

厚生労働科学研究委託費（成育疾患克服等総合研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

慢性肺疾患を中心に極低出生体重児長期予後を改善する NICU 介入の全国調査

担当責任者 難波 文彦 埼玉医科大学総合医療センター小児科講師
研究協力者 田村 正徳 埼玉医科大学総合医療センター小児科教授

研究要旨

新生児慢性肺疾患（chronic lung disease of infancy, CLD）は早産・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。中でも近年、新生児期のみならず、幼・小児期・成人期にも呼吸器合併症が引き続くことが問題となっている。今回我々は、CLD 全国調査、CLD 動物モデルを用いた疾患関連遺伝子のスクリーニングとその機能解析、CLD 重症化に関連する遺伝子多型解析、シベレスタットナトリウム（以下、シルベスタット）を用いた CLD 新規治療・予防法に関する臨床試験、を目的に研究を行った。2015 年 CLD 全国調査の質問票を作成し、アンケート調査研究の準備を行った。新生仔期高濃度酸素暴露 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。Single Nucleotide Polymorphism（SNP）解析のため早産・低出生体重児より血液を採取し genomic DNA を抽出した。CLD 薬物療法に関する全国調査を行い、シベレスタット使用施設が判明した。新生児に対するシベレスタットの有効性について後方視的に検討を行っている。引き続き CLD の現状と病態把握、新規バイオマーカーの探索と治療・予防法の開発のための研究を行っていく。

A. 研究目的

本研究の目的は、新生児慢性肺疾患（chronic lung disease、以下 CLD）の現状と病態把握、新規バイオマーカーの探索と治療・予防法の開発のために、CLD 全国調査、CLD 動物モデルを用いた疾患関連遺伝子のスクリーニングとその機能解析、CLD 重症化に関連する遺伝子多型解析、シベレスタットナトリウムを用いた CLD 新規治療・予防法に関する臨床試験、を行うことである。

B. 研究方法

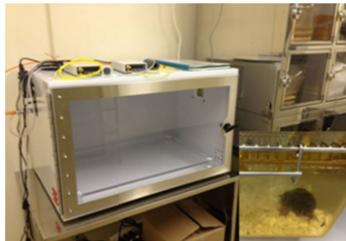
1. CLD 全国調査

5 年毎に行われる CLD 全国調査を行う。2010 年に行われた調査票（体重別入院症例調査、CLD 症例調査、CLD 管理方式調査）を入手する。追加項目を検討し、調査票を更新、埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会に提出する。同倫理委員会承認後、全国の日本周産期・新生児医学会周産期（新生児）専門医基幹および指定施設に送付する。

2. 遺伝子発現解析

マウスは C57BL/6 マウスを用いる。生後 12 時間以内の新生仔マウスに 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する（図 1）。3 日間 21%酸素（以下、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 を抽出する。microarray を用いて網羅的に遺伝子発現解析を行う。コントロールはルームエアで飼育した日齢 7 マウスとする。同定した遺伝子の発現量は qPCR を用いて確認する。



Animal chamber
O₂ controller
CO₂ controller

図 1. 動物チャンパー
動物チャンパー内で新生仔マウスに対して 95% 酸素を 96 時間暴露する。

3. 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 2 mL を採取する。採血は EDTA 入り採血管に行い冷蔵庫保存する。Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いて DNA を抽出し、注目する遺伝子の遺伝子多型を TaqMan® SNP Genotyping Assays を利用して解析する。

4. シベレスタットナトリウム

全国の総合周産期施設における CLD に対する薬剤使用の状況を把握するためにアンケート調査を実施する。シベレスタット使用経験施設 (11 施設) と CLD に対するシベレスタット投与に関する後方視的研究を行う。対象は 2007 年から 2013 年の 7 年間に入院した在胎期間 28 週未満かつ出生体重 1000g 未満の早産・低出生体重児とする。カルテを後方視的にレビューし、新生児に対するシベレスタット投与の効果について非投与群と予後、特に呼吸器系予後を比較検討する。

C. 研究結果

1. CLD 全国調査

2010 年に行われた CLD 全国調査の調査票を高槻病院小児科、南宏尚先生から入手した。体重別入院症例調査、CLD 症例調査、CLD 管理方式調査のうち、CLD 管理方式調査に近年話題となっている、INSURE (intubation-surfactant-extubation)、カフェイン、シベレスタット、HFNC (high-flow nasal cannula)、NAVA (neurally adjusted ventilatory assist) 等の項目を追加した。現在、本調査研究について、埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会に申請中であり、承認後には日本周産期・新生児医学会周産期 (新生児) 専門医基幹および指定施設に質問票を送付する予定である。

2. 遺伝子発現解析

生後 12 時間以内の新生仔マウスに 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 (回復期)。新生仔期の高濃度酸素暴露により、肺胞発達は停止し、数の少ない大きさの大きい肺胞構造を示した (肺胞の単純化)。肺胞の単純化は少なくとも回復期 (日齢 14) まで持続した (図 2、図 3)。

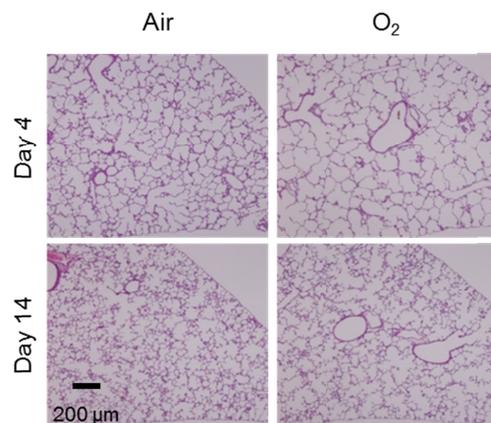


図 2. 肺組織像 (H.E.染色)

新生仔期高濃度酸素暴露により肺胞は単純化し、影響は日齢 14 まで続いた。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

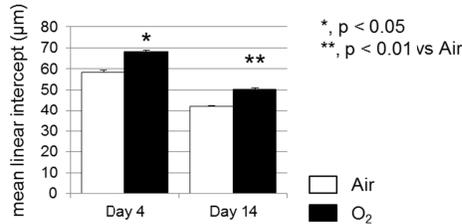


図 3. Mean Linear Intercept (MLI)

MLI (肺胞径の指標) は高濃度酸素暴露群で有意に大きく、この有意差は日齢 14 まで続いた。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

新生仔期 96 時間高濃度酸素暴露後 3 日間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、結果以下の 5 つの遺伝子、Cc dc3、Prnd、Cpa3、Hapln1、Fhl5 を同定した。(図 4、図 5)

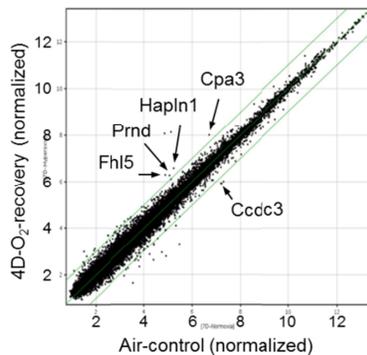


図 4. 遺伝子発現解析 (マウス肺)

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。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

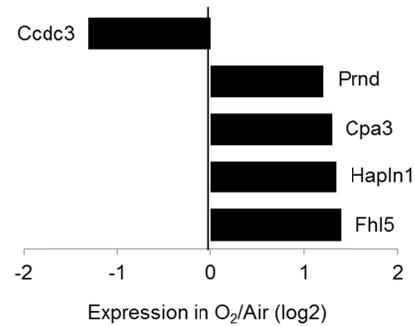


図 5. 候補遺伝子

候補遺伝子の発現量の比 (O₂/Air) (Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

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 6)。

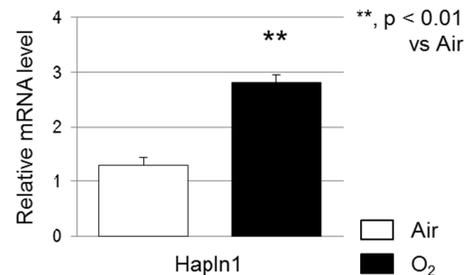


図 6. Hapln1 遺伝子発現量の比較

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。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

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7)。

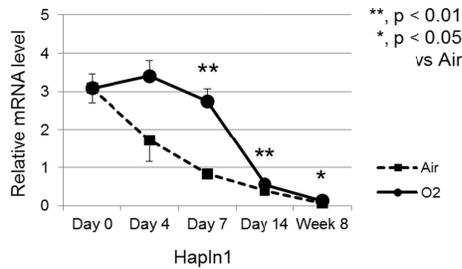


図7. Hapl1 遺伝子発現の時間的推移
コントロール群と比較して、高濃度酸素暴露群では暴露後回復期に Hapl1 遺伝子の発現量が増加し、その増加は成獣期まで続く。(Air、21%酸素; O2、95%酸素)

今後は細胞・組織培養系を用いた in vitro の解析やノックアウトマウスを用いた in vivo の解析により、Hapl1 が CLD の病態にどのように関与しているかどうかについて解析を行っていく予定である。

3. 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、末梢血 2 mL 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、今後の SNP タイピングのため、4°C で保存中である。SNP 解析の候補遺伝子として Hapl1 の遺伝子多型をタイプング予定である。また、新生児慢性肺疾患コンソーシアムを立ち上げ、現在多施設共同研究体制を構築中である。参加予定施設は、当センターの他、秋田大学、大阪大学、大阪府立母子保健総合医療センター、久留米大学、慶応大学、国際医療福祉大学、聖マリアンナ医科大学、筑波大学、東京女子医科大学、獨協医科大学越谷病院、富山大学、北海道大学、横浜市立大学附属市民

総合医療センター、りんくう総合医療センターである。

4. シベレスタットナトリウム

CLD に対する予防薬・治療薬の使用状況について全国の総合周産期施設 96 施設にアンケート調査を行った。回答率は 80% (77/96) だった(図8)。

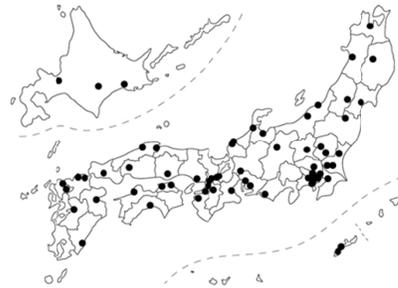


図8. 回答のあった総合周産期施設
回答率は 80% (77/96)。

CLD 予防を目的とした薬剤のうちシベレスタットは 96 施設中 15 施設 (16%) で使用されていた(図9)。

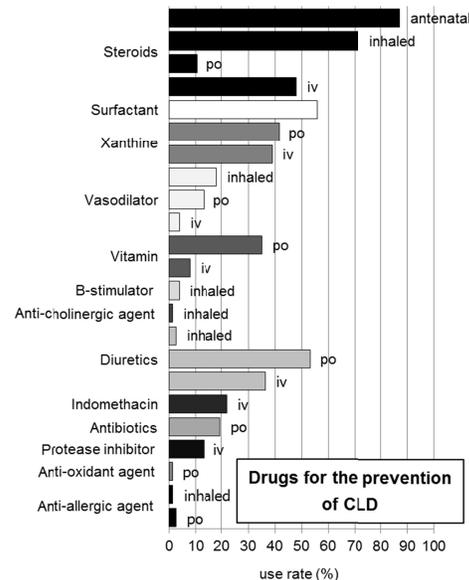


図9. CLD 予防を目的とした薬剤使用率
96 施設中 15 施設でシベレスタットを CLD 予防に使用していた。

15施設中11施設の賛同のもと、「CLDに対するシベレスタット投与の予防・治療効果に関する研究班」を立ち上げた。参加施設は、安城更生病院、大分県立病院、岡山医療センター、北九州市立医療センター、高知医療センター、聖マリアンナ医科大学、名古屋第一赤十字病院、名古屋第二赤十字病院、奈良県立医科大学、広島市民病院、三重中央医療センターである。現在、早産・低出生体重児に対するシベレスタットの有効性について、後方視的カルテレビューによる検討を行っている。将来的には多施設によるランダム化比較試験を行う計画である。

D. 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1000g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。今回われわれは、CLDの現状と病態把握、新規バイオマーカーの探索とその機能解析、薬剤を用いた新規治療法の開発に向けて研究を行った。

まず、CLDの現状把握のため2015年に予定しているCLD全国調査の準備を行った。本調査に関しては2015年春には調査票を送付する予定である。過去の全国調査と比較することにより現在のCLD対策に関する問題点を抽出することができ、その結果を今後のCLD対策とそのための研究材料として

使用できることが期待される。また、新しいCLD対策として期待されているINSURE、HFNC、NAVA等も質問事項に加え、これらの国内での認知度を知るとともに今後の情報提供に役立てることができる。

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った結果Hapl1に注目し、以降の解析を行った。Hapl1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。今後は胎児肺の培養系やHapl1遺伝子欠損マウスを用いた表現型解析により、肺内Hapl1の機能について解析予定である。

さらに、CLDは多因子疾患であり、過去の双胎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、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Hapl1を最初の候補遺伝子としてSNP解析を行っていく予定である。

CLDのその他の病因の一つとして胎内感染/炎症の重要性が近年指摘されている。胎内感染/炎症の病態は絨毛膜羊膜炎であり、それは主に母体好中球浸潤による急性炎症である(Namba F, et al. *Pediatr Res* 2010)。また、好中球がCLDまたはCLD重症化に関与することを示唆する報告も多い。シベレスタットは選択的好中球エラスターゼ阻害剤であり、好中球エラスターゼ阻害による重症化予防がCLDの新規予防・治療法として期待されている。今回われわれは新生児に対するシベレスタット投与の有効性を後方視的に検討するために、シベレスタット使用施設を調査した。現在、カルテから抽出した臨床データを収集・解析中である。同時に小児に対するシベレスタ

ット投与に関する系統的レビューも行っており、将来的には多施設共同ランダム化比較試験を計画中である。

E. 結論

- 2015年 CLD 全国調査の質問票を作成し、アンケート調査研究の準備を行った。
- 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。胎児肺組織培養や遺伝子欠損マウス等を用いた機能解析を行う。
- SNP 解析のため患者血液より genomic DNA を収集中である。Hapln1 の SNP を解析予定である。
- シベスタット使用施設を調査した。新生児に対するシベスタットの有効性について後方視的に検討中であり、将来的には多施設ランダム化比較試験を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- **Namba F**, Go H, Murphy JA, et al. Expression level and subcellular localization of heme oxygenase-1 modulates its cytoprotective properties in response to lung injury: a mouse model. PLoS One 2014; 9: e90936.
- Itakura R, **Namba F**, Arakawa A, et al. EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in a ten-year-old girl accompanied by posterior reversible encephalopathy syndrome and disseminated herpes simplex virus infection: A case report. J Saitama Medical University 2015; in press.
- Ogawa R, Mori R, **Namba F** et al. Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia in Japan: questionnaire survey. Pediatr Int 2015; in press.
- **難波文彦** . 病態—出生後因子とその対応 酸素障害 . 最新版 慢性肺疾患、

周産期医学、2014; 44 (8): 1053-1057 . 東京医学社 .

- モハメド・ハメド・フセイン、**難波文彦**、加藤稲子ら . 呼吸管理の実際 HHHFNC . 最新版 新生児呼吸管理、周産期医学、2014; 44 (12): 1571-1576 . 東京医学社 .
 - **難波文彦** . 新生児慢性肺疾患 . 今日の治療指針、2015; 1: 1272 . 医学書院 .
- ### 2. 学会発表
- Ogawa R, Mori R, Sako M, Kageyama M, Tamura M, **Namba F**. Drug therapies for bronchopulmonary dysplasia in Japan: A questionnaire survey. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, 2014.5: Vancouver, Canada, poster presentation.
 - 小川 亮、森 臨太郎、佐古まゆみ、影山 操、田村 正徳、**難波文彦** . 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. 7: 浦安、一般講演
 - **難波文彦**、小川亮、伊藤誠人、新井幸男、郷勇人、加藤稲子、田村正徳 . 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. 11: 松山、一般講演

G. 知的財産権の出願・登録状況

- なし