

令和 4 年 10 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19683

研究課題名（和文）幹細胞を用いた新生児慢性肺疾患に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for neonatal chronic lung disease by stem cells

研究代表者

齊藤 明子 (Saito, Akiko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50615276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：慢性肺疾患（CLD）は、新生児医療の重大かつ頻度の高い合併症である。本研究の目的は、受傷組織に生着し組織修復が見込めるMuse細胞が、CLDにおいても有効であることを示し、新規治療につながるための基礎研究を行うことである。  
本研究では、Muse細胞投与において、肺に生着した細胞は肺細胞へ分化し、肺組織、肺機能の改善をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肺疾患（CLD）は、新生児医療の重大かつ頻度の高い合併症であり、有効な治療法のない現状では、新規治療法の開発は急務である。本研究では、Muse細胞投与において、肺に生着した細胞は肺細胞へ分化し、肺組織、肺機能の改善をもたらすことを明らかにした。  
本研究成果は、これまで有効な治療法のないCLDに対し、新規治療につながる画期的なものであり、今後の周産期医療の発展に大きく貢献するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：Neonatal chronic lung disease (CLD) is still an important complication in very low birth weight infants (VLBW). Stem cell therapy using various cell sources has been recently identified as a novel therapy for CLD. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a novel type of endogenous stem cells that are able to self-renew, display pluripotency. The purpose of this study was to evaluate the treatment effect of Muse cells on CLD using a rat model. In this study, we have shown that (1) intravenously injected Muse cells migrated into injured lung in CLD model rats, and the number of them was higher than that of non-Muse Mesenchymal Stem Cells (MSCs). (2) Muse cells injected intravenously ameliorated impaired alveolar growth induced by hyperoxia in the rat model, and the beneficial effect was much more evident than that done by non-Muse MSCs. (3) Muse cells, but not non-Muse cells, ameliorated impaired pulmonary hypertension in the CLD model.

研究分野：新生児学

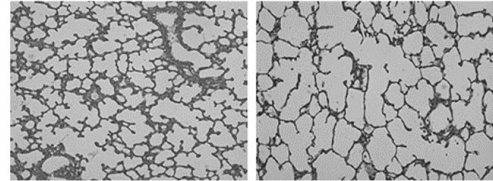
キーワード：新生児慢性肺疾患 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性肺疾患 (CLD) は、新生児医療の重大かつ頻度の高い合併症である。新生児医療の進歩に伴い、この 20 年間で先進諸国における出生体重 1500g 未満の児の生存率は 70% 未満から 80% 以上へ上昇しているが、CLD の罹患率は在胎 28 週未満の児で 53.2%、出生体重 1000g 未満の児で 40% と依然として高率である。CLD 罹患児は在宅酸素療法や、幼児期における呼吸器感染症入院の可能性が高い。また、青年期にまで及ぶ呼吸機能の低下も大きな問題である。さらに CLD は精神運動発達遅滞の危険因子であり、学童期の低知能指数や注意欠陥多動性障害の増加も指摘されている。呼吸器管理方法の改善などで一定の治療効果は得られるが、十分な治療法はないため、新生児医療において CLD の新規治療法の開発は急務の課題である。

(2) 研究代表者らの研究グループでは、CLD に対する新規治療法を開発するために CLD モデル動物を作製してきた。生後から高濃度酸素負荷を行うことにより、高濃度酸素性肺傷害によるヒト CLD に類似したモデルができることを確認している。また、胎児期の羊水腔内にグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) を注入すると、肺胞の形成が妨げられ、子宮内感染を伴うヒト CLD に類似したモデルができることを確認している。



室内大気中飼育(対照) 高濃度酸素負荷(CLDモデル)

(3) 幹細胞を用いた再生医療/細胞療法は、様々な臓器や疾患に対し研究され臨床応用されつつある。海外においては、間葉系幹細胞 (MSC) を用いた CLD 治療の基礎研究が近年始められており、臨床試験も開始されている。しかしながら、研究代表者らの骨髄由来 MSC を用いた予備実験では、傷害肺への投与細胞の生着は少なく、十分な治療効果も得られなかった。一般的に MSC による幹細胞療法の治療効果は、直接的な作用ではなく、幹細胞から分泌される因子による paracrine effect によると言われている。そのため、多くの細胞が受傷組織に生着し、直接的に組織修復が可能な幹細胞が理想的な幹細胞源である。

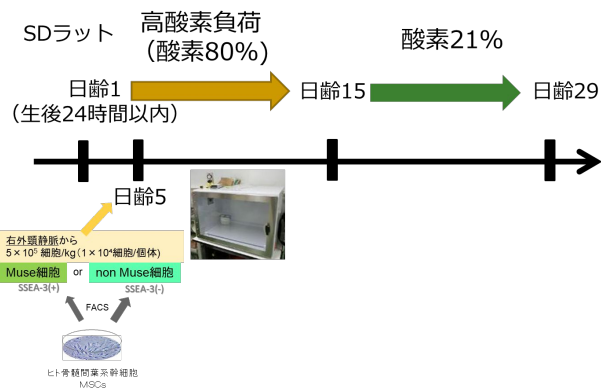
(4) Multilineage-differentiating stress enduring cells (Muse 細胞) は、間葉系幹細胞 (MSC) の数%を構成し、多能性を有して組織を修復することが可能な細胞である。人工的な遺伝子導入をすることなく、ヒト生体から直接得られる多能性幹細胞であるため腫瘍化の危険性が非常に低い。すでに臨床で施行されている骨髄移植や間葉系幹細胞移植の一部の細胞に相当し、安全性の実績もある。間葉系幹細胞の中で Muse 細胞のみが組織に生着し、直接的に分化転換・組織修復に寄与できるとされる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、受傷組織に生着し組織修復が見込める Muse 細胞が、CLD においても有効であることを示し、新規治療につなげるための基礎研究を行うことである。

## 3. 研究の方法

CLD モデルは新生仔ラットを使用し、生直後から日齢 15 まで 80% 酸素負荷を行うことで作製した。日齢 5 に、Muse 細胞または non Muse 細胞 (各  $1 \times 10^4$  cells/個体) または vehicle を右外頸静脈から投与し、日齢 15、29 に治療効果の評価を行った。Muse 細胞は、ヒト骨髄間葉系幹細胞を培養増殖させ、フローサイトメーターにて SSEA-3 陽性を分離し調製した。また、SSEA-3 陰性の間葉系幹細胞を nonMuse 細胞とした。



### (1) 肺組織評価

生理食塩水で心臓灌流した後、気管カテーテルを介してパラホルムアルデヒドで肺を膨張させた (20cmH<sub>2</sub>O、20 分間)。4 で 24 時間固定した後、パラフィン包埋し 5 $\mu$ m 切片とした。パラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン (H&E) で染色し、肺における肺組織の割合であ

る組織体積密度 ( tissue volume density ) を測定した。

## ( 2 ) 肺高血圧変化評価

### 右心室肥大

右心室と、左心室と心室中隔との乾燥重量比 RV/(LV + IVS)を測定し、右心室肥大の指標とした。

### 右室圧観血的測定

圧センサーに接続したカテーテルを外頸静脈から右室内に進め、観血的に右室圧を測定した。

### 肺血管リモデリング

パラフィン肺切片を  $\alpha$ -SMA (  $\alpha$ -smooth muscle actin ) 抗体で免疫組織化学染色し、肺血管リモデリングの指標である血管内壁厚 ( medial wall thickness ) を測定した。 ( medial wall thickness (%) = (血管外径 - 血管内径)/血管外径  $\times$  100 )

## ( 3 ) 気管支肺胞洗浄液 ( Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF )

気管支肺胞洗浄液を Türk 溶液で染色し、血球計算盤を用いて総細胞数を測定した。次いで Cytospin4<sup>®</sup> を使用して塗抹標本作製し、May-Giemsa 染色後に白血球分画を測定した。

## ( 4 ) 肺への生着、分化

上記と同様のパラホルムアルデヒドで固定した後、スクロース液に浸漬し、Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT 液に包埋し、10  $\mu$ m の凍結切片を作製した。投与した細胞は GFP でラベルしたものをを用いたため、抗 GFP 抗体で免疫組織学的染色にて生着を確認した。また、肺細胞への分化に関しては、GFP ラベルした Muse 細胞投与後に、 $\alpha$ 型肺胞上皮細胞のマーカーであるポドプラニン、 $\beta$ 型肺胞上皮細胞のマーカーである PE10 を用いて評価した。

さらに生着に関しては、ヒトゲノムに特異的な Alu 配列の定量的 PCR でヒト細胞を検出することにより評価した。

## ( 5 ) 機能評価

日齢 15 に Whole Body Plethysmograph を用いて自発呼吸下で呼吸数、1 回換気量、分時換気量を評価した。また、日齢 30 にフレキシベントを用いて気道抵抗、静的コンプライアンスを測定した。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) 肺組織評価

#### 肺組織体積密度の測定

日齢 15 において、Tissue Volume Density ( 肺組織体積密度 ) は、sham 群  $40.77 \pm 0.45\%$ 、Muse 投与群  $36.82 \pm 1.56\%$ 、non-Muse 投与群  $32.96 \pm 1.17\%$ 、vehicle 群  $34.11 \pm 1.46\%$  と改善を認めた。

日齢 29 においても TVI は CLD で低下し、Muse 細胞投与で改善した。nonMuse 細胞投与では効果が不十分であった。

Muse 細胞投与による肺胞発達障害抑制が示された。

### ( 2 ) 肺高血圧変化評価

#### 右室と心室中隔+左室の乾燥重量比 RV/(LV+IVS) 測定

日齢 15 において、sham 群  $0.17 \pm 0.01$ 、Muse 投与群  $0.21 \pm 0.01$ 、non-Muse 投与群  $0.25 \pm 0.02$ 、vehicle 群  $0.24 \pm 0.01$  と Muse 細胞投与による右室肥大の改善を認めた。

日齢 29 においても、CLD で上昇するが、Muse 細胞投与で軽減した。nonMuse 細胞では効果が無かった。

#### 肺動脈壁肥厚 ( medial wall thickness ) 測定

日齢 15 において、sham 群  $19.56 \pm 0.38\%$ 、Muse 投与群  $23.51 \pm 0.99\%$ 、non-Muse 投与群  $25.71 \pm 0.95\%$ 、vehicle 群  $27.41 \pm 1.15\%$  と Muse 細胞投与による肺動脈の壁肥厚改善効果を認めた。

日齢 29 においても、CLD で認めた肺動脈血管壁の肥厚は Muse 細胞投与で軽減した。

以上より Muse 細胞のみ肺高血圧への治療効果が示され、nonMuse 細胞では効果が乏しかった。

た。

### 観血的血圧測定

観血的血圧測定の評価では、CLD モデルで有意に右室圧上昇を認め、Muse 細胞投与で有意に軽快した。また、nonMuse 細胞では効果が不十分であった。

#### ( 3 ) 肺胞洗浄液の評価

BALF では、CLD で白血球数が増加したが、Muse 細胞投与により軽減した。分画においては、マクロファージ、リンパ球が増加し、nonMuse 細胞でも白血球数は減少していたが、有意ではなかった。Muse 細胞による抗炎症作用が示された。

#### ( 4 ) 肺への生着、分化

##### 生着

日齢 15、日齢 29 に Muse 細胞の肺組織への生着を確認した。nonMuse 細胞でも肺内に検出されたが、少数であった。PCR においても同様な結果を得た。

##### 分化

GFP とポドプラニン、GFP と PE10 の 2 重陽性を示す細胞が見られ、肺細胞への分化を確認した。

#### ( 5 ) 機能評価

日齢 15 に Whole Body Plethysmograph を用いて評価した 1 回換気量、分時換気量は、CLD モデルで有意に低下したが、Muse 細胞投与群では正常群と有意差を認めなかった。また、nonMuse 細胞投与ではその改善効果は無かった。日齢 28 ~ 30 のフレキシベントを用いた評価では、気道抵抗が CLD モデルで有意に上昇し、Muse 投与群では有意な改善を示した。nonMuse 投与群でも改善傾向を示した。コンプライアンスは群間で有意な差を認めなかった。

以上の結果より、Muse 細胞投与において、肺に生着した細胞は肺細胞へ分化し、肺組織、肺機能の改善をもたらすことが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

- (1) 齊藤明子 . 抗 VEGF 抗体を投与した早産児の発達 眼科臨床紀要 2019 12 巻 1 号 ( 総会特別号 ) p24-28. ( 査読有 )
- (2) Hyodo R, Sato Y, Ito M, Sugiyama Y, Ogawa C, Kawai H, Nakane T, Saito A, Hirakawa A, Kidokoro H, Natsume J, Hayakawa M. Magnetic resonance spectroscopy in preterm infants: association with neurodevelopmental outcomes. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2018 May;103(3):F238-F244. doi: 10.1136/archdischild-2016-311403. Epub 2017 Jul 19. ( 査読有 )
- (3) Kato K, Kato T, Hayano S, Fukasawa Y, Numaguchi A, Hattori T, Saito A, Sato Y, Hayakawa M. Successful Infant Pneumonectomy with Unilateral Pulmonary Artery Occlusion Test. Int Heart J. 2018 Jan 27;59(1):237-239. doi: 10.1536/ihj.16-606. Epub 2018 Jan 15. ( 査読有 )
- (4) Kitase Y, Hayakawa M, Kondo T, Saito A, Tachibana T, Oshiro M, Ieda K, Kato E, Kato Y, Hattori T, Hayashi S, Ito M, Hyodo R, Muramatsu Y, Sato Y. Factors related to home health-care transition in trisomy 13. Am J Med Genet A. 2017 Oct;173(10):2635-2640. doi: 10.1002/ajmg.a.38371. Epub 2017 Aug 29. ( 査読有 )
- (5) Mikrogeorgiou A, Sato Y, Kondo T, Hattori T, Sugiyama Y, Ito M, Saito A, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Hayakawa M. Dedifferentiated Fat Cells as a Novel Source for Cell Therapy to Target Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Dev Neurosci. 2017;39(1-4):273-286. doi: 10.1159/000455836. Epub 2017 Mar 9. ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

(1) 齊藤明子

シンポジウム1 ROPの新しい問題点 「抗 VEGF 抗体を投与した早産児の発達について」 2018年3月2日 第43回日本小児眼科学会総会(愛知県名古屋市)

(2) 齊藤明子

企業企画セッション 新生児の痛みに鈍感な医師を何とかしたい「当院 NICU における痛みケアの導入と、今後の課題」 2018年2月15日 第20回新生児呼吸管理モニタリングフォーラム(長野県大町市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:佐藤 義朗

ローマ字氏名: Sato Yoshiaki

研究協力者氏名:鈴木 俊彦

ローマ字氏名: Suzuki Toshihiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。