

主論文の要旨

**Vitamin D improves pulmonary function in a rat
model for congenital diaphragmatic hernia**

（ビタミンDはラット先天性横隔膜ヘルニアモデルにおいて
肺機能を改善させる）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野
（指導：梶山 広明 教授）
伊藤 由美子

【緒言】

先天性横隔膜ヘルニア(以下 CDH)は横隔膜に生じた欠損孔により腹腔内臓器が肺を圧迫し、肺成長が制限されて新生児の肺低形成をきたす。重度の肺低形成では肺高血圧症を起こし新生児予後に影響を与える。近年の肺高血圧治療にも関わらず、重症肺高血圧に関連する CDH 死亡率は未だ高く、出生前治療が研究されている。現在、胎児肺の成長を促す治療として胎児鏡下バルーン気管閉塞術(FETO)が重症および中等度肺高血圧の患者で施行され、国際的な無作為試験が実施されている。FETO により重症 CDH 患者の生存率が改善したとの報告があるが、早産や前期破水などのリスクは高いとされている。

ビタミン D はカルシウムやリンの恒常性を維持し、活性型の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は免疫、心血管、神経機構などに影響すると考えられているが、近年ビタミン D 欠乏と肺高血圧の関連性を示す論文が散見されている。ビタミン D サプリメントは妊婦において妊娠高血圧腎症、妊娠糖尿病、低出生体重を減少させるとの報告があり、妊娠中の投与は安全であるとされている。また、母体血清ビタミン D 濃度は胎児 CDH 症例で健常対照者に比べて低値だったとの報告がある。これらの研究に基づき、我々はビタミン D が CDH に対して非侵襲的な出生前治療として適応されるかとの仮説を立て、ラット CDH モデルを用いてビタミン D の出生前投与につき調査した。

【対象および方法】

当院の臨床 CDH 症例でも $25(\text{OH})\text{D}$ 低値が認められるか確認するため、まず臨床症例の比較を検討し、次いで動物実験を施行した。

研究①(臨床症例)：2011年8月から2017年4月の間に当院で出生した CDH 群 44 例および対照群 86 例の分娩時臍帯静脈血を採取して、血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 濃度を ELISA 法で測定し、CDH 群と対照群の比較および CDH 群内での予後との関連を検討した。

研究②(動物実験)：ラット CDH モデルを用いて検討を行なった。妊娠 SD ラットを Control, CDH, CDH+VD の 3 群に分け、CDH 群と CDH+VD 群は妊娠 9 日目にニトロフェン 100mg を胃管より投与した。CDH+VD 群はニトロフェン投与後から、活性型ビタミン D であるカルシトリオール $0.03\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を皮下投与した。投与方法は浸透圧ポンプを用い、静脈麻酔下に皮下へ埋め込みを行なった。妊娠 21 日目に帝王切開で胎仔を娩出し、出生 5 分で全血を採取した。その後 CDH の有無を確認し、CDH を認めた症例のみ血液ガス分析と肺組織採取を行なった。肺組織は肺胞構造および肺動脈の組織学的検討を行なった。次いでビタミン D の作用機序を検討するため、肺高血圧との関連に着目し、胎仔左肺動脈を採取してマイクロアレイ解析の結果よりエンリッチメント解析を行なった。

【結果】

研究①：患者背景は、対照群に比べて CDH 群で 1 分値および 5 分値の Apgar score が有意に低値であった以外は、特に差を認めなかった(表 1)。臍帯静脈血中 25(OH)D 濃度は対照群に比べて CDH 群で有意な低下を認めた(中央値 27.1ng/ml vs. 15.6ng/ml, 図 1A)。また、CDH 群内で生存退院群に比べて、死亡退院群で臍帯静脈血中 25(OH)D 濃度の有意な低下を認めた(中央値 17.1ng/ml vs. 9.4ng/ml, 図 1B)。次に CDH 群の 25(OH)D 濃度中央値に基づき、CDH 群を 15ng/ml 以上(Group1)および未満(Group2)に分けて全生存率を検討した。患者背景は両群間で特に差を認めず(表 2)、5 年生存率は Group2 で有意に低値だった(100% vs. 59.2%, 図 1C)。

研究②：CDH 発症率は CDH 群と CDH+VD 群で特に差を認めず(35.7% vs. 34.8%)、胎仔肺重量体重比も CDH 群に比べて CDH+VD 群で有意な変化はなかった(図 2A)。しかし、血液ガス分析では pH, pCO₂, pO₂ いずれも CDH 群に比べて CDH+VD 群で有意に改善していた(図 2B-D)。肺組織学的評価では、Control 群に比べて CDH 群で肺胞構造が縮小していたのが CDH+VD 群で改善していた(図 3A)。ガス交換面積の指標である Mean linear intercept (MLI) では、Control 群に比べて CDH 群で有意に低値であったが、CDH+VD 群は有意に改善していた(図 3C)。肺動脈血管壁肥厚の検討では、Control 群に比べて CDH 群で有意に壁肥厚していたのが、CDH+VD 群で有意に改善していた(図 3B, D)。胎仔左肺動脈マイクロアレイでは、Control 群に比べて CDH 群で 2 倍以上発現上昇が見られた遺伝子が 655 あり、CDH 群に比べて CDH+VD 群で 2 倍以上発現低下が見られた遺伝子が 532 あった。Gene ontology 解析では、両者共通の 11 パスウェイが判明し、上位では補体・凝固系カスケード、急性炎症反応などに関与する遺伝子が増加していた(図 4A-D)。最も変動が大きかった遺伝子の *HAMP* を含め、肺機能重症度を示すマーカーの *FETUB*、ビタミン D 結合蛋白の *GC*、肺高血圧で上昇する、カルシウム結合蛋白の *S100A8* が上位 80 以内であった。これらについて左肺動脈の RT-PCR を施行したところ、Control 群に比べて CDH 群で上昇し CDH+VD 群で低下する傾向を示したが、有意差は見られなかった。

【考察】

今回の研究で、出生前ビタミン D 投与は CDH 発症率を変化させないものの、血液ガス値および組織学的評価における肺胞化・肺血管リモデリングの改善が見られ、CDH ラットの肺機能が改善した。我々の知る範囲内では、CDH 胎仔肺動脈を単離して特異的遺伝子発現につき正常群と比較を行なった最初の報告である。

ヒトの CDH 症例において、臍帯血中 25(OH)D 濃度は対照群に比べ CDH 群で低値であること、そして臍帯血中 25(OH)D 濃度の低下が CDH 死亡率と関連していることが明らかとなった。今回の研究では母体の血清 25(OH)D 濃度測定は実施していないが、母体血と臍帯静脈血との関連性はすでに報告されていることから、CDH 群では対照群に比べて母体血中 25(OH)D 値も低いと予測される。

ラット CDH モデルではビタミン D 投与により CDH ラットの肺胞化が改善した。過

去の研究では、ビタミン D が胎児の肺成熟に関わっている、ビタミン D 欠乏が早産児の呼吸窮迫症候群の増加と関連しているとの報告がある。また、今回の研究ではビタミン D 投与により肺血管リモデリングの予防効果があったと考えられる。肺高血圧は出生後から現れるが肺血管の変化は胎性初期から出現するため、肺血管リモデリングの予防は CDH 患者における出生後の肺高血圧重症化の減少につながる可能性が高い。

さらに、胎仔左肺動脈マイクロアレイでは Gene ontology 解析にて CDH 群で補体・凝固系カスケードなどに関与する遺伝子が増加していた。これは、以前に当研究室から発表した、ヒト CDH 症例の分娩時臍帯静脈血マイクロアレイにおけるエンリッチメント解析で得られた結果と同様であった (Tachi ら、2020) ことをふまえると、補体・凝固系カスケードは CDH における肺高血圧治療の標的となりうるかもしれない。HAMP は鉄集積により、肺血管リモデリングの原因となる肺動脈平滑筋細胞の増殖に関わると報告されている。また、ビタミン D は HAMP 発現を抑制するとの報告もあり、出生前ビタミン D の投与は HAMP 発現調節により肺血管リモデリングに影響を与える可能性がある。

今回の実験の限界としては、ビタミン D 欠乏モデルを使用できなかったこと、ビタミン D 投与時期が胎性初期と他の研究デザインより早いこと、そして分子学的メカニズムを十分に解明できなかったことがあげられ、引き続き検討を行う必要があると考えられる。

【結語】

今回の研究で我々は初めて、ラット CDH モデルにおいて出生前ビタミン D 投与を用いた研究を報告し、胎仔の肺機能と肺構造の改善および肺血管リモデリングの改善を認めた。また、ヒトの CDH 症例においても臍帯血中 25(OH)D 低値が重症度に関連することを認めた。胎児診断で CDH が確定した妊婦へのビタミン D サプリメントを投与が出生後の肺高血圧予防に有効かもしれないが、これらに関わる分子遺伝学的機構の同定が今後の研究に必要である。