

令和元年6月14日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20343

研究課題名(和文) Nitrofenモデルを用いた先天性横隔膜ヘルニアに対する新規胎児治療法の開発

研究課題名(英文) Novel fetal treatment for congenital diaphragmatic hernia using nitrofen induced rat model

研究代表者

梅田 聡 (UMEDA, Satoshi)

近畿大学・医学部附属病院・診療講師

研究者番号：60715176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：重度の肺低形成を呈する先天性横隔膜ヘルニアのラットモデルに対し、合成プロスタサイクリンアゴニスト徐放性製剤(ONO-1301SR)を母体経路で胎児期に投与した。薬剤が胎児血中へ移行することを確認し、ONO-1301SR投与群では肺重量体重比が有意に増加していた。組織学的分析では、ONO-1301SR投与群で肺胞及び肺血管床の発育効果が認められた。PCRおよびWestern blottingでは胎児肺におけるVEGFの発現が有意に高く、肺低形成改善効果への関与が示唆された。ONO-1301SRの胎生期投与は先天性横隔膜ヘルニアにおける肺低形成に対する新規胎児治療となりうる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、先天性横隔膜ヘルニアに伴う肺低形成に対して母体に徐放性製剤を投与することで、児の肺高血圧の治療および低形成肺の成長促進を確認した点に特色がある。これまで、肺低形成の胎児治療としてプロスタサイクリンやその受容体アゴニスト製剤によって胎児治療を試みたという報告はなく、またDDSの投与によって胎児治療を行ったという研究もないため、胎児治療法としても極めて独創的である。本研究成果は、今後先天性横隔膜ヘルニアにおける肺低形成に対する胎児治療の臨床応用に直結できることが期待され、大変意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：On embryonic day (E) 9.5, nitrofen was given to pregnant Sprague-Dawley rats to establish a CDH-related lung hypoplasia model, whereas normal rats received the vehicle only. The same day, either ONO-1301SR or a placebo was also randomly administered. On E21.5, the fetuses of the normal group and those exhibiting CDH were analyzed. The lung-to-body weight ratio in the CDH+ONO group was greater than that in the CDH group. Histologically, the number of Ttf-1-positive cells and the capillary density were 1.5 times greater in the CDH+ONO group than in the CDH group, and this increase was associated with higher expression of VEGF in the CDH+ONO group, suggesting enhanced development of the alveolar and capillary networks. Thus, prenatal ONO-1301SR was protective against the progression of lung hypoplasia associated with CDH in a nitrofen-induced rat model, indicating the potential of this treatment for pathologies exhibiting lung hypoplasia.

研究分野：小児外科

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア 肺低形成 胎児治療 プロスタサイクリンアゴニスト 徐放性製剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

新生児・胎児肺低形成は、原発性（特発性）に発症する場合と、二次的（続発的）に発症する場合とがある。二次的に発症する新生児・胎児肺低形成は、先天性横隔膜ヘルニア、先天性嚢胞性肺疾患、胎児胸水、胎児尿路閉塞性疾患などに随伴して発症することが知られている。重症度は原因疾患や病態によって非常に幅広く、高度の肺低形成の予後は極めて不良である。これら二次的な肺低形成に対しては、適切な時期に胎児治療を行えば救命の可能性があると考えられてきた。

先天性横隔膜ヘルニアは、わが国で年間 200 例程度発症する希少疾患である。生存率は約 80%と予後不良で、生存例においても長期障害残存例が 15%程度存在する。重症例の主たる病態は、横隔膜の先天的な欠損孔を通じて胸腔内に嵌入した腹部臓器の圧迫によって胎児期から生じる肺低形成と、その低形成肺に伴う新生児遷延性肺高血圧症である。近年の胎児診断技術の向上により、わが国では本症の約 75%が出生前診断されており（Nagata K et al. *J Pediatr Surg* 2013）、この高い胎児診断率をみると、出生までの胎児期は非常に重要な治療の機会と考えられる。近年では、胎児治療として欧米で開発された胎児気管閉塞術（Fetal Endotracheal Occlusion: FETO）の早期安全性試験がわが国でも開始された。しかしながら長期成績も含めて本症の予後は依然不良であり、本症の更なる予後改善のためには、現在試みられている侵襲的な胎児治療のみならず、薬剤投与を中心とした新たな胎児治療の開発とその臨床応用が急務となっている。

Nitrofen 誘発ラット肺低形成モデルは、ヒトにおける先天性横隔膜ヘルニアと肺低形成を再現した動物実験モデルとして広く用いられてきた（Ambrose AM et al. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971）。本モデルは本症でみられる低形成肺の主たる病態（終末細気管支数・肺容量・肺血管床の減少、肺動脈血管平滑筋の肥厚、血管反応性の変化（血管拡張能の低下/血管収縮能の増強））を再現していることが知られている。本モデルを用いて、肺低形成とそれに伴う肺高血圧に対する胎児治療の実験が近年行われ始めた。即ち、本モデルの肺を器官培養して培地内に一酸化窒素（NO）（Shinkai M et al. *J Pediatr Surg* 2005）や VEGF（Shinkai M et al. *J Pediatr Surg* 2006）を投与することで肺形成促進効果が認められ、本モデルの母体にホスホジエステラーゼ 5 阻害薬である Sildenafil を投与することで胎児の出生後の肺高血圧の改善効果が認められた。しかし臨床応用へは至っていない。

ONO-1301（以下、本剤）は、化学的安定性を持つ選択的プロスタサイクリン受容体アゴニストおよびトロンボキサン合成阻害薬として開発された。プロスタサイクリンは、その強力な血管拡張作用によって肺高血圧の治療薬として臨床で用いられているが、本剤も同様の血管拡張作用に加えて、血管平滑筋増殖抑制作用、肝細胞増殖因子（HGF）/血管内皮細胞増殖因子（VEGF）などの内因性増殖因子発現誘導作用を認めることが報告されている。実験的には、血管新生作用や肺高血圧の改善作用も証明している。すなわち、マウス心筋梗塞モデルに対して本剤を梗塞心筋に局所注入することで、梗塞領域への血管新生や心機能の改善が認められたこと（Nakamura K et al. *Clin Sci* 2007）、ラット肺高血圧モデルに対して本剤を連日皮下投与を行うと、右室肥大や肺動脈中膜肥厚が改善したこと（Kataoka M et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2005）が示された。なお、プロスタサイクリンは短時間作動性の薬剤であるが、本剤は PLGA（poly（D,L-lactic-co-glycolic acid））マイクロスフェアに重合させることで徐放性製剤（DDS: ONO-1301 SR）として開発されて、単回投与でも同様の効果を長時間維持できるようになった（Obata H et al. *Am J Respir Crit Care Med*）。

2. 研究の目的

先天性横隔膜ヘルニアなどに伴う肺低形成に対する胎児治療は、基礎研究においても臨床においても今後の発展が期待されている。近年、動物実験による nitrofen 誘発ラット肺低形成モデルに対する薬物を用いた胎児治療で、Sildenafil の母体投与によって胎児肺の形成促進効果および肺高血圧の改善効果が認められたと研究報告された（Luong C et al. *Circulation* 2011）。本応募研究課題は、これらの研究動向を踏まえて、nitrofen 誘発ラット肺低形成モデルに対して、プロスタサイクリン受容体アゴニストであり、トロンボキサン合成阻害作用のある ONO-1301 MS を、母体経路で投与して胎児治療を行い、胎児肺の成長促進効果および肺高血圧の改善効果を検討することを目的とする。本研究課題は、今後先天性横隔膜ヘルニアをはじめとする新生児・胎児肺低形成に対する胎児治療として、臨床応用に発展することが期待される。

3. 研究の方法

実験動物には Sprague-Dawley ラット（妊娠満期 22 日）を用いる。妊娠 9.5 日の母獣に nitrofen 100mg をオリーブオイル 1ml に溶解して、胃ゾンデを用いて胃内へ投与した。妊娠 21.5 日に帝王切開にて胎仔を娩出させ、横隔膜ヘルニアの有無、肺低形成及び肺高血圧の程度について組織学的評価および遺伝子・タンパク発現の定量的評価を行った。肺低形成モデルが安定して作成できることを確認したのちに、ONO-1301SR を母獣に投与して妊娠 21.5 日に胎仔を娩出させた。control 群（生理食塩水のみ）と組織学的評価および遺伝子・タンパク発現の定量的評価を比較することによって、ONO-1301SR の肺低形成および肺高血圧に対する改善効果を検討した。

4. 研究成果

ONO-1301SR の指摘投与時期及び投与量について検討した。投与量については 3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg に振り分け、また投与時期については妊娠 9.5 日、11.5 日、13.5 日に振り分けた。その結果、最も肺重量体重比の増加が認められ、肺低形成の改善効果が認められた妊娠 9.5 日に 30mg/kg を投与する方法を採用した。児は妊娠 21.5 日に帝王切開にて娩出し、直ちに犠牲死させ、横隔膜欠損孔の有無を検索したのちに肺を摘出し、評価を行った。ONO-1301SR 投与群で胎児肺に含まれる総 DNA 量や総タンパク量が有意に増加し、肺低形成の改善効果が示唆された。ヘマトキシリン-エオジン染色にて平均肺胞隔壁間距離を計測し、肺胞腔の定量評価を行った。結果として ONO-1301SR 投与群で非投与群に比して平均肺胞隔壁間距離が有意に増加しており、肺胞発育効果が示唆された。また Elastica-van-Gieson 染色にて肺動脈中膜肥厚を計測し肺高血圧の組織学的評価を行った。結果として、ONO-1301SR 投与群で非投与群に比して肺動脈中膜肥厚が有意に低減しており、肺高血圧の改善効果が示唆された。さらに II 型肺胞上皮細胞のマーカである Ttf-1 の免疫染色を行ったところ、ONO-1301SR 投与群で Ttf-1 陽性細胞数が非投与群に比して有意に増加しており、肺成熟効果が示唆された。また血管内皮細胞のマーカである Isolectin B4 を用いた染色では ONO-1301SR 投与群で非投与群に比して Isolectin B4 陽性領域が有意に増加しており、肺血管発育効果が示唆された。さらに、PCR および Western blotting にて、ONO-1301SR 投与群では、胎児肺における VEGF の発育が有意に高く、胎児の肺胞および肺血管発育への影響が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

①梅田 聡、奥山宏臣 肺低形成に対する再生治療 先天性横隔膜ヘルニアに対する新規胎児治療の展望 小児外科 2017 49(6) ; 555-560 査読有

②Satoshi Umeda, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Noriko Oda, Atsuhiko Saito, Yoshiki Sakai, Yoshiki Sawa, Hiroomi Okuyama: Enhanced Pulmonary Vascular and Alveolar Development via Prenatal Administration of a Slow-Release Synthetic Prostacyclin Agonist in Rat Fetal Lung Hypoplasia. PLoS One 2016 Aug 16; 11(8): e0161334 査読有

〔学会発表〕 (計 1 件)

① Satoshi Umeda, Hiroomi Okuyama: Enhanced Pulmonary Vascular and Alveolar Development via Prenatal Administration of a Slow-Release Synthetic Prostacyclin Agonist in Rat Fetal Lung Hypoplasia. Congenital Diaphragmatic Hernia International Workshop Symposium 2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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