

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

関口記念特別賞受賞

新生児慢性肺疾患の感受性遺伝子解析に関する研究

研究代表者 小川 亮 (総合医療センター 小児科)

緒言

新生児慢性肺疾患 (chronic lung disease, 以下CLD) は「先天奇形を除く肺の異常により酸素投与を必要とするような呼吸窮迫症状が新生児期に始まり日齢28を超えて続くもの」である。CLDは未熟児の合併症の中でも最も重篤なもののひとつであり、しばしば退院後も長期間にわたって呼吸機能に問題を残す。めざましい周産期医療の進歩に関わらず、CLDの発症率には変化がなく、また有効な治療法はない。CLDは未熟性・高濃度酸素暴露・胎内感染・機械的人工呼吸管理等の多因子による疾患であるが、近年双生児研究により、遺伝の関与も示唆されている。今回われわれは、①高濃度酸素暴露CLDマウスモデル肺の網羅的遺伝子発現解析を行いCLD疾患関連遺伝子候補を同定することと、②CLDの発症・重症化に関連する遺伝子の遺伝子多型解析を行うことを目的とした。

対象と方法

1. 遺伝子発現解析

マウスはC57BL/6マウスを用いた。生後12時間以内の新生児マウスに95%酸素を96時間(4日間)動物チャンバー内で暴露し、CLDマウスモデルを作製した(図1)。3日間ルームエアで回復させた日齢7のマウスから肺を摘出し、mRNAを抽出した。microarrayを用いて網羅的に遺伝子発現解析を行った。コントロールはルームエアで飼育した日齢7マウスとした。同定した遺伝子の発現量はqPCRを用いて確認した。



Animal chamber
O₂ controller
CO₂ controller

図1. 動物チャンバー。動物チャンバー内で新生児マウスに対して95%酸素を96時間暴露する。

2. 遺伝子多型解析

両親へのインフォームドコンセント後、在胎期間32週未満かつ出生体重1250g未満の早産・低出生体重児から末梢血2mLを採取した。採血はEDTA入り採血管に行い冷蔵庫保存した。Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)を用いてDNAを抽出し、注目する遺伝子hyaluronan and proteoglycan link protein 1(以下Hapln1)の遺伝子多型をTaqMan® SNP Genotyping Assaysを利用して解析した。

結果

1. 遺伝子発現解析

生後12時間以内の新生児マウスに95%酸素を96時間暴露し、CLD動物モデルを作製した。96時間以降はルームエアで飼育した。新生児期高濃度酸素暴露後、ルームエア下でリカバリーさせた日齢7のマウス肺を用いて遺伝子発現解析を行った。ルームエア下で7日間飼育したマウス肺をコントロールとした。コントロールと比較して肺で2倍以上有意に発現量の異なる遺伝子をスクリーニングし、5つの遺伝子を同定した(図2, 図3)。同定した5つの候補遺伝子の中から、細胞外基質で重要な役割を果たし、その欠損マウスは生後すぐ呼吸不全で死亡し、日本人の遺伝子多型が報告されているHapln1遺伝子に注目し、以降の解析を行った。まず、microarrayの結果の妥当性を確認するため、Hapln1の発現量をqPCRを用いて確認した。microarrayの結果と同様に高濃度酸素暴露群ではコントロール群と比較して、Hapln1遺伝子の発現量が2倍以上有意に増加していた(図4)。次にHapln1遺伝子の発現量を同様にqPCRで時系列に定量したところ、Hapln1遺伝子発現量は高濃度酸素暴露後の回復期にコントロールと比較して有意に上昇し、この有意差は成獣期まで持続した(図5)。

2. 遺伝子多型解析

埼玉医科大学総合医療センターおよび埼玉医科大学の倫理委員会の承認を得て、研究を開始した。対象患児の両親の同意を得た後、患児18人から末梢血2mLを採取した。末梢血全血からキット(Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega)を用いてゲノムDNAを抽出し、

Hapln1の遺伝子多型をタイピングした(図6, 図7). 現在, 症例数を増やして, Hapln1 遺伝子多型とCLDの発症・

重症度との関係を解析中である.

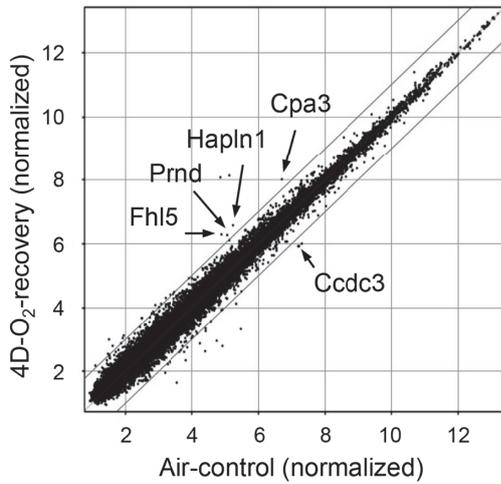


図 2. 遺伝子発現解析(マウス肺). 両群間(O₂ 対 Air)で有意に2倍以上発現量の異なる遺伝子5つを同定した.

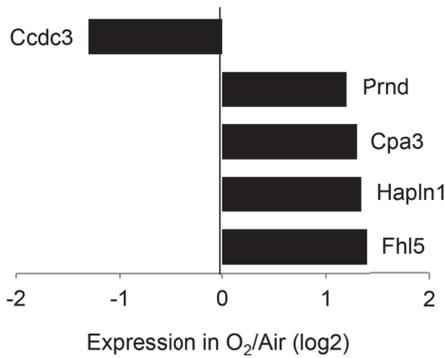


図 3. 候補遺伝子. 候補遺伝子の発現量の比(O₂/Air).

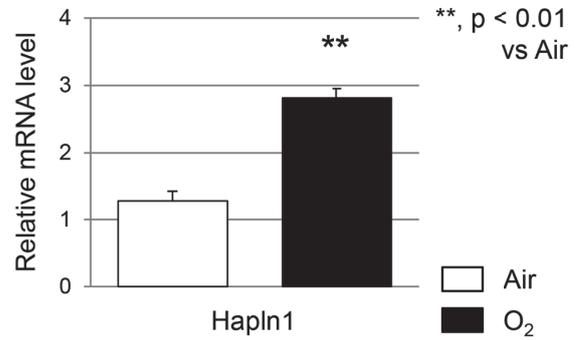


図 4. Hapln1 遺伝子発現量の比較. 高濃度酸素暴露群ではHapln1 遺伝子発現量がコントロール群と比較して有意に増加した.

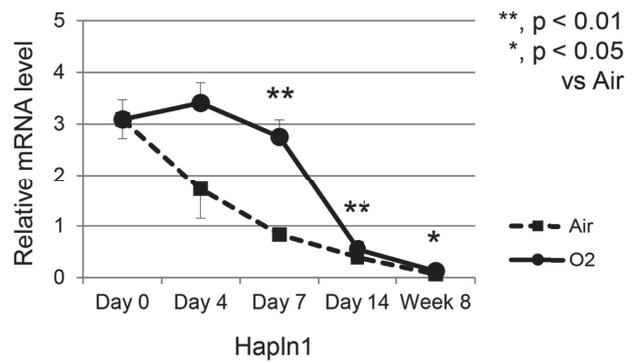


図 5. Hapln1 遺伝子発現の時間的推移. コントロール群と比較して, 高濃度酸素暴露群では暴露後回復期にHapln1 遺伝子の発現量が増加し, その増加は成獣期まで続く.

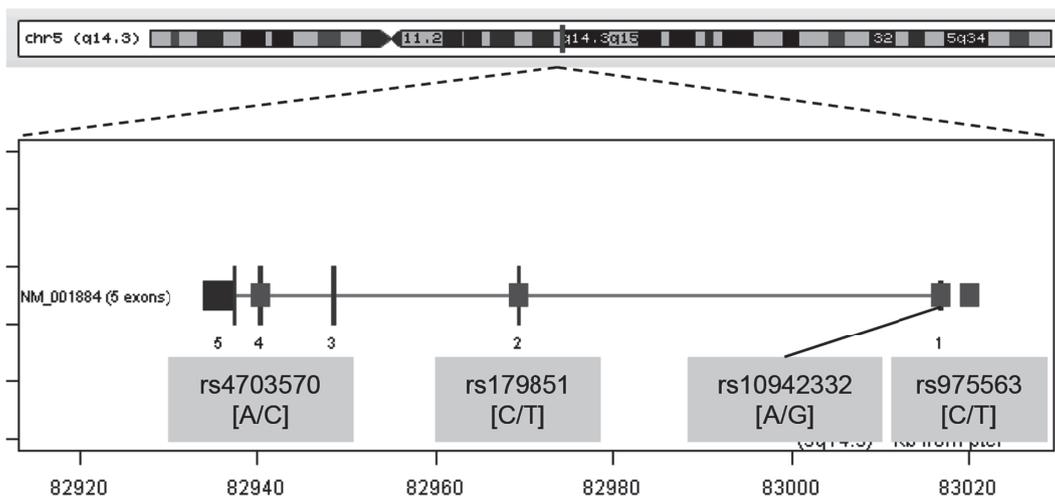


図 6. Hapln1 遺伝子と同遺伝子内SNP遺伝子座.

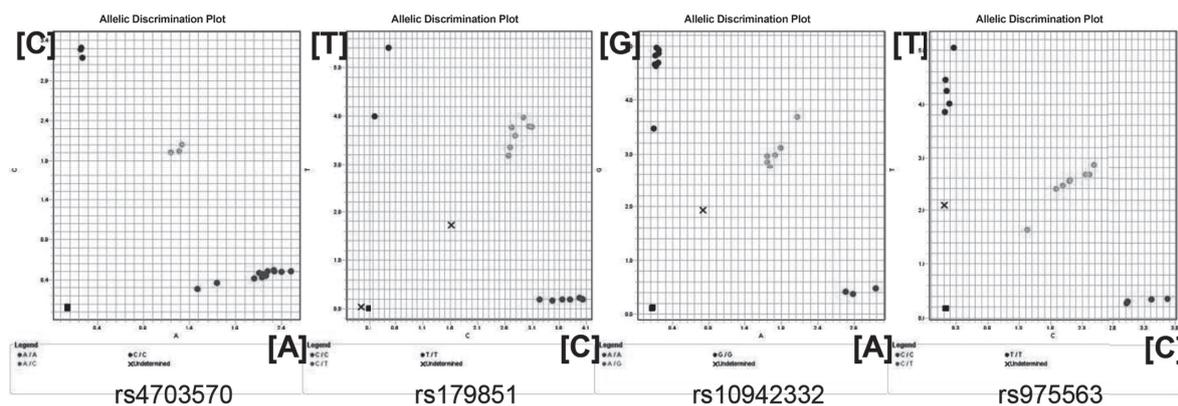


図 7. Hapln1 遺伝子多型タイピング.

考 察

CLDは、めざましい新生児医療の発展にもかかわらず、未だ早産・低出生体重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 1000 g未満の超低出生体重児に限っては50%以上が罹患する。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。

CLDの予後判定や治療法の開発のためには新規バイオマーカーの同定が必須である。今回われわれは、CLDマウスモデルの回復期肺を用いた遺伝子発現解析を行い、マウス肺でコントロールと比較して有意に発現量が増加・低下する遺伝子を5つ同定した。その中から、CLDの病態に重要である細胞外基質蛋白であり、その遺伝子欠損マウスは生直後呼吸不全で死亡し、日本人の遺伝子多型も報告されているHapln1に注目し、以降の解析を行った。microarrayを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果と同様、qPCRによりHapln1遺伝子発現はCLDマウスモデルの回復期に増加し、その増加は成獣期まで持続した。

さらに、CLDは多因子疾患であり、過去の双生児研究等により遺伝もCLDの病因の一つとして報告されている。現在、多施設共同研究を開始し、患者血液よりgenomic DNAを収集中である。CLD動物モデルで候補遺伝子として同定され、日本人での遺伝子多型もすでに報告されているHapln1を最初の候補遺伝子として遺伝子多型解析を行っている。

結 論

• CLD動物モデルを用いて、CLD回復期に重要な遺伝子Hapln1を同定した。

• 遺伝子多型解析のため患者血液よりgenomic DNAを収集し、Hapln1遺伝子多型を解析中である。

研究成果リスト

論文発表

- 1) Ogawa R, Mori R, Namba F, et al. Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia in Japan: questionnaire survey. *Pediatr Int* 2015;57:189-92.

学会発表

- 1) Ogawa R, Mori R, Sako M, et al. Drug therapies for bronchopulmonary dysplasia in Japan: A questionnaire survey, Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, May 2014, Vancouver, Canada
- 2) Ito M, Arai Y, Ogawa R, et al. Genetic ablation of the Bach1 gene upregulates HO-1 and IL-6 expression in the newborn lung exposed to hyperoxia, Pediatric Academic Societies Annual Meeting, May 2015, San Diego
- 3) Namba F, Ito M, Ogawa R, et al. 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, May 2015, San Diego
- 4) 小川 亮, 森臨太郎, 佐古まゆみ, 他. わが国における新生児慢性肺疾患薬物療法：アンケート調査から, 第50回日本周産期・新生児医学会, 2014年7月, 浦安
- 5) 難波文彦, 小川 亮, 伊藤誠人, 他. 動物モデルを用いた新生仔期高濃度酸素暴露の長期的影響と肺傷害修復過程における重要分子の同定, 第59回日本未熟児新生児学会, 2014年11月, 松山
- 6) 小川 亮, 伊藤誠人, 飯田浩一, 他. 新生児慢性肺疾患に対するシベレスタットナトリウム投与の有効性：後方視的多施設共同研究, 第51回日本周産期・新生児医学会, 2015年7月, 博多