

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 坂井 宏平

### 論文題目

Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia.

### 論文内容の要旨

先天性横膈膜ヘルニア (CDH) に対して、当科では gentle ventilation による新治療の導入により、CDH 単独の救命率は著明に向上してきている。しかし、出生前診断された重症肺低形成を伴う患児の救命率は依然として低いままである。ボンベシン (BBS) は14個の直鎖ペプチドであり、ヒト、ヒト以外の霊長類、ラット、およびマウスにおける胎児肺の成熟に関与するといわれている。当科では過去にラット小腸移植モデルにおいて、BBS がグラフトに対し、腸管粘膜構造維持作用、免疫賦活作用、腸管微小循環維持作用、虚血再灌流障害防止作用をもたらすことを証明してきた。我々は BBS の多彩な効果に注目し、CDH ラットに胎児治療として用いることで、肺低形成の予防効果を得られるかを検討した。

妊娠 SD ラット (term 22days) に対し妊娠 9.5 日に nitrofen 100mg を olive oil 1ml に溶解させ全身麻酔下に経口胃管を通して1回投与した。コントロールには olive oil のみを投与した。生食で溶解した BBS を osmotic pump に 50 $\mu$ g/kg/day となるように注入し、妊娠 14 日に腹腔内に留置して持続投与を開始する。コントロールには生食のみを osmotic pump に注入した。Group1 (nitrofen(-), BBS(-))、Group2 (nitrofen(+), BBS(-))、Group3 (nitrofen(+), BBS(+)) の3つの群にわけて検討した。妊娠 21 日で帝王切開にて胎子を娩出した後、犠牲死させ、体重を測定、その後肺を摘出して肺重量を測定した (Group2、Group3 については CDH を発症した胎子のみで解析を行った。) 肺成熟度の評価は細胞増殖マーカーである PCNA と肺胞 II 型細胞のマーカーである TTF-1 に関して、免疫染色及び RT-PCR を行った。

CDH 発症率は BBS 非投与群(Group2)で 50%(13/26 体)、BBS 投与群(Group3)で 49%(24/49 体)であり有意差は認めなかった。発症した CDH は全て左 CDH であり、BBS を投与された CDH ラットには他の合併奇形は認めなかった。肺体重比に関して、control (n = 23)、CDH/BBS(-) (n = 13)と CDH/BBS(+)(n =

24)でそれぞれを比較した。Control 群は CDH/BBS(-)群よりも肺体重比は有意に高値であった (23.86 $\pm$  2.78[control] vs 16.05 $\pm$ 2.32[CDH/BBS(-)], p < 0.01)。一方で CDH/BBS(+群)は CDH/BBS(-)群よりも有意に肺体重比が高値であった (18.29 $\pm$ 3.03 [CDH/BBS(+)] vs 16.05 $\pm$ 2.32[CDH/BBS(-)], p < 0.01)。

免疫染色では、PCNA 染色では control 群は CDH/BBS(+群)、CDH/BBS(-)群の両者よりも優位に陽性細胞数が少なかった (290.4 $\pm$  50.65[control] vs 877.0 $\pm$  87.8 [CDH/BBS(-)], p < 0.01, 290.4 $\pm$  50.65[control] vs 501.8 $\pm$ 72.7 [CDH/BBS(+)], p < 0.01)。CDH/BBS(+群)と CDH/BBS(-)群の比較では CDH/BBS(-)群の方が陽性細胞が多かった (877.0 $\pm$ 87.8 [CDH/BBS(+)] vs 501.8 $\pm$ 72.7 [CDH/BBS(-)], p < 0.01)。TTF-1 染色でも CDH/BBS(-)群は control 群、CDH/BBS(+群)いずれと比較しても有意に陽性細胞が多かった (238.4 $\pm$ 52.8 [control] vs 664.0 $\pm$ 90.5 [CDH/BBS(-)], p < 0.01, 267.6 $\pm$ 30.0 [CDH/BBS(+)] vs 664.0 $\pm$ 90.5 [CDH/BBS(-)], p < 0.01) )。

RT-PCR では PCNA の mRNA 発現量は CDH/BBS(+群)では低値であったが、CDH/BBS(-)群と比較して有意差は認めなかった (2.49 $\pm$  1.11[CDH/BBS(-)] vs 1.69 $\pm$  0.58[CDH/BBS(+)]。一方で TTF-1 の mRNA 発現量は CDH/BBS(+群)が有意に CDH/BBS(-)群と比較して減少していた (2.55 $\pm$  1.21[CDH/BBS(-)] vs 1.45 $\pm$  0.23[CDH/BBS(+)], p < 0.05)。

今回の研究では、PCNA と TTF-1 を肺成熟のマーカーとして使用した。PCNA 陽性細胞は未成熟肺で増加する傾向にある。我々の作成した CDH ラットの低形成肺において PCNA 陽性細胞、mRNA の発現量は共に増加し、その未熟性を示唆する結果となった。TTF-1 は肺胞 II 型細胞のマーカーである。肺胞 II 型細胞は肺胞上皮の stem cell の役割を担うとされており、CDH モデルの低形成肺において増加することが報告されている。TTF-1 陽性細胞、mRNA 発現量は共に我々の CDH ラットでは増加していた。この二つのマーカーの結果から我々の作成した CDH モデルの低形成肺の未熟性が証明された。BBS の肺成熟効果として、CDH/BBS(+群)では PCNA・TTF-1 共に発現量は低下していた。

これらの結果は BBS が肺成熟効果を促進したことが示唆された。BBS が CDH における胎児薬物治療に大きく貢献できる可能性があり、BBS のより効果的な投与時期、投与量に関しては今後さらなる検討が必要である。