍対物レンズで重複しない 5 視野を選び評価を行なった。肺の顕微鏡写

真に対して ImageJ software version 1.49 (NIH, Bethesda, MD, USA)用いて二値化による抽出を行い、総末梢肺領域 (total distal lung area) において肺胞囊領域 (air saccule area) が占める割合を計測した。また、同じ画像において単位面積当たりの肺胞数の計測も行った(54)。

7. 肺の細胞外マトリクス構成成分の測定

胎齢 18.5 の *Hapln1* 欠損ホモ接合体および野生型マウスの胎仔肺を用いて肺の細胞外マトリクス構成成分の測定を行なった。肺組織中のヒアルロン酸は *Hapln1* 欠損マウス (n=9)、野生型 (n=9) の胎仔肺を用いて Purple-Jelley Hyaluronic Acid Assay Kit (Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK) により測定した(55)。同キットでは、肺組織 (30mg) を溶解しタンパク質除去処理を行なった後、ヒアルロン酸のみを分離して Purple dye reagent を加えることで、ヒアルロン酸が色素と結合して凝集体を形成し検出可能となる。マイクロプレートリーダーにより各サンプルの 655nm の吸光度を測定し比色定量した。また、肺組織中の総コラーゲン量を *Hapln1* 欠損マウス (n=14)、野生型 (n=16) の胎仔肺 (30mg) を用いて QuickZyme Total Collagen Assay (QuickZyme Biosciences, Leiden, Netherland) により測定した。コラーゲンの酸加水分解によって得られたヒド

ロキシプロリン残基を Chloramine T/DMAB によって呈色させ、570nm の吸光度をマイクロプレートリーダーによって測定し比色定量した。

8. *Hapln1* 欠損マウスと野生型マウスの遺伝子発現の比較

胎齢 18.5 の *Hapln1* 欠損ホモ接合体 (n=3) および野生型マウス (n=3) の胎仔肺を用いて、方法 2-4 と同様の方法で RNA を抽出して使用した。アレイは GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Thermo Fisher Scientific) を用いてマイクロアレイ解析を行なった。アレイの方法および解析に関しては、方法 2-4 と同様の試薬および software を用いた。遺伝子ごとの群間の比較、および GO 解析もまた同様に行った。DEGs は Welch の T 検定で P-value \leq 0.05 かつ発現量が 1.5 倍以上または 0.67 倍以下であった遺伝子とした。

定量的 PCR 解析では、同定した DEGs より b PD に関連があると考えた 7 遺伝子に対して、胎齢 18.5 の *Hapln1* 欠損ホモ接合体 (n=6) および野生型マウス (n=6) の胎仔肺を用いて測定を行った。方法 1-7 と同様に酸素曝露後の肺から抽出した total RNA で cDNA を合成し、TaqMan fluorogenic detection system を用いた PCR を行なった。また遺伝子の発現量は、 β -glucuronidase によって補正を行なった。

9. 統計解析

網羅的遺伝子発現解析アレイにおける群間の比較は GeneSpring GX により Welch's t test を用いて行なった。定量的 PCR 解析、画像を用いた定量、細胞外マトリクス構成成分測定などにおける 2 群間の比較は R statistical package (version 3.5.2) を用いて実行した。値は means \pm standard error of the mean (SEM) として表現した。2 群間の比較は帰無仮説に対して Student's t test を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

IX. 結果 2

BPD マウスモデルを用いた BPD 関連遺伝子、遺伝子セットの探索

BPD の病態を肺障害からの修復に着目して明らかとするため、BPD マウスモデルを用いて網羅的遺伝子発現解析アレイによる関連遺伝子の探索を行なった。高濃度酸素曝露を行なった新生仔マウス (BPD モデルマウス) と正常酸素下の対照群において、酸素曝露終了後 3 日間の回復期の後に遺伝子発現の評価を行ない、発現の変動した遺伝子 (DEGs) を抽出した (図 13A)。正常酸素下の対照群と比較して高濃度酸素曝露群で発現が上昇した ($P\text{-value} \leq 0.05$ かつ発現量が 1.5 倍) 遺伝子は 83 個、正

常酸素下の対照群と比較して高濃度酸素曝露群で発現が低下した (P-value \leq 0.05 かつ発現量が0.67 倍) 遺伝子は 58 個であった。

網羅的遺伝子発現解析アレイの結果に対する GO 解析では、発現上昇遺伝子では細胞周期、細胞分裂に関連した Term が有意であり、また発現低下遺伝子ではホスホジエステラーゼ I 活性、細胞外領域などの Term が有意であった (図 14)。ただし、今回 GO 解析において有意な上昇とされた term のうち、cell cycle と cell cycle process、mitotic cell cycle は階層関係にあるため、同一遺伝子の変化の影響で複数の GO term の変動が有意な変化として検出されたものと思われた。BPD と細胞周期の関連は近年注目され、研究が盛んな領域である(56,57)。しかし、今回得られた発現変化率が上位の遺伝子において細胞周期に関連したアノテーションを有する有望な候補遺伝子は捉えることができなかった。

そこで DEG のうち、発現変化率が上位の遺伝子リストに着目し、個々にその背景を調べた。DEGs のうち変動の大きかった上位 5 つの遺伝子は、*Ccdc3* (Coiled-coil domain-containing protein 3)、*Prnd* (Prion-like protein doppel)、*Cpa3* (Carboxypeptidase A3)、*Hapln1* (hyaluronan and proteoglycan link protein 1)、*Fhl5* (Four And A Half LIM Domains 5) であった (図 13B)。このうち、ヒアルロン酸プロテオグリカン結合蛋白

質 1 (*Hapln1*) は肺においては肺間質組織の細胞周囲マトリクスを形成するアグリカン／ヒアルロン酸凝集体のアグリカンとヒアルロン酸の会合体を安定させるリンクタンパクである。近年、細胞外基質の炎症調節における役割が注目され、BPDにおいても少しずつ研究が報告され始めていることもあり(58)、同遺伝子を有望な候補遺伝子であると考え、注目して研究を進めることとした。なお、*Hapln1* 以外の他の変動の大きかった上位 5 つの遺伝子がコードするタンパクの機能は、それぞれ *Ccdc3* は内皮細胞における TNF- α 誘導性の炎症誘発性応答を調節する(59)、*Prnd* は精子の先体反応に不可欠な役割を果たす(60)、*Cpa3* は肥満細胞によって放出され LDL 粒子を構成するポリタンパク質 B を含むタンパク質とペプチドを分解する(61)、*Fhl5* は精子形成に関わる(62)と報告されている。

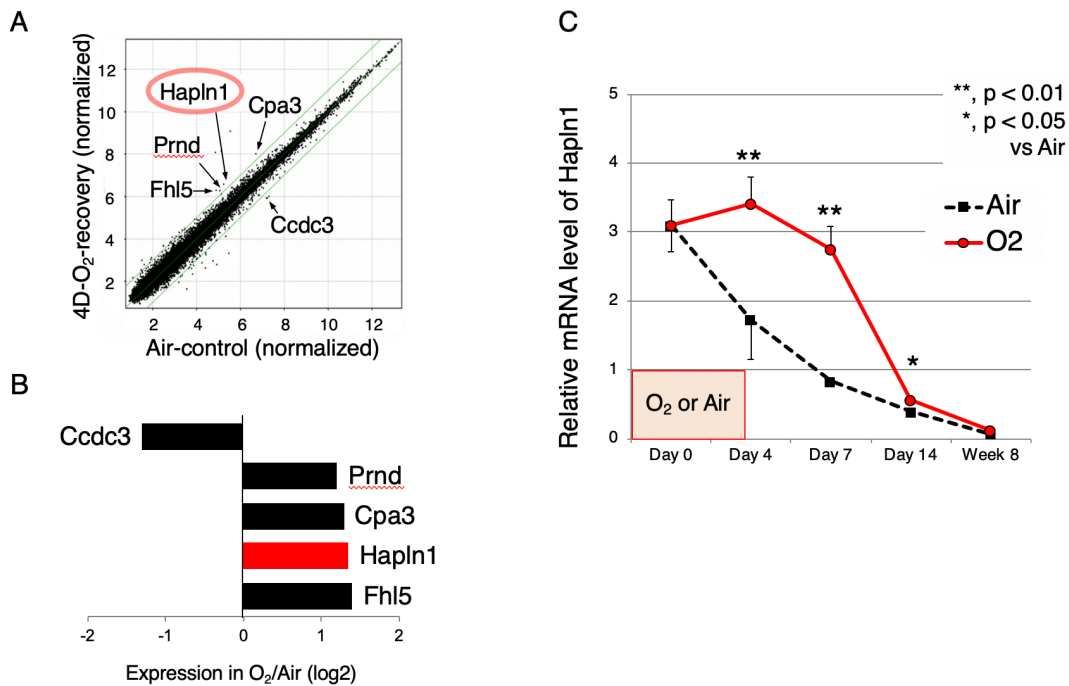


図 13 BPD モデルマウスに対する網羅的遺伝子発現解析アレイによる発現変動遺伝子の同定

(A) 遺伝子発現の全体図を Scatter Plot により示した。正常酸素群および高濃度酸素群の正規化した各遺伝子の発現量を、それぞれ X 軸、Y 軸に表している。正常酸素群 n=6、高濃度酸素群 n=6。(B) 発現変動が大きかった上位 5 つの遺伝子を示した。(C) 定量的 PCR 解析による Hapln1 遺伝子の発現量の経時的变化を示した。Hapln1 の mRNA における発現は酸素曝露開始後の日齢 4 より正常酸素群と比較して高値となり、正常酸素群に対しての有意な上昇は日齢 14 まで続いた。各群の各条件においていずれもそれぞれ n=3、2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。* p<0.05、** p<0.01

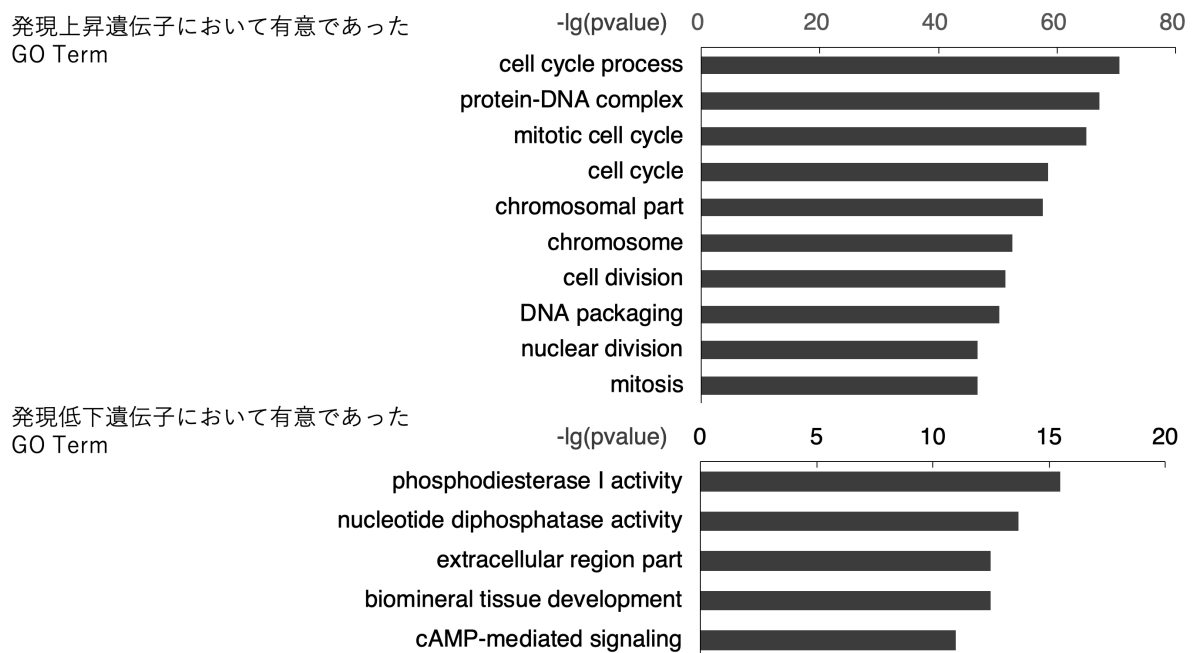


図 14 BPD モデルマウスにおける発現変動遺伝子に対する GO 解析

BPD マウスを対象とした網羅的遺伝子発現解析アレイの結果に対して、GO 解析を行なった結果である。発現上昇遺伝子では細胞周期、細胞分裂に関連した Term、また発現低下遺伝子ではホスホジエステラーゼ I 活性、細胞外領域などの Term が有意であった。

高濃度酸素曝露による *Hapln1* 遺伝子の発現の経時的変化を確認するため、定量的 PCR 解析を行なった。新生仔マウスの肺における *Hapln1* 遺伝子の mRNA 発現は、対照群では出生直後に高値を示しその後は次第に低下していく経過を辿った。しかし、高濃度酸素曝露を行なった新生仔マウスでは 96 時間の酸素曝露終了直後は出生時よりさらに上昇を示し正常酸素群と比較して高値となり、正常酸素群に対しての有意な上昇は日齢 14 まで継続することがわかった (図 14C)。

BPD モデルマウスにおいて *Hapln1* 遺伝子の発現が高濃度酸素曝露後から日齢 14 まで継続的に高値を示すことがわかり、著者らは同遺伝子が高濃度酸素による肺障害からの肺の修復において重要な役割を果たしているのではないかと考えた。そこで、まずは *Hapln1* タンパクのマウス肺における局在を確認するとともに、*Hapln1* を遺伝的に欠損させたマウスを用いた実験系で *Hapln1* の役割を明らかとすることを目指した。*Hapln1* 欠損ホモ接合体のマウスは、同遺伝子の欠損マウスの表現型について初めて報告した Watanabe らの研究で、ほとんど（約 93% ; 120/129 例）が出生直後に死亡すると報告されている(63)。我々の研究においても、*Hapln1* 欠損ホモ接合体マウスは全例が出生後速やかに死亡してしまい、長期の生存は困難であった。その死因に関しては、Watanabe らは死亡した新生仔マウスの肺胞が虚脱していることから、少なくとも部分的には上気道の軟骨の形成不全による気道閉塞ではないかと述べている。一方、*Hapln1* 欠損の心血管系への影響について調べた Wirrig らの研究では、*Hapln1* 欠損ホモ接合体のマウスの 71% (39/55 例) に心血管系の異常を認め、このうち 82% (32/39 例) が心室間/房室中隔の異常であったと報告している(64)。その他の心血管系の異常としては、両大血管右室起始症、大動脈騎乗、房室中隔欠損症、両房室弁左室挿入などが認められた。*Hapln1* 欠損ホモ接合体のマウスの死亡は出生直後に死亡し

ていることから、その死因には呼吸ないし循環系の重篤な合併症が寄与していると考えられる。しかし、心血管系の奇形の大部分を占めるとされる心室間/房室中隔の異常は一般的には生直後には致命的とならないため、上気道閉塞による呼吸不全が主たる死因ではないかと推測された。以上のように Hapln1 欠損ホモ接合体のマウスは出生後速やかに死亡してしまうため新生仔を用いた実験は困難であり、まずは Hapln1 欠損ホモ接合体マウスの胎仔を用いた実験を行うこととした。

Hapln1 タンパクはマウス肺においては主に終末細気管支の上皮細胞で発現

野生型マウスの肺組織を用いて、免疫組織染色により Hapln1 タンパクの局在を調べた。胎仔、新生仔、成獣いずれも終末細気管支の上皮細胞に強い染色を認め、Hapln1 タンパクの高発現が確認された (図 15)。また、肺静脈周囲においても染色を認め、新生仔および成獣では肺胞上皮細胞周囲においても広範に染色され発現を認めた。

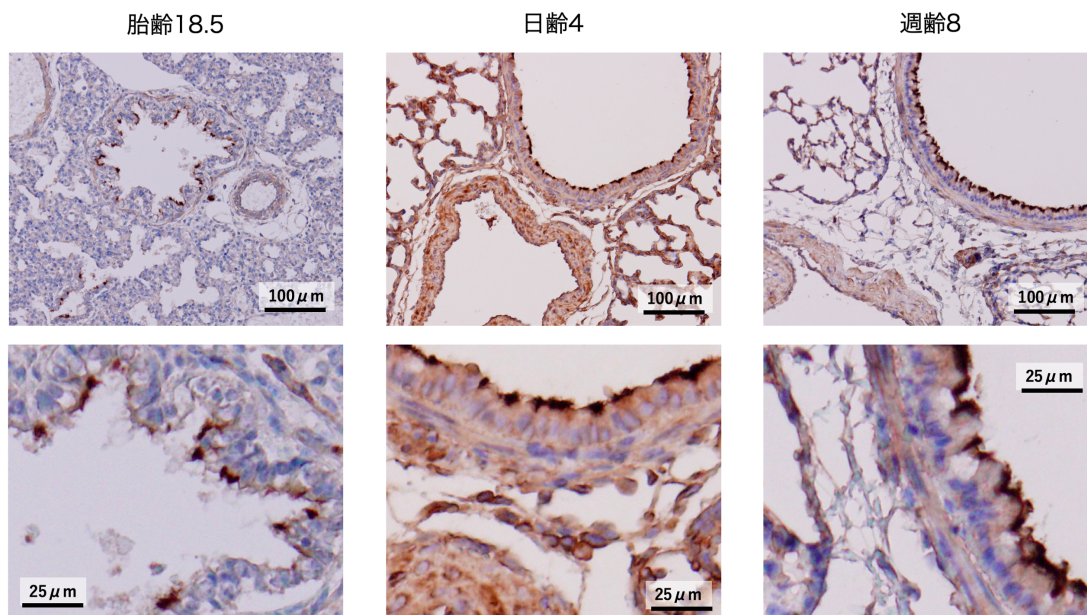


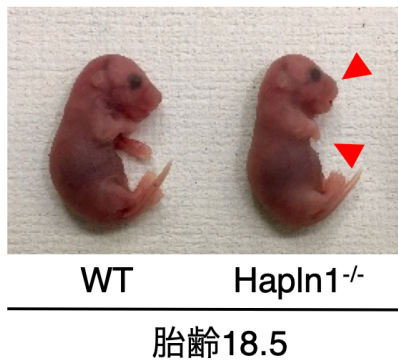
図 15 野生型マウス肺における Hapln1 タンパクの局在

野生型マウスの肺組織に対して抗 Hapln1 抗体を用いて免疫染色を行った。Hapln1 タンパクは胎仔、新生仔、成獣いずれも終末細気管支の上皮細胞で強く染色され、肺静脈周囲においても染色を認めた。また新生仔および成獣では肺胞上皮細胞周囲でも広範に染色を認めた。scale bar = 100 μ m (上段)、25 μ m (下段)

Hapln1 欠損マウスは四肢短縮、頭蓋顔面奇形を呈し、肺は低形成である

Hapln1 欠損ホモ接合体の胎齢 18.5 の胎仔マウスを肉眼的に観察すると四肢短縮、頭部の前後径の短縮を中心とした頭蓋顔面奇形を呈していた (図 16A)。また、Hapln1 欠損ホモ接合体は致死的であり、genotyping により遺伝子型が同定された Hapln1 欠損ホモ接合体新生仔の全てが出生直後に死亡した (図 16B)。胎仔肺を摘出し肺体重比および肺湿乾重量比の測定を行なったところ、Hapln1 欠損マウスは野生型と比較して肺体重比が小さく肺は低形成で、肺湿乾重量比も小さかった (図 17)。

A



B

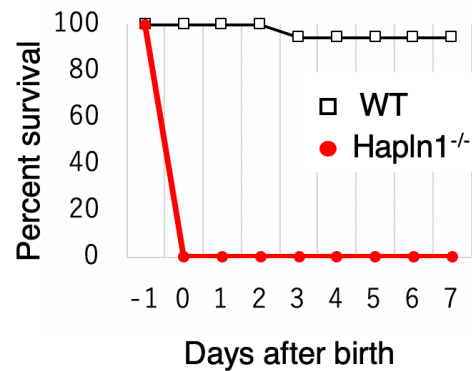
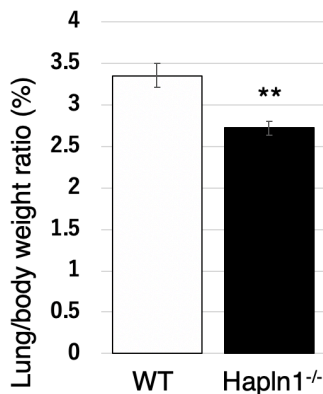


図 16 *Hapln1* 欠損マウスの胎仔の肉眼的所見 (A) および出生後の生存率 (B)

(A) *Hapln1* 欠損ホモ接合体のマウスは四肢短縮、頭部の前後径の短縮を中心とした頭蓋顔面奇形を呈する。(B) *Hapln1* 欠損ホモ接合体のマウスは全例が生後速やかに死亡する。

A



B

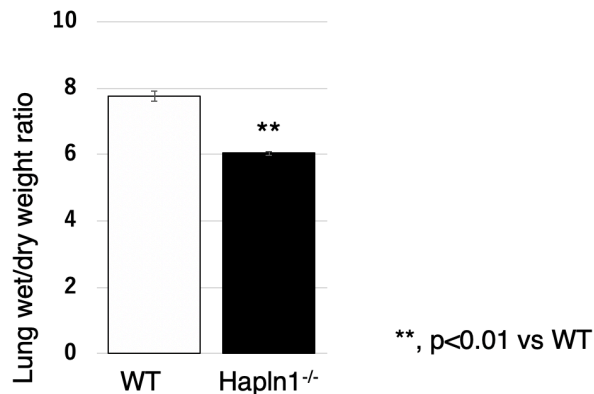


図 17 *Hapln1* 欠損マウスと野生型マウスにおける肺体重比および肺湿乾重量比

(A) *Hapln1* 欠損マウスは野生型マウスに比して全体重に比較して肺が占める割合が低い (B) *Hapln1* 欠損ホモ接合体のマウスは野生型と比較して肺湿乾重量比が小さい。

(A)、(B) とともに、*Hapln1* 欠損マウス (n=5)、野生型 (n=5)、2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。** p<0.01

Hapln1 欠損マウスは気道・肺胞嚢内腔が狭く、実質および間質が密である

ホルマリン固定パラフィン包埋した肺組織切片を Hematoxylin-eosin 染色し、形態学的評価、肺胞嚢領域の分画の定量を行った。光学顕微鏡による組織所見では Hapln1 欠損ホモ接合体の肺は野生型マウスの肺と比較して気道・肺胞嚢内腔が狭く、実質および間質が密な印象であった (図 18A)。ImageJ software を用いた肺胞嚢領域の分画定量でも、総末梢肺領域に占める肺胞嚢領域の割合は Hapln1 欠損マウスにおいて低値であり、組織所見を裏付ける結果であった (図 18B)。

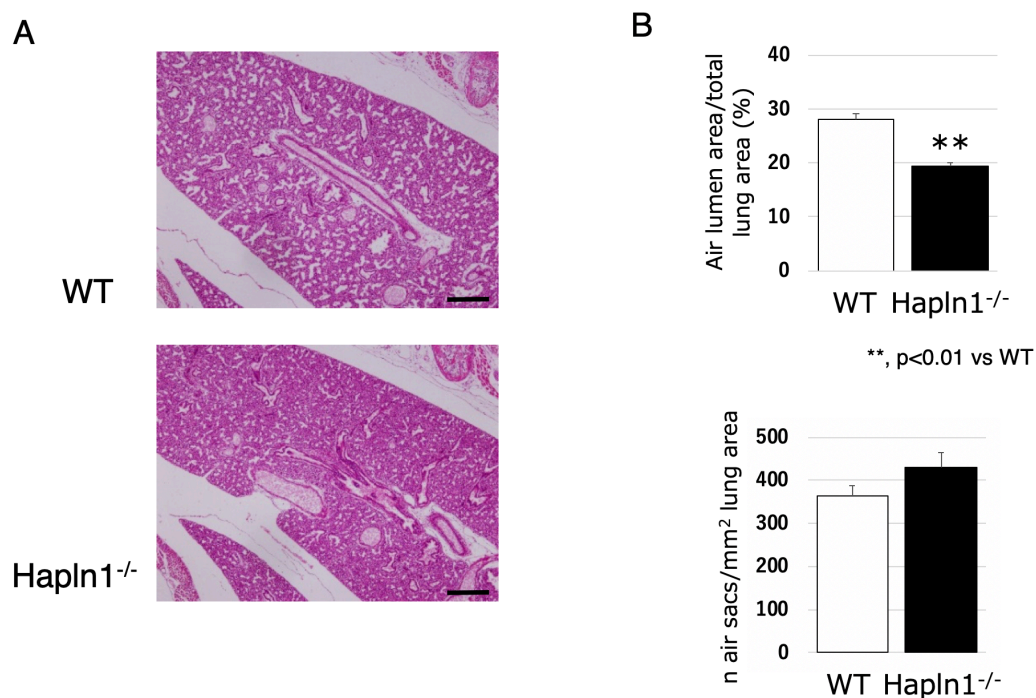


図 18 肺の形態学的評価、肺胞囊領域の分画の定量

(A) 光学顕微鏡による組織像の所見。*Hapln1* 欠損マウスの肺は野生型マウスの肺と比較して気道・肺胞囊内腔が狭いことは明らかである。scale bar = 50 μ m (B) ImageJを用いた肺胞囊領域の分画定量でも肺胞囊内腔が狭く、個々の肺胞囊が小さいことが確認された。各群 5 匹ずつのマウスの肺それぞれにおいて 20 倍対物レンズで重複しない 5 視野を選び評価。2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。** p<0.01

Hapln1 欠損マウスは肺内ヒアルロン酸およびコラーゲン含有量が多い

Hapln1 欠損ホモ接合体の胎仔マウス肺の細胞外マトリクス構成成分を野生型と比較した。単位湿重量あたりの肺内ヒアルロン酸および総コラーゲン含有量は、いずれも Hapln1 欠損マウスにおいて高値であった (図 19)。

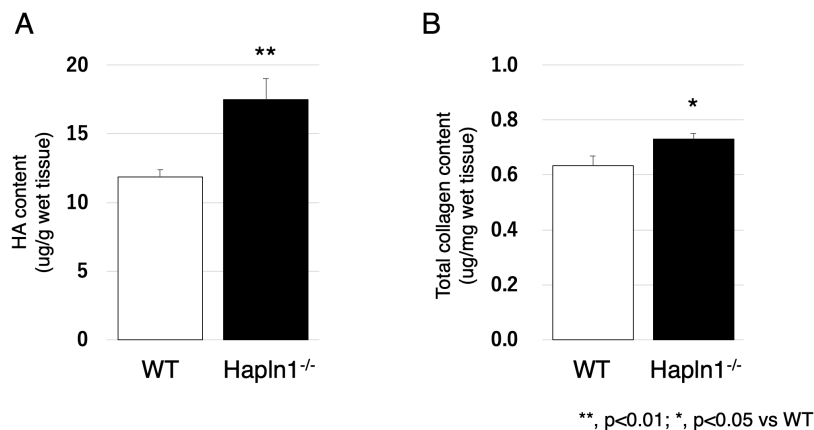


図 19 細胞外マトリクス構成成分の測定

(A) *Hapln1* 欠損マウスの胎児肺において肺内ヒアルロン酸含有量が多い。*Hapln1* 欠損マウス (n=9)、野生型 (n=9)。(B) *Hapln1* 欠損マウスの胎児肺において肺内総コラーゲン量も多い。*Hapln1* 欠損マウス (n=14)、野生型 (n=16)。(A)、(B) とともに 2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。* p<0.05、** p<0.01

Hapln1 欠損マウスを用いた網羅的遺伝子発現解析アレイによる関連遺伝子、遺伝子セットの探索

Hapln1 遺伝子の肺において果たす役割を推測するために、胎齢 18.5 の *Hapln1* 欠損ホモ接合体の胎仔マウス肺を用いて網羅的遺伝子発現解析アレイによる関連遺伝子の探索を行なった。*Hapln1* 欠損胎仔マウス肺と野生型胎仔マウス肺において遺伝子発現の比較を行ない、DEGs を同定した (図 20)。GO 解析では、細胞外領域・細胞外基質やグリコサミノグリカン結合、ケモカイン受容体結合などに関連した Term が有意であった (図 21)。

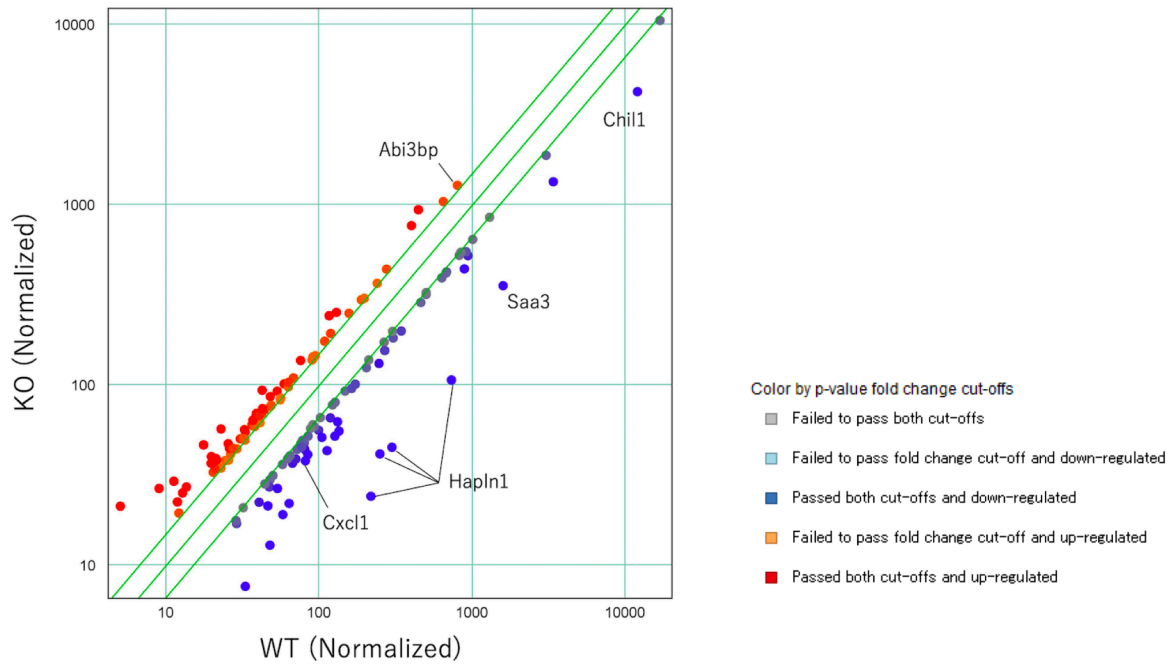


図 20 *Hapln1* 欠損胎仔マウス肺に対する網羅的遺伝子発現解析アレイによる発現変動遺伝子の同定

遺伝子発現の全体図を Scatter Plot により示した。野生型胎仔および *Hapln1* 欠損胎仔マウス肺の正規化した各遺伝子の発現量を、それぞれ X 軸、Y 軸に表している。

Hapln1 欠損ホモ接合体 (n=3) および野生型 (n=3)。

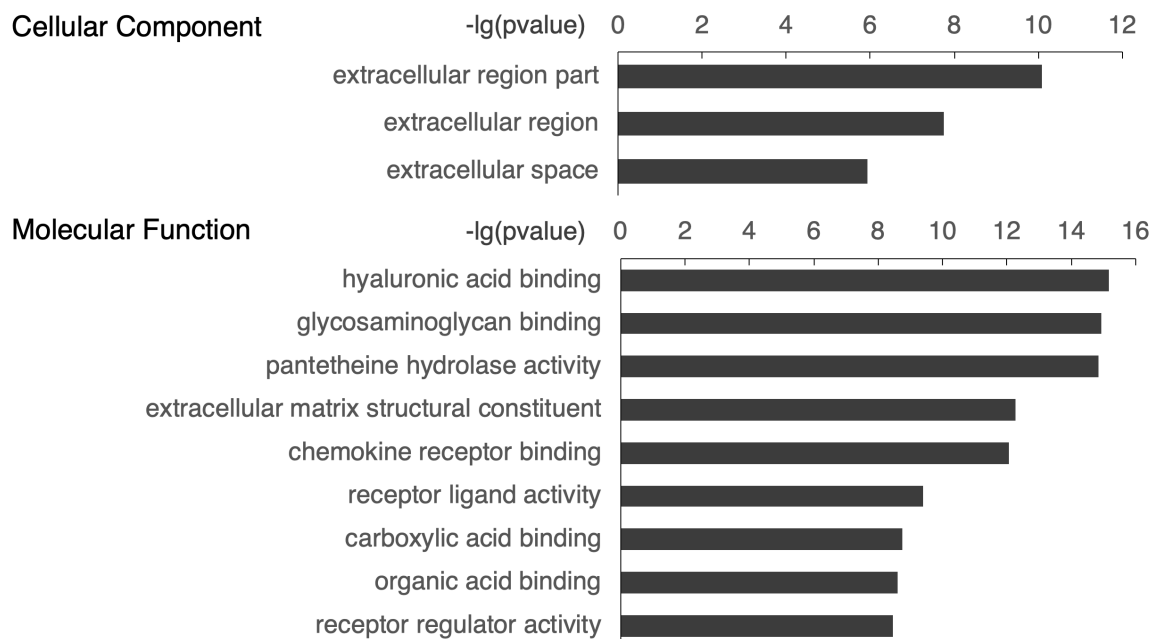


図 21 *Hapln1* 欠損マウスにおける発現変動遺伝子に対する GO 解析の結果
網羅的遺伝子発現解析アレイによって得られた *Hapln1* 欠損マウスにおける発現変動遺伝子に対して、GO 解析を行なった。細胞外領域・細胞外基質やグリコサミノグリカン結合、ケモカイン受容体結合などに関連した Term が有意であった。

GO 解析の結果を参考にして、DEGs の中から細胞外領域および炎症に関わる遺伝子やグリコサミノグリカン結合に関連した遺伝子など 7 遺伝子 (表 1) を選択し、定量的 PCR 解析により発現の評価を行なった。定量的 PCR 解析では、7 遺伝子のうち 4 遺伝子 (*Saa3*、*Chil1*、*Abi3bp*、*Cxcl1*) で *Hapln1* 欠損マウスの胎児肺における有意な発現の変化が確認された (図 22)。

| | |
|--------|--|
| Saa3 | serum amyloid A3 |
| Chil1 | Chitinase 3-like-1 |
| Abi3bp | ABI Family Member 3 Binding Protein |
| Cxcl1 | C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 |
| Cxcl3 | C-X-C Motif Chemokine Ligand 3 |
| Ccl6 | C-C Motif Chemokine ligand 6 |
| Tgfbr2 | Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 |

表 1 *Hapln1* 欠損マウスの発現変動遺伝子 (DEGs) の中から選択した 7 遺伝子 GO 解析の結果を参考に、DEGs の中より細胞外領域および炎症に関わる遺伝子やグリコサミノグリカン結合に関連した遺伝子など上記 7 遺伝子に着目した。

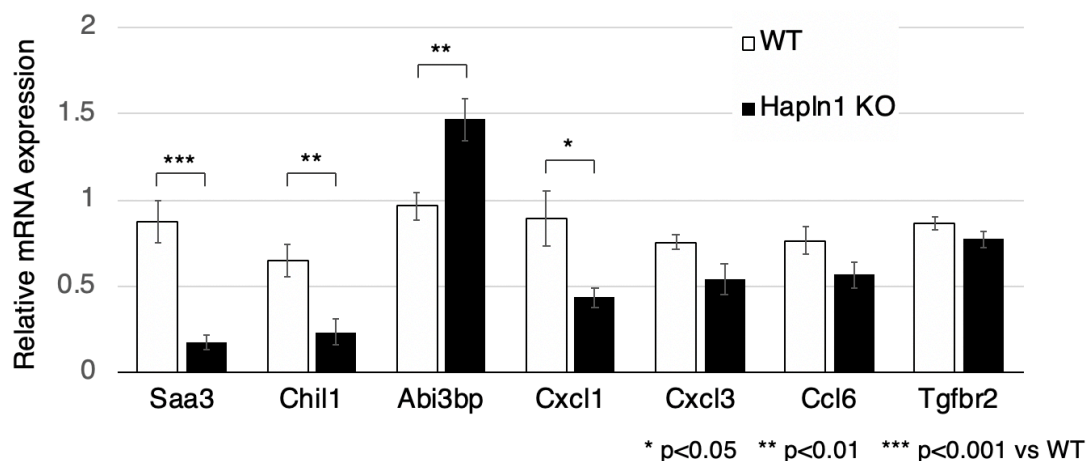


図 22 定量的 PCR 解析によるマイクロアレイの結果の確認

Hapln1 欠損マウスにおける発現変動遺伝子の中から選択した 7 遺伝子に対して、定量的 PCR 解析により mRNA 発現の評価を行なった。このうち、*Saa3*、*Chil1*、*Cxcl1* の発現上昇、*Abi3bp* の発現低下が確認された。*Hapln1* 欠損ホモ接合体 (n=6) および野生型 (n=6)、2 群間の比較は Student's t test を用いて検定。

* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001

X. 考察2

本研究では、BPD マウスモデルを用いた網羅的遺伝子発現解析アレイにより、高濃度酸素曝露直後から修復期にかけて肺において高発現となる *Hapln1* 遺伝子を同定した。さらに、同遺伝子が BPD における肺障害からの回復期に重要な役割を果たしていると考え、遺伝子の欠損がマウス肺に与える影響について *Hapln1* 欠損マウスの表現型を解析することにより明らかとした。*Hapln1* 遺伝子の欠損は致死的であるため、今後、遺伝子を時間特異的に制御することが可能な条件付きノックアウトマウスを作成することにより、同遺伝子の役割を明らかとしていく必要がある。

1. BPD マウスモデルを用いた関連遺伝子の探索、*Hapln1* 遺伝子に関して

BPD マウスモデルにおいて、酸素性肺障害からの修復期に行なった網羅的遺伝子発現解析アレイで *Hapln1* 遺伝子を同定した。さらに、新生仔マウスの肺における *Hapln1* 遺伝子の mRNA 発現は、通常は出生直後に高値を示しその後は経時的に低下していく経過を辿るが、高濃度酸素曝露を行った場合は酸素曝露終了時には出生時よりさらに上昇し、以降も日齢 14 まで正常酸素群に対して有意に高値を取り続けることが明らかとなった。

今回、我々は出生後4日間の酸素曝露を行う新生児慢性肺疾患マウスモデルを用いて、新生仔マウスの Hapln1 の発現の評価を行った。先に述べたようにマウスの成獣は新生仔に比して高濃度酸素曝露に対する耐性が低いことが知られており、同様の手順を用いて成獣に酸素曝露を行なった場合、成獣マウスの多くが酸素曝露中ないし酸素曝露後の回復期に呼吸障害のために死亡してしまう。従って、今回の実験に用いた方法では、新生仔と成獣間の高濃度酸素曝露に対する Hapln1 の反応の違いを評価することはできなかった。成獣における高濃度酸素曝露に対する Hapln1 の発現への影響については今後の検討していく必要があると考えられる。

また、本研究は BPD を対象とした研究であり、同疾患のマウスモデルとして一般的な高濃度酸素曝露によるモデルを用いて実験を行なった。今回明らかとなった酸素曝露後の Hapln1 の発現上昇については、酸素曝露自体に起因する上昇か、それともその結果としての肺障害による上昇かについては、本研究の範囲では明らかにすることはできない。そこで、Hapln1 の上昇が一般的な肺障害に伴う発現変化であるかを示す方法としては、高濃度酸素曝露以外の肺障害モデルを用いた研究が有用である。成獣マウスの ALI に関する研究では Bleomycin(65)や lipopolysaccharide(66)を経気管的に投与する肺障害モデルが用いられる場合があるが、マウス新生仔を対象とした

BPDの研究では、マウスのサイズが小さいため薬物の経気管投与は技術的に困難である。今後、成獣を用いた高濃度酸素曝露以外の肺障害モデルを用いた実験系において Hapln1 上昇を評価することにより、Hapln1 上昇の背景をより明らかにすることができると考えられる。

Hapln1 はもともと軟骨のプロテオグリカンにおいて軟骨細胞の細胞周囲マトリクスを形成するアグリカン／ヒアルロン酸凝集体のアグリカンとヒアルロン酸の会合体を安定させる役割を果たしているリンクタンパクとして見出された(図 23)(67)。その後、Hapln1 は軟骨に多いアグリカンだけでなく、種々の軟部組織で発現しているバーシカン (Versican) や中枢神経系に見られるニューロカン (Neurocan) やブレビカン (Brevican) といった他のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとヒアルロン酸との会合体の安定化も担っていることが発見された(68-70)。

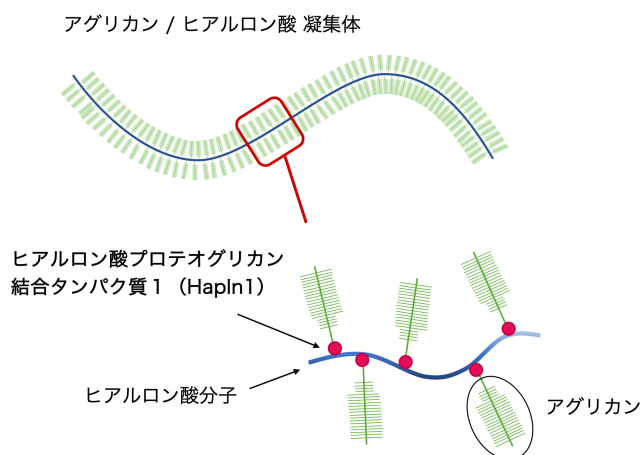


図 23 アグリカン/ヒアルロン酸凝集体におけるヒアルロン酸プロテオグリカン結合タンパク質 1 概略図

Hapln1 はアグリカン/ヒアルロン酸凝集体においてアグリカンとヒアルロン酸を繋ぐリンクタンパクとして機能し、会合体の安定化を担っている。

肺間質の細胞外マトリクスは、常在性線維芽細胞 (resident fibroblast) の活性により維持されており、上皮細胞層の基底膜に固定されたコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、種々のプロテオグリカンなどにより緩やかな網目構造を形成している(71)。Hapln1 もこのような網目構造を構成する要素の一つとして機能しているタンパクであり、肺ではバーシカンとヒアルロン酸の会合の安定化を担っている(67)。このような細胞外マトリクスは、肺の発達とともにリモデリングを繰り返しており、肺発達を方向付ける足場として機能している(72)。BPD は早産に伴う種々の因子の影響で肺の正常な発達過程が阻害されることにより生じるが、肺胞上皮細胞や肺血管の

みならず細胞外マトリクスにおいてもホメオスタシスの破綻、適切なリモデリングの障害が生じていると考えられる。臨床検体や実験的モデルにおける典型的な病理所見として無秩序なコラーゲン沈着やエラスチン線維の乱れが報告されることは、これを裏付けている(73)。

成人の間質性肺炎や特発性肺線維症の線維化病変では活性化した線維芽細胞が集積することが知られている。その中でも the α -smooth muscle actin を発現した筋線維芽細胞は、1型コラーゲンを産生し、線維形成性 (fibrogenic) / 炎症性 (inflammatory) サイトカインを産生することから、組織の線維化に大きく関わっていることがわかっている(74, 75)。早産児の BPD においても、肥厚化した肺間質において筋線維芽細胞の増加が報告されており、その発症において同様の機序が関与すると考えられている(76)。今回、我々が注目した Hapln1 が繋ぐバーシカンおよびヒアルロン酸は線維芽細胞の増殖と筋線維芽細胞 (myofibroblast) への変換を促進する重要な役割を果たしていることがわかっており(67)、Hapln1 も何らかの役割を担っていることが示唆されている。

また、細胞外マトリクスは毛細血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の間に存在するが、この領域に局在するリポ線維芽細胞 (lipofibroblast) が2型肺胞上皮細胞の増殖、

分化を制御しており条件的幹細胞 (facultative stem cell) として機能していることが示されている(77)。この細胞外マトリクスが形成する場は幹細胞ニッチ (Stem cell niche) と呼ばれ、近年ニッチを形成する細胞外マトリクスの構成要素との相互作用が幹細胞の分化において重要な役割を果たしていると考えられている(77)。幹細胞ニッチについては現時点ではまだまだ不明な点が多いが、Hapln1 もこの幹細胞ニッチを構成する要素であり、高濃度酸素性肺障害からの修復期においてリポ線維芽細胞が担う 2 型肺胞上皮細胞の増殖、分化の制御において一定の役割を果たしている可能性がある。

Hapln1 タンパクの肺における局在を明らかにするために行なった免疫組織染色では、終末細気管支の上皮細胞を中心に肺静脈周囲および肺胞上皮細胞周囲でも染色を認めた。これまでに肺内の Hapln1 タンパクの発現に関して先行の報告は行われておらず、現時点では Hapln1 が終末細気管支の上皮細胞で高発現となった意義は不明である。毛細血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の間には細胞外マトリクスが存在しており Hapln1 の発現が予想されることから、肺胞上皮細胞周囲に見られる Hapln1 の発現は細胞マトリクスを示唆するものと考えられる。

2. *Hapln1* 欠損マウスの表現型に関して

我々の研究では、新生児慢性肺疾患の修復において *Hapln1* が果たす役割を明らかにすることを目的として、遺伝子改変マウスを用いた研究を進めることとした。

しかし、同遺伝子の欠損ホモ接合体のマウスは出生後速やかに死亡してしまうため、高濃度酸素曝露による BPD マウスモデルを用いた解析を進めることは困難であった。

そこで、今後 BPD における *Hapln1* 遺伝子の役割の解析を進めるための基盤となる研究として、まずは同遺伝子の欠損が胎児肺に与える影響を解析することにした。

Hapln1 欠損ホモ接合体マウスに関しては、過去の研究において軟骨の発達障害と骨形成の遅延による四肢短縮および頭蓋顔面の形成異常、脊椎前弯を発症すること、新生仔は呼吸不全により出生直後に死亡することが報告されている(63)。同研究では軟骨に着目し表現型の解析を行っており、軟骨におけるアグリカン沈着の著しい減少および肥大化軟骨細胞数の減少を示している。一方、*Hapln1* 欠損マウスの肺における表現型に関する報告はこれまでに行われていない。

著者らが行なった *Hapln1* 欠損ホモ接合体マウス肺の病理形態解析では、*Hapln1* 欠損マウスは肺体重比および肺湿乾重量比が小さい、組織所見において気道・肺胞嚢内腔が狭いといった所見を認めた。これらの所見は *Hapln1* 欠損マウスの肺は

低形性で実質および間質が密であることを意味すると考えられる。しかし、これらの胎児肺における変化が *Hapln1* 遺伝子を欠損したことによる肺発達への直接的な影響であるのか、骨形成の遅延による胸郭そのものの低形成の影響であるのかについては現時点では不明である。

Hapln1 欠損マウスの胎仔肺における細胞外マトリクス構成成分の測定では、*Hapln1* 欠損マウスにおいて肺内ヒアルロン酸および総コラーゲン含有量が有意に高値であることが明らかとなった。これらの結果は実質および間質が密であるという組織所見を裏付けるものと考えられる。組織の線維化は、一般的にコラーゲンの合成と分解のバランスの破綻により細胞外マトリクスが過剰に蓄積するという特徴を有している(78)。*Hapln1* 欠損マウスの胎児肺におけるヒアルロン酸やコラーゲンを含む細胞外マトリクス構成成分の増加は、このコラーゲンの合成と分解のバランスの破綻を示すものであり、*Hapln1* が線維化の調節・制御において重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えている。

3. *Hapln1* 欠損マウスを用いた関連遺伝子の探索に関して

Hapln1 遺伝子の肺における機能を推測するために胎仔肺を用いて行った網

羅的遺伝子発現解析アレイでは、GO 解析において細胞外領域・細胞外基質やグリコサミノグリカン結合、ケモカイン受容体結合などに関連する Term に有意差を認めた。この結果を踏まえ、DEGs の中から細胞外領域に関連しかつ炎症に関わる遺伝子やグリコサミノグリカン結合に関連した遺伝子を選択して、定量的 PCR 解析により発現の変化を確認したところ、4 遺伝子 (*Saa3*、*Chil1*、*Abi3bp*、*Cxcl1*) で有意な変化を認めた。*Serum amyloid A 3* (*Saa3*) は炎症時に上昇する急性期タンパクでマクロファージなどにより分泌される(79)。*Chitinase-like 1* (*Chil1*) はマウスの肺線維症モデルにおいて、炎症と細胞死を改善することで肺障害において保護的に働き、線維芽細胞増殖や細胞外マトリクスの沈着を促進することが報告されている(80)。*ABI Family Member 3 Binding Protein* (*Abi3bp*) はまだ不明な点がおおいタンパクではあるが、細胞老化および細胞と細胞外マトリクス間の相互作用を促進することがわかっている(35, 81)。*Chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (*Cxcl1*)は好中球の活性化および遊走に関わる遺伝子で、ヒアルロン酸を含むグリコサミノグリカン (glycosaminoglycans: GAGs) に結合することにより生理活性が調節されている(82)。これらのタンパクと *Hapln1* との間に、肺の修復や線維化に関わる既知のパスウェイの報告はない。

以上の結果は、欠損ホモ接合体マウスが出生後の生存が困難で BPD モデル

としての介入が困難であったことから、当初の目的である BPD の病態における *Hapln1* の果たす役割を直接的に解析したものではない。しかし、*Hapln1* 欠損マウスの胎児肺において有意な発現減少が確認された *Saa3*、*Cxcl1* といった遺伝子は、これまでの研究で肺上皮細胞において炎症系サイトカインのインターロイキン-1 β (Interleukin-1 β :IL1 β) によって誘導されることが報告されている(51)。また、IL1 β は炎症の急性期から修復期にわたって上昇し、組織の線維化に関わっているがことも明らかとなっている。従って、本研究において得られた結果から *Hapln1* は、線維芽細胞の増殖および筋線維芽細胞への変換の調節を介するか、あるいはより直接的な形で BPD における炎症や線維化を制御する役割を担っているのではないかと推測された。今後、*Hapln1* と炎症や線維芽細胞との関わりに着目してさらなる解析を進める必要がある。

4. *Hapln1* の機能解析に関する今後の研究の展開

Hapln1 の欠損は致死的であるため、高濃度酸素曝露からの修復において *Hapln1* タンパクが果たす役割について BPD モデルを用いた解析を進めるためには、同遺伝子を時間特異的に制御することが可能な条件付きノックアウトマウスを作成する必要がある。著者らは、同遺伝子が出生後に初めて欠損されるよう時間特異的に

制御することを目的として、Cre/lox システムおよびテトラサイクリン遺伝子発現誘導系を導入した条件付きノックアウトマウスの作成を進めている。

著者らは、これまでに創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の支援のもと、遺伝子改変動物の作成法の開発・研究を行なっている群馬大学の畑田ら(83)とともに、Hapln1 遺伝子の Flox マウスの作成を完了した。現在、reverse tetracycline transactivator (rtTA) 配列を導入されたマウス (C57BL/6-Tg(CAG-floxed EGFP,-rtTA,-tTS)1Kyot (RIKEN BRC, Tsukuba, Japan)) および tetO-Cre 配列を導入されたマウス (Tg(tetO-cre)1Jaw/J マウス (Jackson Laboratory)) を交配して Cre ドライバーマウスの作成を進めており、今後先述の Flox マウスと掛け合わせることで、Tet-Off 発現誘導システムを導入したマウスによる実験系を確立することができる。以上の方法で作成した条件付きノックアウトマウスでは、母獣にドキシサイクリンを投与することにより、ドキシサイクリンが母乳を介して新生仔に移行し、仔の Hapln1 遺伝子の発現を選択的にノックアウトすることができる。母体へのドキシサイクリンの投与期間を調節することにより、Hapln1 の発現を時間的特異的に制御することが可能である (図 24)。

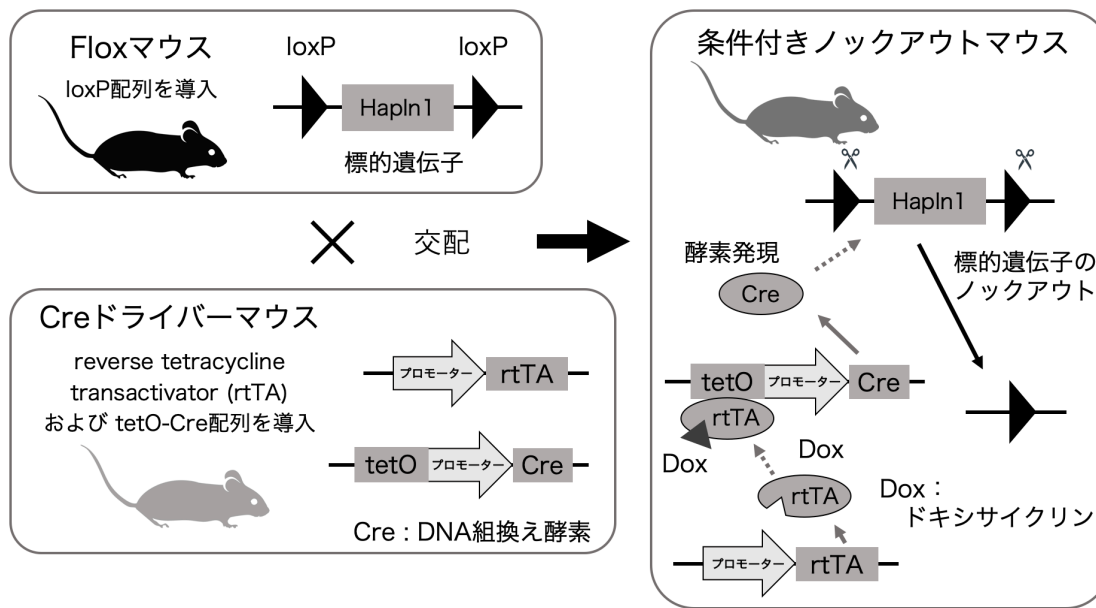


図 24 Cre/lox,テトラサイクリン遺伝子発現誘導系概略図

Flox マウスおよび Cre ドライバーマウスの交配により、条件付きノックアウトマウスを得る。同マウスはドキシサイクリンの投与により目的遺伝子 (*Hapln1*) が選択的にノックアウトされるため、*Hapln1* の発現を時間的特異的に制御することができる。

上記の条件付きノックアウトマウスにおいて出生後に *Hapln1* 遺伝子の欠損を誘導することで、BPD のマウスモデルにおいて *Hapln1* 欠損マウスを用いた実験が可能となる。今後、経時的な表現型解析、新生児慢性肺疾患モデルを用いた解析（肺の組織学的評価、および炎症性マーカーの測定）、小動物の呼吸機能の解析機器である flexiVent™ (SciReq 社)を用いた生理学的な肺機能評価といった解析を進め、*Hapln1* 遺伝子の BPD の病態において果たす役割について明らかにしていく予定である。

XI. 小括 2

BPD マウスモデルを用いた網羅的遺伝子発現解析アレイにより、高濃度酸素曝露直後から修復期にかけて肺において高発現となる *Hapln1* 遺伝子を同定した。さらに、*Hapln1* 遺伝子が新生仔マウス肺において酸素曝露により上昇し、曝露終了後も 10 日間以上高値が持続することを明らかとした。*Hapln1* 遺伝子欠損マウスのほとんどが出生後速やかに死亡するため、*Hapln1* 遺伝子欠損マウスの胎児肺を用いた表現型解析を行い、同遺伝子が BPD の病態において果たす役割について推測した。今後、遺伝子を時間特異的に制御することが可能な条件付きノックアウトマウスを作成し BPD マウスモデルに用いることで、同遺伝子が BPD の病態および発症機序において果たす役割をより明らかとしていくことを目指す。

XII. 結論

高濃度酸素曝露により成獣マウスの肺において解糖系に関連する代謝物が増加するが、新生仔マウスの肺においては同様の反応は見られない。このような成獣における解糖系における代謝の変化は、高濃度酸素曝露による Pdk4 の発現上昇に伴う PDH の酵素活性の低下が関連していると考えられる。以上の結果は、マウスの新生仔と成獣における高濃度酸素曝露に対する耐性の違いの機序について一つの説明となる可能性がある。また、新生児慢性肺疾患において肺障害からの回復期に肺で高発現となる Hapln1 遺伝子を同定した。Hapln1 欠損マウスの胎児肺の表現型解析より、同遺伝子は BPD における炎症や線維化を制御において重要な重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。これらの知見は、高酸素性の ALI、ARDS、BPD を予防するための新たな治療戦略の手がかりとなることが期待される。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費基盤研究C(16K10105)、若手研究(18K15729、19K17341)と川野小児医学奨学財団研究助成一般枠(26-5、29-7)、母子健康協会小児医学研究助成(27-3)、埼玉医科大学総合医療センター学内グラントの支援によって行われた。また、本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の課題番号JP20am0101120の支援を受けた(支援番号1174)。

ご指導いただきました埼玉医科大学総合医療センター小児科の難波文彦准教授、長野伸彦氏、伊藤誠人氏、新井幸男氏、小澤純一氏、芳賀光洋氏、東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座の高橋尚人教授に深謝申し上げます。

引用文献

1. Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic acute lung injury. *Respiratory care*. 2013;58(1):123-41.
2. Sinclair SE, Altemeier WA, Matute-Bello G, Chi EY. Augmented lung injury due to interaction between hyperoxia and mechanical ventilation. *Critical Care Medicine*. 2004;32(12):2496-501.
3. Dias-Freitas F, Metelo-Coimbra C, Roncon-Albuquerque R, Jr. Molecular mechanisms underlying hyperoxia acute lung injury. *Respiratory Medicine*. 2016;119:23-8.
4. Helmerhorst HJ, Roos-Blom MJ, van Westerloo DJ, de Jonge E. Association Between Arterial Hyperoxia and Outcome in Subsets of Critical Illness: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression of Cohort Studies. *Critical Care Medicine*. 2015;43(7):1508-19.
5. Reddy SP, Hassoun PM, Brower R. Redox imbalance and ventilator-induced lung injury. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9(11):2003-12.
6. Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute Respiratory Distress Syndrome. *The New England journal of medicine*. 2017;377(6):562-72.
7. Li LF, Yang CT, Huang CC, Liu YY, Kao KC, Lin HC. Low-molecular-weight heparin reduces hyperoxia-augmented ventilator-induced lung injury via serine/threonine kinase-protein kinase B. *Respiratory Research*. 2011;12(1):90.
8. Frank L, Bucher JR, Roberts RJ. Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1978;45(5):699-704.
9. Ischiropoulos H, Nadziejko CE, Kumae T, Kikkawa Y. Oxygen tolerance in neonatal rats: role of subcellular superoxide generation. *American Journal of Physiology* 1989;257(6 Pt 1):L411-20.
10. Keeney SE, Cress SE, Brown SE, Bidani A. The effect of hyperoxic exposure on antioxidant enzyme activities of alveolar type II cells in neonatal and adult rats. *Pediatric research*. 1992;31(5):441-4.
11. D'Angio CT, Johnston CJ, Wright TW, Reed CK, Finkelstein JN. Chemokine mRNA alterations in newborn and adult mouse lung during acute hyperoxia. *Experimental Lung Research*. 1998;24(5):685-702.

12. Gerik SM, Keeney SE, Dallas DV, Palkowetz KH, Schmalstieg FC. Neutrophil adhesion molecule expression in the developing neonatal rat exposed to hyperoxia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;29(4):506-12.
13. Hanna MH, Brophy PD. Metabolomics in pediatric nephrology: emerging concepts. *Pediatric Nephrology*. 2015;30(6):881-7.
14. Putri SP, Yamamoto S, Tsugawa H, Fukusaki E. Current metabolomics: technological advances. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2013;116(1):9-16.
15. Uetaki M, Tabata S, Nakasuka F, Soga T, Tomita M. Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Scientific Reports*. 2015;5:13896.
16. Wakayama M, Hirayama A, Soga T. Capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*. 2015;1277:113-22.
17. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Research*. 2009;69(11):4918-25.
18. Surate Solaligue DE, Rodríguez-Castillo JA, Ahlbrecht K, Morty RE. Recent advances in our understanding of the mechanisms of late lung development and bronchopulmonary dysplasia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2017;313(6):L1101-153.
19. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, Laptook AR, Sanchez PJ, Van Meurs KP, Wyckoff M, Das A, Hale EC, Ball MB, Newman NS, Schibler K, Poindexter BB, Kennedy KA, Cotten CM, Watterberg KL, D'Angio CT, DeMauro SB, Truog WE, Devaskar U, Higgins RD. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *Journal of the American Medical Association*. 2015;314(10):1039-51.
20. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *The New England journal of medicine*. 2007;357(19):1946-55.
21. Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012;113(9):2806-12.
22. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*. 2019;37(7):855-64.
23. Namba F. Mesenchymal stem cells for the prevention of bronchopulmonary dysplasia.

- Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society. 2019;61(10):945-50.
24. Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, Hill DR, Overeem AW, Shea LD, Spence JR. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nature Protocols*. 2019;14(2):518-40.
 25. Leeman KT, Pessina P, Lee JH, Kim CF. Mesenchymal Stem Cells Increase Alveolar Differentiation in Lung Progenitor Organoid Cultures. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6479.
 26. Tan Q, Ma XY, Liu W, Meridew JA, Jones DL, Haak AJ, Sicard D, Ligresti G, Tschumperlin DJ. Nascent Lung Organoids Reveal Epithelium- and Bone Morphogenetic Protein-mediated Suppression of Fibroblast Activation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2019;61(5):607-19.
 27. O'Reilly MA, Yee M, Buczynski BW, Vitiello PF, Keng PC, Welle SL, Finkelstein JN, Dean DA, Lawrence BP. Neonatal oxygen increases sensitivity to influenza A virus infection in adult mice by suppressing epithelial expression of Ear1. *The American journal of pathology*. 2012;181(2):441-51.
 28. Namba F, Ogawa R, Ito M, Watanabe T, Dennery PA, Tamura M. Sex-related differences in long-term pulmonary outcomes of neonatal hyperoxia in mice. *Experimental Lung Research*. 2016;42(2):57-65.
 29. Buczynski BW, Maduekwe ET, O'Reilly MA. The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD. *Seminars in Perinatology*. 2013;37(2):69-78.
 30. Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, Vitali SH, Liu X, Ericsson M, Kwong A, Mitsialis SA, Kourembanas S. Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Ameliorate Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and Restore Lung Function through Macrophage Immunomodulation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2018;197(1):104-16.
 31. Sun H, Choo-Wing R, Fan J, Leng L, Syed MA, Hare AA, Jorgensen WL, Bucala R, Bhandari V. Small molecular modulation of macrophage migration inhibitory factor in the hyperoxia-induced mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Respiratory Research*. 2013;14(1):27.
 32. Namba F, Go H, Murphy JA, La P, Yang G, Sengupta S, Fernando AP, Yohannes M, Biswas C, Wehrli SL, Dennery PA. Expression level and subcellular localization of heme oxygenase-1 modulates its cytoprotective properties in response to lung injury: a mouse

- model. PLoS One. 2014;9(3):e90936.
33. Junker BH, Klukas C, Schreiber F. VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:109.
 34. Tanaka K, Watanabe T, Ozawa J, Ito M, Nagano N, Arai Y, Miyake F, Matsumura S, Kobayashi S, Itakura R, Namba F. Difference in pyruvic acid metabolism between neonatal and adult mouse lungs exposed to hyperoxia. *PLoS One*. 2020;15(9):e0238604.
 35. Hodgkinson CP, Naidoo V, Patti KG, Gomez JA, Schmeckpeper J, Zhang Z, Davis B, Pratt RE, Mirotsoy M, Dzau VJ. Abi3bp is a multifunctional autocrine/paracrine factor that regulates mesenchymal stem cell biology. *Stem Cells*. 2013;31(8):1669-82.
 36. Hong SM, Lee YK, Park I, Kwon SM, Min S, Yoon G. Lactic acidosis caused by repressed lactate dehydrogenase subunit B expression down-regulates mitochondrial oxidative phosphorylation via the pyruvate dehydrogenase (PDH)-PDH kinase axis. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(19):7810-20.
 37. Yuan K, Shao NY, Hennigs JK, Discipulo M, Orcholski ME, Shamskhov E, Richter A, Hu X, Wu JC, de Jesus Perez VA. Increased Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 Expression in Lung Pericytes Is Associated with Reduced Endothelial-Pericyte Interactions and Small Vessel Loss in Pulmonary Arterial Hypertension. *The American journal of pathology*. 2016;186(9):2500-14.
 38. Coarfa C, Zhang Y, Maity S, Perera DN, Jiang W, Wang L, Couroucli X, Moorthy B, Lingappan K. Sexual dimorphism of the pulmonary transcriptome in neonatal hyperoxic lung injury: identification of angiogenesis as a key pathway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2017;313(6):L991-L1005.
 39. Cheng H, Wang H, Wu C, Zhang Y, Bao T, Tian Z. Proteomic analysis of sex differences in hyperoxic lung injury in neonatal mice. *International Journal of Medical Sciences*. 2020;17(16):2440-8.
 40. Lingappan K, Srinivasan C, Jiang W, Wang L, Couroucli XI, Moorthy B. Analysis of the transcriptome in hyperoxic lung injury and sex-specific alterations in gene expression. *PLoS One*. 2014;9(7):e101581.
 41. Li XB, Gu JD, Zhou QH. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thoracic cancer*. 2015;6(1):17-24.
 42. Balin AK, Goodman BP, Rasmussen H, Cristofalo VJ. The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of WI-38 cells. *Journal of cellular physiology*.

- 1976;89(2):235-49.
43. Bassett DJ, Bowen-Kelly E. Pyruvate metabolism of perfused rat lungs after exposure to 100% oxygen. *Journal of Applied Physiology*. 1986;60(5):1605-9.
 44. Bassett DJ, Bowen-Kelly E, Reichenbaugh SS. Rat lung glucose metabolism after 24 h of exposure to 100% oxygen. *Journal of Applied Physiology*. 1989;66(2):989-96.
 45. Bassett DJ, Reichenbaugh SS. Tricarboxylic acid cycle activity in perfused rat lungs after O₂ exposure. *American Journal of Physiology*. 1992;262(4 Pt 1):L495-501.
 46. Das KC. Hyperoxia decreases glycolytic capacity, glycolytic reserve and oxidative phosphorylation in MLE-12 cells and inhibits complex I and II function, but not complex IV in isolated mouse lung mitochondria. *PLoS One*. 2013;8(9):e73358.
 47. Schoonen WG, Wanamarta AH, van der Klei-van Moorsel JM, Jakobs C, Joenje H. Respiratory failure and stimulation of glycolysis in Chinese hamster ovary cells exposed to normobaric hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265(19):1118-24.
 48. Simon LM, Raffin TA, Douglas WH, Theodore J, Robin ED. Effects of high oxygen exposure on bioenergetics in isolated type II pneumocytes. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1979;47(1):98-103.
 49. Allen CB, Guo XL, White CW. Changes in pulmonary expression of hexokinase and glucose transporter mRNAs in rats adapted to hyperoxia. *American Journal of Physiology*. 1998;274(3 Pt 1):L320-9.
 50. Franks A, Airoidi E, Slavov N. Post-transcriptional regulation across human tissues. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(5):e1005535.
 51. Kimura RE, Thulin GE, Wender D, Warshaw JB. Decreased oxidative metabolism in neonatal rat lung exposed to hyperoxia. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1983;55(5):1501-5.
 52. Michelakis ED, Gurtu V, Webster L, Barnes G, Watson G, Howard L, Cupitt J, Paterson I, Thompson RB, Chow K, O'Regan DP, Zhao L, Wharton J, Kiely DG, Kinnaird A, Boukouris AE, White C, Nagendran J, Freed DH, Wort SJ, Gibbs JSR, Wilkins MR. Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves pulmonary arterial hypertension in genetically susceptible patients. *Science Translational Medicine*. 2017;9(413).
 53. Bhattacharya S, Zhou Z, Yee M, Chu CY, Lopez AM, Lunger VA, Solleti SK, Resseguie E, Buczynski B, Mariani TJ, O'Reilly MA. The genome-wide transcriptional response to neonatal hyperoxia identifies Ahr as a key regulator. *American Journal of Physiology-*

- Lung Cellular and Molecular Physiology. 2014;307(7):L516-23.
54. Hogmalm A, Bry M, Strandvik B, Bry K. IL-1 β expression in the distal lung epithelium disrupts lung morphogenesis and epithelial cell differentiation in fetal mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014;306(1):L23-34.
 55. Fede C, Angelini A, Stern R, Macchi V, Porzionato A, Ruggieri P, De Caro R, Stecco C. Quantification of hyaluronan in human fasciae: variations with function and anatomical site. *Journal of Anatomy*. 2018;233(4):552-6.
 56. Zysman M, Baptista BR, Essari LA, Taghizadeh S, Thibault de Ménonville C, Giffard C, Issa A, Franco-Montoya ML, Breau M, Souktani R, Aissat A, Caeymaex L, Lizé M, Van Nhieu JT, Jung C, Rottier R, Cruzeiro MD, Adnot S, Epaud R, Chabot F, Lanone S, Boczkowski J, Boyer L. Targeting p16(INK4a) Promotes Lipofibroblasts and Alveolar Regeneration after Early-Life Injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020;202(8):1088-104.
 57. Shah D, Das P, Alam MA, Mahajan N, Romero F, Shahid M, Singh H, Bhandari V. MicroRNA-34a Promotes Endothelial Dysfunction and Mitochondrial-mediated Apoptosis in Murine Models of Acute Lung Injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2019;60(4):465-77.
 58. Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, Navarro E, Jain N, Carandang F, Peterson J, Mokres L, Milla C, Preuss S, Alcazar MA, Khan S, Masumi J, Ferreira-Tojais N, Mujahid S, Starcher B, Rabinovitch M, Bland R. Lung matrix and vascular remodeling in mechanically ventilated elastin haploinsufficient newborn mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;308(5):L464-78.
 59. Azad AK, Chakrabarti S, Xu Z, Davidge ST, Fu Y. Coiled-coil domain containing 3 (CCDC3) represses tumor necrosis factor- α /nuclear factor κ B-induced endothelial inflammation. *Cell Signal*. 2014;26(12):2793-800.
 60. Behrens A, Genoud N, Naumann H, Rüllicke T, Janett F, Heppner FL, Ledermann B, Aguzzi A. Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *Embo j*. 2002;21(14):3652-8.
 61. Lewicki Ł, Siebert J, Koliński T, Piekarska K, Reiwer-Gostomska M, Targoński R, Trzonkowski P, Marek-Trzonkowska N. Mast cell derived carboxypeptidase A3 is decreased among patients with advanced coronary artery disease. *Cardiology Journal*. 2019;26(6):680-6.

62. Palermo I, Litrico L, Emmanuele G, Giuffrida V, Sassone-Corsi P, De Cesare D, Maria Fimia G, D'Agata R, Calogero AE, Travali S. Cloning and expression of activator of CREM in testis in human testicular tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;283(2):406-11.
63. Watanabe H, Yamada Y. Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. *Nature genetics*. 1999;21(2):225-9.
64. Wirrig EE, Snarr BS, Chintalapudi MR, O'Neal J L, Phelps AL, Barth JL, Fresco VM, Kern CB, Mjaatvedt CH, Toole BP, Hoffman S, Trusk TC, Argraves WS, Wessels A. Cartilage link protein 1 (Crtl1), an extracellular matrix component playing an important role in heart development. *Developmental biology*. 2007;310(2):291-303.
65. Orlando F, Paolini C, Agarbati S, Tonnini C, Grieco A, Capelli C, Introna M, Provinciali M, Gabrielli A, Moroncini G. Induction of Mouse Lung Injury by Endotracheal Injection of Bleomycin. *Journal of Visualized Experiments*. 2019(146).
66. Xie W, Lu Q, Wang K, Lu J, Gu X, Zhu D, Liu F, Guo Z. miR-34b-5p inhibition attenuates lung inflammation and apoptosis in an LPS-induced acute lung injury mouse model by targeting progranulin. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(9):6615-31.
67. Evanko SP, Gooden MD, Kang I, Chan CK, Vernon RB, Wight TN. A Role for HAPLN1 During Phenotypic Modulation of Human Lung Fibroblasts In Vitro. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2020;68(11):797-811.
68. Shi S, Grothe S, Zhang Y, O'Connor-McCourt MD, Poole AR, Roughley PJ, Mort JS. Link protein has greater affinity for versican than aggrecan. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):12060-6.
69. Rauch U, Hirakawa S, Oohashi T, Kappler J, Roos G. Cartilage link protein interacts with neurocan, which shows hyaluronan binding characteristics different from CD44 and TSG-6. *Matrix Biology*. 2004;22(8):629-39.
70. Andersson-Sjöland A, Hallgren O, Rolandsson S, Weitoft M, Tykesson E, Larsson-Callerfelt AK, Rydell-Törmänen K, Bjermer L, Malmström A, Karlsson JC, Westergren-Thorsson G. Versican in inflammation and tissue remodeling: the impact on lung disorders. *Glycobiology*. 2015;25(3):243-51.
71. Burgstaller G, Oehrle B, Gerckens M, White ES, Schiller HB, Eickelberg O. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *European Respiratory Journal*. 2017;50(1).

72. Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric research*. 2005;57(5 Pt 2):38r-46r.
73. Mižíková I, Morty RE. The Extracellular Matrix in Bronchopulmonary Dysplasia: Target and Source. *Frontiers in medicine*. 2015;2:91.
74. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(3):334-7.
75. Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand FH, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, Matsushima K. Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*. 2013;183(3):758-73.
76. Lecarpentier Y, Gourrier E, Gobert V, Vallée A. Bronchopulmonary Dysplasia: Crosstalk Between PPAR γ , WNT/ β -Catenin and TGF- β Pathways; The Potential Therapeutic Role of PPAR γ Agonists. *Frontiers in Pediatrics*. 2019;7:176.
77. Zhou Y, Horowitz JC, Naba A, Ambalavanan N, Atabai K, Balestrini J, Bitterman PB, Corley RA, Ding BS, Engler AJ, Hansen KC, Hagood JS, Kheradmand F, Lin QS, Neptune E, Niklason L, Ortiz LA, Parks WC, Tschumperlin DJ, White ES, Chapman HA, Thannickal VJ. Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease. *Matrix Biology*. 2018;73:77-104.
78. Mia MM, Boersema M, Bank RA. Interleukin-1 β attenuates myofibroblast formation and extracellular matrix production in dermal and lung fibroblasts exposed to transforming growth factor- β 1. *PLoS One*. 2014;9(3):e91559.
79. Chait A, den Hartigh LJ, Wang S, Goodspeed L, Babenko I, Altemeier WA, Vaisar T. Presence of serum amyloid A3 in mouse plasma is dependent on the nature and extent of the inflammatory stimulus. *Scientific Reports*. 2020;10(1):10397.
80. Zhou Y, Peng H, Sun H, Peng X, Tang C, Gan Y, Chen X, Mathur A, Hu B, Slade MD, Montgomery RR, Shaw AC, Homer RJ, White ES, Lee CM, Moore MW, Gulati M, Lee CG, Elias JA, Herzog EL. Chitinase 3-like 1 suppresses injury and promotes fibroproliferative responses in Mammalian lung fibrosis. *Science Translational Medicine*. 2014;6(240):240ra76.
81. Delfín DA, DeAguero JL, McKown EN. The Extracellular Matrix Protein ABI3BP in Cardiovascular Health and Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2019;6:23.

82. Sawant KV, Sepuru KM, Lowry E, Penaranda B, Frevert CW, Garofalo RP, Rajarathnam K. Neutrophil recruitment by chemokines Cxcl1/KC and Cxcl2/MIP2: Role of Cxcr2 activation and glycosaminoglycan interactions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020.
83. Horii T, Morita S, Kimura M, Terawaki N, Shibutani M, Hatada I. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Scientific Reports*. 2017;7(1):7891.