

学位論文題名

RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN  
PREVENTS LUNG DAMAGE IN A RAT MODEL OF  
NEW BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA

(遺伝子組換えヒトエリスロポエチンは新型気管支肺異形成モデルラットの肺障害を予防する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】近年新生児医療分野において、人工肺サーファクタントの開発や肺保護戦略に基づく呼吸管理法により、呼吸窮迫症候群 (RDS) の児の生命予後は改善し、古典的な気管支肺異形成 (BPD) は減少した。一方で、より未熟な児を救命可能になったものの、それらの児は長期間の人工換気を要し、以前は報告されていなかった、新しいタイプの BPD が問題になっている。

この肺障害は new BPD と呼ばれ、臨床的にも組織学的にも古典的な BPD とは異なる。New BPD は出生後の呼吸障害は軽いものの、数日から数週間後急激に呼吸状態が悪化し、長期間の呼吸管理や酸素投与が必要となり、しばしば肺高血圧症を合併して、死に至る。組織学的には、古典的 BPD の特徴である気道の傷害や炎症所見、線維化は軽いが、肺胞の二次中隔の発生の停止と、血管成長の停止が認められる。New BPD の多くには子宮内感染が合併しており、炎症を抑える治療は一時的に呼吸を改善するものの、将来的には肺の成長を抑制する可能性があるため、有効な治療法は現在存在していない。

エリスロポエチンは、主に腎臓と胎児の肝臓で作られ、骨髄内の赤芽球系幼若細胞に結合してその増殖分化を促進し造血作用を発揮する。1990年前後から、エリスロポエチンとその受容体が、体内の様々な組織で発現していることが発見された。この発見が契機となり、エリスロポエチンの造血以外の作用である、組織保護作用が発見された。組織保護作用は主に脳と心臓を対象として研究され、多くの有効性が確認されているが、少数ながら、肺を含む他臓器の保護作用も確認されている。そこで我々は、生後早期にエリスロポエチンを外的に投与することで、new BPD を抑制できるのではないかという仮説を立てた。

【対象と方法】new BPD のモデルとして、上田らが作成した、子宮内に Lipopolysaccharide (LPS) 投与することによって new BPD に相当する肺の組織変化が発生する新生児ラットモデルを用いた。分娩予定日の前日である妊娠 21 日目に母体ラットを全身麻酔下で開腹し、子宮内に LPS 1 $\mu$ g または同容量の生理食塩水を注入した。一時的に閉腹し、24 時間後の本来の予定日に帝王切開で仔を出生させた。経膈分娩ではないため、仔は皮膚刺激や羊水のふき取りなどの簡単な蘇生処置を必要とするが、酸素毒性や肺障害を避けるために、蘇生時には酸素投与や人工呼吸は施行しなかった。まず LPS 投与群と非投与群、各 5 匹の肺を摘出し、免疫染色とウエスタンブロット法を用いてエリスロポエチン受容体が発現していることを確認した。残りのラットは、ランダムに 4 軍に分け、それぞれ NN 群 (n=60: 出生前生理食塩水、出生後生理食塩水投与群)、NE 群 (n=57:

出生前生理食塩水、出生後エリスロポエチン投与群)、LN 群 (n = 67 : 出生前 LPS 投与、出生後生理食塩水投与群、すなわち new BPD に治療を行わなかった群)、LE 群 (n = 72 : 出生前 LPS 投与投与、出生後エリスロポエチン投与群、すなわち new BPD に生後エリスロポエチン治療をおこなった群) とした。出生後のエリスロポエチン投与(1000 U/Kg)は蘇生後 1 時間以内に、30G 針を用いて皮下注射で投与した。コントロール群には、同容量の生理食塩水を同様に皮下注射した。その後二時間保育器内で保温を行うと共に、里親の糞尿を用いて新生仔ラットの匂い付けを行った。生後全身状態が安定したことを確認し、新生仔ラットは、同じタイミングで経膈分娩をおこなっていた里親につけた。里親あたりの新生仔の数に差がでないように調節をおこなった。日齢 6 までの 7 日間、連日体重測定を行い、エリスロポエチン (1000 U/kg) の皮下注射を行った。日齢 14 と 28 に、ラットを安楽死させ、気管から 20cmH<sub>2</sub>O の圧を 20 分間かけて 10%ホルマリンで固定した後に肺を摘出した (各群 n = 10)。摘出した肺の左様を切離しパラフィン包埋後、4 μm の厚さに薄切してスライドを作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色後、光学顕微鏡を用いて肺の構造の評価をおこなった。肺の構造の評価のためにモルフォメトリー法を用い、単位体積あたりの肺胞の表面積、肺胞半径、肺胞数を算出した。4 群の比較には 1 元配置または 2 元配置の分散分析を用い、各群間の比較に Scheffe 法を用いた。有意水準を 5%に設定した。

【結果】生存率は、出生前に LPS を投与された LN 群、LE 群がともに、LPS 非投与群に比べて有意に低値だった。LPS 投与群、非投与群ともに、エリスロポエチン投与は生存率に影響しなかった。体重増加は、NN 群、NE 群がともに LN 群、LE 群よりも良好であり、有意差を認めた。エリスロポエチン投与は体重増加に影響しなかった。免疫染色において、肺の血管内皮細胞および肺胞上皮細胞にエリスロポエチン受容体の発現があることを確認した。発現は、LPS 投与群よりも非投与群の方が強く、同様の結果が、ウェスタンブロット法によっても確認された。光学顕微鏡所見では、LN 群が他の 3 群にくらべて肺胞が大きく、二次中隔が少なく肺胞数が少ない所見であり、これは、日齢 14 よりも 28 において顕著であった。単位体積あたりの肺胞表面積は、日齢 14 においては LN 群が NN、NE 群と比べて有意に低値だった。日齢 28 では LN 群は残りの 3 群すべてに対して有意に低値だった。LE 群は、NN 群、NE 群との間に有意差を認めなかった。肺胞半径は、日齢 14、28 とともに、LN 群は NN 群、NE 群、LE 群に対して有意に大きかった。LE 群の肺胞半径は、NN 群および NE 群との間に有意差を認めなかった。単位体積あたりの肺胞数に関しては、LN 群が、他の 3 群に比べて、日齢 14、28 とともに有意に低値だった。NN 群、NE 群、LE 群は、日齢 28 の肺胞数が日齢 14 の値と比べて増加していたが、LN 群は低値のまま横ばいだった。ヘマトクリット値は、日齢 14 においてエリスロポエチン群がやや高値であったが有意差はなかった。

【考察】われわれは、新生仔ラットの肺にエリスロポエチン受容体が発現していることを初めて示した。また、エリスロポエチンが、出生前に LPS 投与に暴露された新生仔ラットの肺病変を軽減することを示した。エリスロポエチンが肺の組織変化を軽減した理由として大きく 2 つの機序が推測される。一つが抗アポトーシス作用であり、この作用は主に中枢神経保護を対象としてエリスロポエチン投与を行った研究において確認されている。もう一つの機序は、エリスロポエチンの成長因子としての作用である。エリスロポエチンは、単独で血管成長作用をもつと同時に、血管内皮成長因子や、血管内皮前駆細胞に作用して血管の修復、成長を促進することが明らかになっている。この血管の成長促進作用が、new BPD の病態と考えられる肺の血管や肺胞の成長停止に対して治療的な効果を示した可能性が考えられた。

【結論】生後のエリスロポエチン投与は、new BPD モデルラットにおいて、肺障害を予防した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 上 尚 典  
副 査 教 授 西 村 正 治  
副 査 教 授 森 本 裕 二  
副 査 教 授 有 賀 正

学位論文題名

## RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN PREVENTS LUNG DAMAGE IN A RAT MODEL OF NEW BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA

(遺伝子組換えヒトエリスロポエチンは新型気管支肺異形成モデルラットの肺障害を予防する)

本研究は、胎児ラットを lipopolysaccharide (LPS) に暴露することによって作成した New Bronchopulmonary dysplasia (BPD) モデルに対する、Erythropoietin (EPO) の肺保護作用を検討したものである。ラット肺での EPO 受容体の発現について、抗 EPO 受容体抗体を用いた免疫染色とウエスタンブロット法を用いて調べられた。その結果、EPO 受容体は、気管支上皮細胞、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞に確認された。次に、生後 EPO を投与することによる肺の組織所見の変化について、肺切片に対するモルフォメトリー法を用いて、単位体積当たりの表面積、肺胞半径、肺胞数を算出することで検討された。結果としては、New BPD モデルに認められる肺病変（肺胞表面積の減少、肺胞半径の増大、肺胞数の減少）が、EPO 投与群では有意に軽減しており、正常対照群との差がなくなっていた。ラットの生存率は、New BPD モデル群において有意に低下しており、EPO 投与は生存率に影響を与えなかった。ラットの体重は、New BPD モデル群において増加不良であった。EPO 投与は体重増加に影響を与えなかった。EPO 投与は生後 14 日、28 日のヘマトクリット値に影響を与えなかった。

発表終了後、副査森本教授より、このモデルと成人の急性肺障害のモデルの違いを問われ、急性呼吸障害モデルでは、出生後に LPS を投与するのに対し、New BPD モデルでは、出生前に LPS を投与しているという点が違っていると回答した。また、ヒト New BPD の発症時期を問う質問には、生後 2 週間前後であることが多いと回答した。西村教授から、生存率が変わらなかったのはなぜかとの質問があり、死亡した仔は里親が食べてしまうため詳しい死因はわからないが、大部分の死亡が生後二日以内であり、呼吸障害の進行以前に LPS の影響により生下時から弱っておりそのまま死亡する

可能性が高いと回答した。EPO を投与しても体重が増えないのはなぜかとの質問には、LPS 投与群は出生体重が平均 4.7g であるのに対し非投与群は 5.3g であり出生時から有意な体重差がある。子宮内炎症がエピジェネティックに影響し、胎児発育制限と生後の成長障害を誘発する報告があり、同様に遺伝子学的な異常が生じた可能性がある」と回答した。New BPD 予防効果に至るメカニズムがわからないのが残念であるとの指摘に、今後、アポトーシス蛋白の評価や、血管増殖因子の評価を行い、機序の解明に努めたいと回答した。EPO 受容体は、定常的に発現しているものなのか、ヒトの成人にもあるのかとの問いには、成獣ラットの肺に受容体があることは、ブレオマイシンのモデルで証明されている。おそらく成人でも発現しているが、成長期のほうが強発現であろうと回答した。副査有賀教授から、ヒトの EPO をラットに使うことの可否についての質問があり、哺乳類の EPO 受容体の構造を比べた報告では、ヒトとラットの EPO の構造は 89% の相同性があり、別の報告では、ヒトの EPO は、ラット受容体に対し同等の親和性を持つことが示されていると回答した。EPO の多量投与を行いながら、ヘマトクリットが変わらなかった理由を問われたが、考えうる理由の一つが、ヘマトクリットを測定した時期が投与終了から 2 週間が経過しているためであり、もう一つは、ラット個体によるヘマトクリットの差が大きく、今回の検討では症例が少なかった可能性がある」と回答した。主査水上教授から、EPO の肺保護作用に関する臨床研究の存在について質問があり、名古屋市立大学主導で、脳室周囲白質軟化症を予防する目的で、生後まもない早産児に対し EPO を投与する RCT が開始されており、BPD の発症がセカンダリーアウトカムになっていると回答した。また、1997 年にヨークシャーで、EPO 投与により輸血が減ることで BPD が減少するかどうかの RCT が行われたが、これは目標症例数に足りず途中で中断されたものの、人工換気日数の減少傾向が認められたと回答した。EPO による副作用のため中止ではないのかとの質問に対し、そうではないと回答した。副査西村教授からの再度の、今回の結果の一番の機序は何かとの質問に対し、EPO による肺の成長作用が主要な機序であると考えており、なぜなら子宮内に LPS を投与してから 24 時間以上経過した後に EPO を投与しているにもかかわらず、肺の所見が改善しているためと回答した。

早産期低出生体重児において new BPD は大変大きな臨床的問題である。本研究による知見は、今後の New BPD に関する問題克服に資することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。