

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 田中 広輔

【背景】

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る中心的な治療である。長期間にわたる高濃度酸素投与は、重度の高濃度酸素性急性肺障害、急性呼吸窮迫症候群を引き起こす。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り、酸素性肺障害を軽減する治療法が期待されている。

齧歯類に対する高濃度酸素曝露は種々の肺障害のモデルとして用いられている。齧歯類の新生仔は成獣に比べ高濃度酸素に対する耐性を有し、高濃度酸素環境下でより長期に生存可能であることが知られているが、機序に関しては不明な点が多い。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たな治療法開発において重要な手掛かりとなる。

一方、早産児の集中治療においてもしばしば高濃度酸素が用いられるが、早産児では肺の未熟性という要素が加わるため、新生児慢性肺疾患 (bronchopulmonary dysplasia : BPD) という成人と異なる特有の病態を発症する。BPD は、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するため発症機序が複雑であり、その病態は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。BPD は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法がなく、有効な治療法の確立が望まれている。

本研究では、酸素曝露に伴う肺障害に関する研究として以下の2つの研究を行った。

【研究1】

[目的] 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。

[方法] 96 時間の高濃度酸素曝露を行った新生仔と成獣マウスの肺より代謝物を抽出し、capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) によるメタボローム解析を行った。高濃度酸素曝露を行った新生仔と成獣マウスの肺を用いて、ピルビン酸脱水素酵素 (pyruvate dehydrogenase : PDH) 酵素活性アッセイによる PDH の酵素活性の測定、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDH kinase : *Pdk1*, *Pdk2*, *Pdk3*, *Pdk4*) の定量的 PCR 解析、ウェスタンブロッティングによる *Pdk4* タンパクの定量、組織免疫染色による発現解析を行なった。

[結果] 高濃度酸素曝露後の新生仔および成獣マウス肺を用いたメタボローム解析では、主成

分分析により代謝物データを背景（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）と一致した4群のクラスターに分別可能で、各条件特有の代謝プロファイルを示すことがわかった。主成分分析の第1、第2主成分において解糖系を構成する代謝物の負荷量が高値を示したため、著者らは解糖系に着目した。解糖系を構成する 3-phosphoglyceric acid (PG)、2-PG、phosphoenolpyruvate (PEP)、lactic acid は、高濃度酸素曝露を受けた成獣の肺で新生仔の肺よりも高値であり、成獣肺では酸素曝露により対照群と比して増加したが、新生仔肺では有意な変化を示さなかった。

以上のような解糖系における高濃度酸素曝露への反応の違いは、解糖系と TCA 回路を繋ぐピルビン酸を acetyl coenzyme A へと変換する酸化的脱炭酸反応における違いに起因すると考えた。同反応は PDH によって促進される。PDH の酵素活性は、高濃度酸素曝露により成獣肺では有意に低下したが、新生仔肺では変化しなかった。PDH は Pdk (PDH kinase) による可逆的リン酸化を介した反応阻害で活性の制御が行われているため、Pdk の各アイソザイムの mRNA 発現定量を行い、Pdk4 のみが酸素曝露により発現が変化した。Pdk4 mRNA は、高濃度酸素曝露によって成獣と新生仔いずれにおいても上昇したが、新生仔では Pdk4 mRNA の発現自体が成獣に比して低値であり、酸素曝露後も成獣の酸素曝露前より低いレベルに留まった。Pdk4 のタンパクの定量では成獣肺においてのみ発現が上昇し、新生仔肺では変化は見られなかった。Pdk4 タンパクの免疫染色では、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。

[結論]

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を行い、解糖系に関連する代謝物において両者の違いを認めた。これらの解糖系の代謝の違いを生じる機序として、酸素曝露後の成獣において PDH の酵素活性の低下、同酵素を制御する Pdk4 の発現上昇を明らかとした。新生仔では酸素曝露により Pdk4 の mRNA の発現上昇は見られたものの、成獣のような Pdk4 タンパクの発現上昇および PDH 酵素活性の変化は認められなかった。これら酸素曝露に伴う解糖系の代謝の変化の違いが、新生仔と成獣の酸素曝露への感受性の違いに関連していると考えられた。

【研究2】

[目的]

1. BPD 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、BPD 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、BPD 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。

[方法]

出生直後より 96 時間の高濃度酸素曝露を行った新生仔マウス (BPD モデルマウス) において、酸素曝露終了 3 日後の肺組織を用いて網羅的遺伝子発現解析アレイを行なった。BPD モデルマウスにおける *Hapln1* 遺伝子の経時的な発現の変化を定量的 PCR 解析で評価した。組織免疫染色によりマウス肺における *Hapln1* の局在を評価した。*Hapln1* 遺伝子欠損は致死的であるため、*Hapln1* 遺伝子欠損マウスの胎児 (胎齢 18.5) を用いて、肉眼的観察による形態学的評価、肺体重比および肺湿乾重量比測定、組織染色および肺胞嚢領域の分画定量、細胞外マトリックス構成成分の測定を行なった。*Hapln1* 遺伝子欠損マウスの胎仔肺を用いて網羅的遺伝子発現解析アレイを行なった。

[結果]

酸素曝露終了後 3 日の新生仔肺を用いた網羅的遺伝子発現解析アレイでは、高濃度酸素曝露により発現が上昇した遺伝子 83 個、発現が低下した遺伝子 58 個が同定された。Gene Ontology (GO) 解析では発現上昇遺伝子において細胞周期、細胞分裂に関連した Term が有意であったが、発現変化率が上位の遺伝子においてこれらのアノテーションを有する有望な候補遺伝子は捉えられなかった。発現変化率が上位の遺伝子リストより、遺伝子の既知の機能を参考に *Hapln1* 遺伝子に注目することとした。定量的 PCR 解析による *Hapln1* 遺伝子発現の経時変化の評価では、*Hapln1* 遺伝子の発現は酸素曝露により上昇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。

Hapln1 はプロテオグリカンとヒアルロン酸との会合体の安定化を担うリンクタンパクである。組織免疫染色では終末細気管支の上皮細胞を中心に、肺胞上皮細胞周囲においても広範に発現が確認された。

Hapln1 欠損マウスを用いた表現型解析では、*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し、その新生仔全てが出生直後に死亡した。また、*Hapln1* 欠損マウスの胎児の肺は低形性で肺湿乾重量比が小さく、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。*Hapln1* 欠損マウスの胎仔肺における細胞外マトリックス構成成分の測定では、*Hapln1* 欠損マウスにおいて単位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が有意に高値であった。*Hapln1* 欠損マウスの胎仔肺を用い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。発現変動遺伝子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び定量的 PCR 解析を行ったところ、*Saa3*、*Chil1*、*Cxcl1* で発現の上昇、*Abi3bp* で発現の低下を認めた。

[結論]

BPD マウスモデルにおいて酸素曝露により上昇し、曝露終了後も 10 日間以上高発現が持続

する Hapln1 遺伝子を同定した。同遺伝子が肺障害からの肺の修復において重要な役割を果たすと考えた。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、胎児肺を用いた表現型解析を行った。これらの結果より、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、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。