

氏 名 ・ (本籍)	伊藤 誠人 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	医博甲第 926 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	医学系研究科医学専攻
学 位 論 文 題 名	Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes (転写因子 Bach1 の遺伝子欠損は高濃度酸素暴露新生仔マウス肺において 炎症性遺伝子の発現を一過性に増加させ,肺障害からの回復を増強させる)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 寺田 幸弘 (副査) 教授 今井 由美子                      教授 南谷 佳宏

## 学位論文内容要旨

Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes

(転写因子 Bach1 の遺伝子欠損は高濃度酸素暴露新生仔マウス肺において炎症性遺伝子の発現を一過性に増加させ、肺障害からの回復を増強させる)

申請者氏名 伊藤 誠人

### 研究目的

新生児慢性肺疾患 (CLD) は早産児の生命予後に影響を及ぼすだけでなく、小児期・成人期の呼吸機能など長期予後にも関連することが判明している。CLD の要因としては、性差、呼吸器感染症、人工呼吸器による圧損傷、サーファクタント欠乏、低栄養など複数の要素があげられる。そして早産児の生命を維持するための酸素投与においても、酸素毒性に関連する高酸素性肺障害を来し、CLD に大きな影響を及ぼす。BTB and CNC homology 1 (Bach1) は heme oxygenase (HO) -1 遺伝子の抑制性転写因子である。Bach1 ノックアウトマウスは成獣において心筋虚血／再灌流傷害や高酸素性肺傷害に対し防御作用を示すことが報告されている。しかし、新生仔期高濃度酸素性肺傷害における Bach1 の作用については未だ解明されていない。今回の研究では新生仔期における高濃度酸素暴露に対し Bach1 が寄与する影響を検討した。

### 研究方法

Bach1 ノックアウト (KO) と野生型 (WT) 新生仔マウスに対し高濃度 (95%) 酸素暴露を 96 時間行い、以降はルームエア下で飼育した。酸素暴露中は親を一日おきに交換した。それらを日齢 4 および 14 で肺を摘出した。それらの検体において、(1) HE 染色、エラスチン染色、TUNEL 染色を用いての組織学的検討、(2) リアルタイム PCR 法を用いての Bach1, HO-1, IL-6、monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 遺伝子発現レベルの定量、(3) Cytometric Bead Array 法 (CBA) を用いての炎症性サイトカイン (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10, IL-6) の 蛋白発現レベルの定量を行った。いずれも出生時よりルームエア下で飼育したマウスをコントロールとした。

### 研究成績

WT 群では、新生仔期の高濃度酸素暴露による肺胞発達の遅延を日齢 4 において認めた。この肺胞発達遅延は日齢 14 まで持続していた。一方で、KO 群では日齢 4 においては高濃度酸素暴露による肺胞発達遅延を認めるものの、日齢 14 では肺胞発達の改善が見られた。TUNEL 染色では WT, KO 両群とも高濃度酸素暴露によるアポトーシスの一時的な増加を認めたが、各群でのアポトーシスの有意差は認めなかった。また、高濃度酸素暴露直後の日齢 4 において、WT 群に比して KO 群では肺内 HO-1、IL-6、MCP-1 の mRNA 発現量が有意に上昇していた。この有意な上昇は一時的であり、日齢 14 の段階においては持続していなかった。日齢 4 における CBA においても KO 群は WT 群に比して高濃度酸素暴露により肺内 IL-6、MCP-1 の蛋白発現が有意に上昇していた。IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 に関しては各群において有意差は認めなかった。この IL-6、MCP-1 の蛋白発現上昇も一時的なものであり、酸素暴露終了後 24 時間の段階で発現量の有意差は認めなくなった。

### 結論

今回の検討において我々は新生仔 Bach1 KO マウスは高濃度酸素性肺傷害に対する防御機能を有することを示した。これらは Bach1 KO マウスで強く誘導される HO-1、もしくは IL-6 や MCP-1 など他の炎症性サイトカインの一過性発現増加による抗酸化/抗炎症性作用により成し遂げられたと考えられた。今後これらの変化による長期的な影響と詳細な機序を解明するため、さらなる研究を行っていく予定である。

## 学位（博士-甲）論文審査結果の要旨

主 査：寺田 幸弘

申請者：伊藤 誠人

論文題名：Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes（転写因子 Bach1 の遺伝子欠損は高濃度酸素暴露新生仔マウス肺において炎症性遺伝子の発現を一過性に増加させ、肺障害からの回復を増強させる）

## 要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、heme oxygenase (HO) -1 遺伝子の抑制性転写因子として知られる BTB and CNC homology 1 (Bach1) のノックアウト (KO) 新生仔期マウスに対し、気管支肺異形成 (bronchopulmonary dysplasia ; BPD) 動物モデルを作成するために高濃度酸素暴露を行い、日齢 4、14 における肺の形態学的評価を H-E 染色、エラスチン染色、TUNEL 染色を行って検討したものである。また、HO-1 やその他の各種炎症性サイトカインの mRNA、蛋白発現に関しても、リアルタイム PCR 法や Cytometric Bead Array 法を用いて検討した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

## 1) 斬新さ

Bach1 KO マウスは成獣において HO-1 の発現を増加させることなどにより、心筋虚血／再灌流傷害や高酸素性肺傷害に対し防御作用を示すことが既に報告されていた。しかし、新生仔期の高濃度酸素性肺傷害における Bach1 の作用については未だ解明されていなかった。本研究の斬新性は、新生仔 Bach1 KO マウスは高濃度酸素暴露からの回復期において、肺胞の拡大・単純化で示される高濃度酸素性肺傷害からの回復を認めたことを各種組織学的検討により初めて示し、その過程において HO-1、Interleukin-6 (IL-6)、Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) などのサイトカインの発現が一過性に増加していることを示したことにある。

## 2) 重要性

BPD は高濃度酸素暴露などの様々な要因により肺が直接的な損傷を受けることに加え、肺組織の成熟が抑制されることが病因として考えられている。本検討では Bach1 KO マウスでは一度傷害された肺成熟の過程が再開されることを示したことは、Bach1 や HO-1 などの新生児期における機能を明らかにするためにも重要であると考えられる。また、臨床上も BPD に対する新規治療法を考える礎となりうる。

## 3) 実験方法の正確性

BPD 動物モデルの作成は既に著者らのグループで報告した方法を用いている。また、高濃度酸素暴露による肺傷害の程度に関しては組織学的検討を行い、各種炎症性サイトカインの mRNA や蛋白発現に関してもリアルタイム PCR 法や Cytometric Bead Array 法を用いて検討を行っている。いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価法で、正確性があると考えられている。

## 4) 表現の方法

Bach1 KO 新生仔期マウスが高濃度酸素性肺傷害に対し防御機能を有することを明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。