

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16298

研究課題名（和文）新生児慢性肺疾患に対する胎児付属物由来Muse細胞を用いた新治療の開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment using fetal adjunct-derived Muse cells for neonatal chronic lung disease

研究代表者

山名 啓司 (Keiji, Yamana)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80792936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：新生児慢性肺疾患（CLD）は、超低出生体重児と高率に発症する長期予後不良の難治性疾患である。間葉系幹細胞（MSC）は、障害組織への遊走、抗炎症、抗酸化等の包括的作用を示すことから、CLDに対する有効な治療として期待されている。我々は、MSCの細胞集団全体の約1%存在する、Multilineagedifferentiating Stress Enduring Cell（Muse細胞）のより幹細胞性の高さ、生着能の高さに着目し、臍帯からMuse細胞を単離・同定し、CLDモデルラットに対する治療効果を比較検討した。CLDモデルラットを確立し、臍帯由来Muse細胞の投与を行い、効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児慢性肺疾患（CLD）は、超低出生体重児と高率に発症する長期予後不良の難治性疾患である。間葉系幹細胞（MSC）は、障害組織への遊走、抗炎症、抗酸化等の包括的作用を示すことから、CLDに対する有効な治療として期待されている。我々は、MSCの細胞集団全体の約1%存在する、Multilineagedifferentiating Stress Enduring Cell（Muse細胞）のより幹細胞性の高さ、生着能の高さに着目し、臍帯からMuse細胞を単離・同定し、CLDモデルラットに対する治療効果を比較検討した。CLDモデルラットを確立し、臍帯由来Muse細胞の投与を行い、効果を評価した。

研究成果の概要（英文）：Chronic lung disease is a refractory disease with a poor prognosis that occurs in preterm infants. Mesenchymal stem cells are expected to be an effective treatment for CLD because they exhibit comprehensive actions such as migration to damaged tissues, anti-inflammatory and antioxidant. We focused on the Multilineage differentiating Stress Enduring Cell, which is present in about 1% of the total MSC cell population. Muse cells were isolated and identified from the umbilical cord, and the therapeutic effects on CLD model rats were compared and examined. We established CLD model rats, administered umbilical cord-derived Muse cells, and evaluated the effects.

研究分野：新生児

キーワード：Muse細胞 間葉系幹細胞 プレオマイシン誘発性肺障害モデル

1. 研究開始当初の背景

日本における超低出生体重児の生後 28 日の生存率は 98.9%と極めて高い。しかし新生児慢性肺疾患 (Chronic Lung Disease、以下 CLD) は、生後 28 日以降の酸素依存性により診断され、超低出生体重児の 61.2%と高率に発症する (厚生労働省研究班全国調査 2010)。CLD は低酸素血症により脳性麻痺など神経学的発達に影響し、長期予後不良とされる難治性疾患である。CLD は早産児の未熟な肺に子宮内感染・炎症、生後の長期人工呼吸器管理による圧損傷・酸素毒性、肺の発達因子の欠乏など多くの因子が加わって発症する疾患である。CLD に対する治療は従来、抗炎症作用のステロイド治療、早期抜管による物理的障害の軽減など発症因子への単独の治療が主流であり、十分な効果が得られていない。現在、CLD に対する抜本的治療の開発は、超低出生体重児の生存率が向上した日本の新生児医療において最重要課題といえる。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell、以下 MSC) は、障害組織への遊走して抗炎症、抗酸化等の包括的作用を示すことから、CLD に対する有効な治療として期待されている。また、2010 年に東北大学の出澤らは、heterogeneous な細胞集団である MSC から、ヒト ES 細胞マーカー SSEA-3 と間葉系マーカー CD105 の二重陽性細胞として Multilineage-differentiating Stress Enduring Cell (以下、Muse 細胞) を単離・同定している (Dezawa M, et al. PNAS. 2010.)。骨髄から単離した Muse 細胞は、骨髄単核球の約 0.03%を占め、MSC の持つ抗炎症、抗酸化等の包括的作用の大部分を担うと考えられる。脳梗塞モデルラットに投与した Muse 細胞は、傷害部位に遊走、生着して機能的な組織を再生し、MSC よりも高い治療効果を示した (Dezawa M, et al. Stem Cells. 2016)。これまでに我々は、臍帯から MSC を単離し、肺障害モデルラットに対する治療効果を確認すると共に、出澤らと共同研究で臍帯由来 MSC から Muse 細胞を単離することに成功している。

Muse 細胞は骨髄由来 MSC の細胞集団全体の約 1%ほど存在するが、臍帯由来 MSC はより多くの Muse 細胞を含んでいる。実際、フローサイトメトリーを用いて臍帯由来 MSC から Muse 細胞を SSEA-3+/CD105+ 細胞として分離可能である。これまでに我々は、出澤らと共同で臍帯から単離した Muse 細胞が、骨髄から単離したものと同等の形質を示すことを確認している。

2. 研究の目的

本研究では、臍帯から単離した MSC と Muse 細胞の CLD モデルラットに対する治療効果を比較検討し、CLD に対する有効な治療法の開発を目的とする。

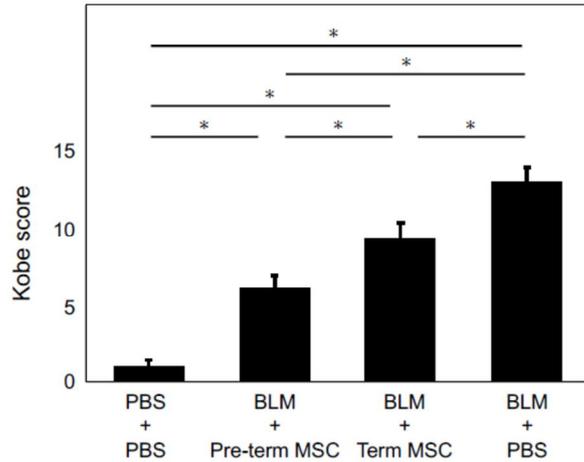
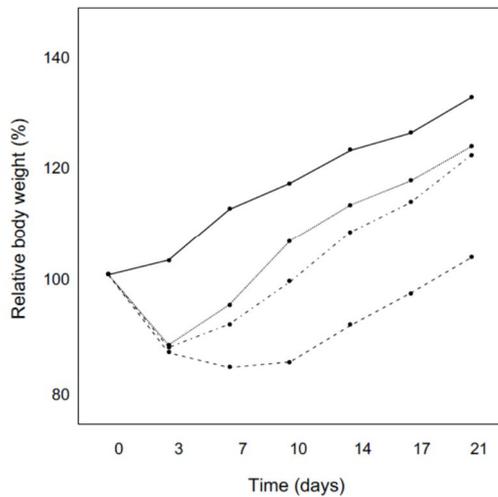
3. 研究の方法

- 1) 肺障害モデルラットに対する臍帯由来 MSC の治療効果を定量的に評価するスコアの確立
- 2) 臍帯由来 Muse 細胞の肺障害モデルラットに対する治療効果の比較検討
- 3) 2)の結果に基づいて、ヒト早産児 CLD に対する第 1・2 相臨床試験の実施

4. 研究成果

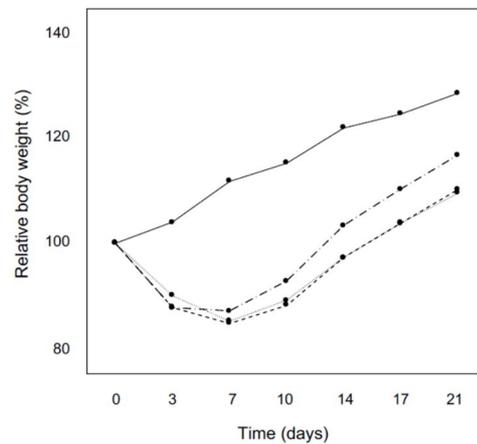
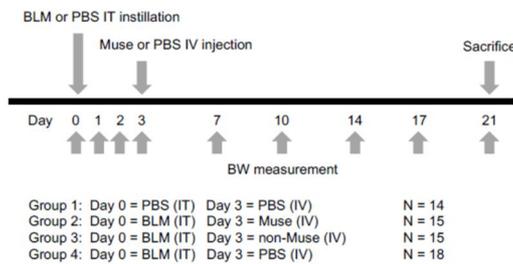
(1) 肺障害モデルラットに対する臍帯由来 MSC の治療効果を定量的に評価するスコアの確立
これまでに我々は、神経芽腫細胞からがんの幹細胞を単離して幹細胞マーカーの発現解析を行っている (Environ Health Prev Med. 17:246-251, 2012)。同様の方法にて臍帯から MSC の分離・培養を行っている。さらに我々は、ブレオマイシン (以下、BLM) 誘発性肺障害モデルラットを作成し、臍帯由来 MSC 投与による治療効果を体重推移及び組織学的重症度を定量的に評価した。BLM を気管内投与し (day0) day3 に MSC (及び対照群には PBS) を尾静脈より投与し day21 に組織学的評価を行った。組織学的評価は、線維化した肺面積、cyst 形成の有無、好中球数等の項目を組み合わせて病理診断医と共にスコアリングを行った。

さらに我々は MSC の中でも早産児の臍帯由来 MSC、正期産児の臍帯由来 MSC との比較を行い、体重増加、肺障害の組織学的スコアリングについて評価した。結果は、早産児 MSC を投与した群が正期産児 MSC を投与した群よりやや体重増加がよく、組織学的スコアリングでは早産児 MSC 投与群が正期産 MSC 投与群よりも改善が見られた。



(2) 臍帯由来 Muse 細胞の肺障害モデルラットに対する治療効果の比較検討

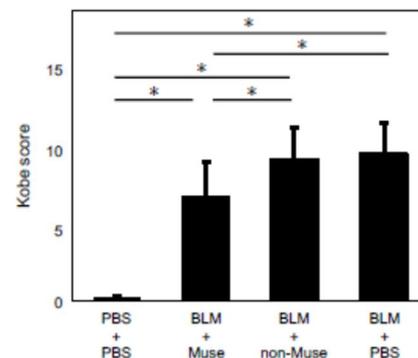
BLM 誘発性肺障害モデルラットに臍帯由来 Muse 細胞または non-Muse 細胞を全身投与し、体重推移、組織学的スコリングを始めとした評価方法をもとに治療効果を定量化し評価した。さらに、Muse 細胞での組織生着能を評価するため、Green Fluorescent Protein(GFP)でラベルした Muse 細胞を用いて、投与後 1 日、6 日、18 日後の肺組織への生着を評価した。

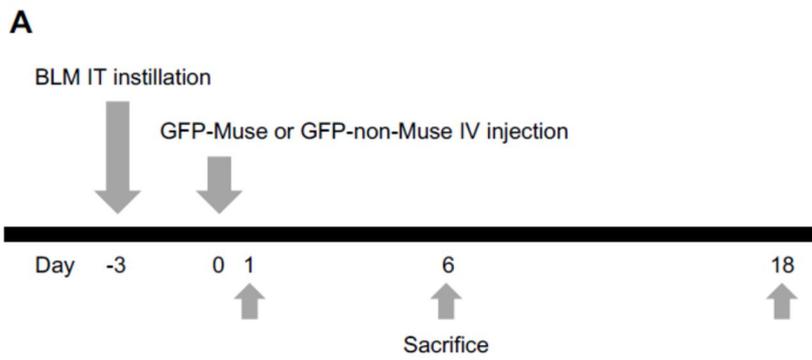


結果は、Muse 細胞投与群で、non-Muse 細胞投与群よりもより体重増加回復が早かった。また組織学的スコリングでは、Muse 細胞投与群で、non-Muse 細胞投与群よりも改善を認めていた。

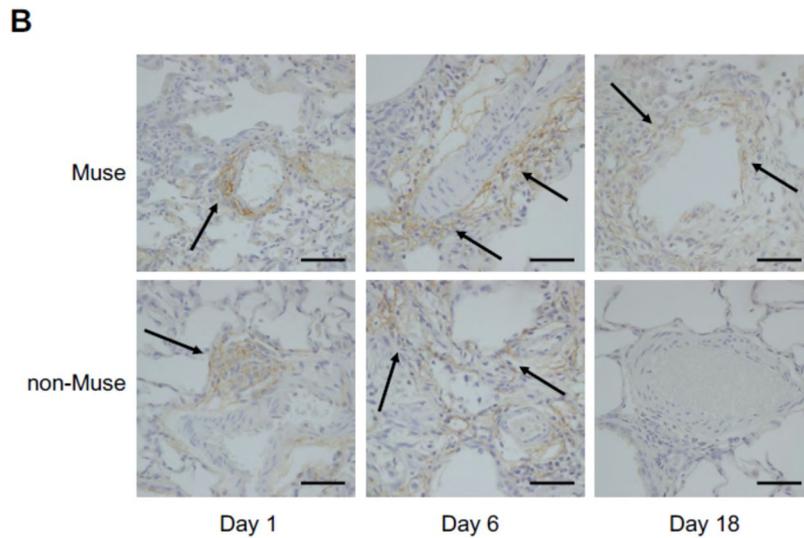
A new histopathological score (Kobe score)

Parameter	Score	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
x12.5 low magnification											
Area of alveolar		0-10%	10-20%	20-30%	30-40%	40-50%	50-60%	60-70%	70-80%	80-90%	90-100%
x40 intermediate magnification											
Fibrosis		-	+								
Granuloma		-	+								
Necrosis		-	+								
Cyst (>500µm)		-	+								
Alveolar septal thickness		<2x	2-4x	4x<							
x400 high magnification											
Neutrophils		0	1-10	10<							
Lymphocytes		0	1-5	5<							
Area of fibrosis		<10%	10-50%	50-90%	90%<						
Nuclear debris		-	+								





GFP ラベルされた Muse 細胞と non-Muse 細胞を左記のプロトコルで評価した結果、投与後 1 日目、6 日目では両群において細胞を可視的に確認されたが、18 日目では、Muse 細胞においてのみ細胞を可視的に確認可能であった。Non-Muse 細胞よりも Muse 細胞でより生着能が高い可能性が示唆された。



(3) ヒト早産児 CLD に対する第 1・2 相臨床試験の実施

早産児のうち、CLD のハイリスク群である、在胎 32 週未満の児で生後 2 週以上人工呼吸器管理を要する児のうち両親の同意を得られた症例を対象として、Muse 細胞を静脈内投与する第 1・2 相臨床試験を実施する計画をしていたが、研究期間内での実施が困難となり断念した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwatani S, Yoshida M, Yamana K, Kurokawa D, Kuroda J, Thwin KKM, Uemura S, Takafuji S, Nino N, Koda T, Mizobuchi M, Nishiyama M, Fujioka K, Nagase H, Morioka I, Iijima K, Nishimura N.	4. 巻 143
2. 論文標題 Endoscopic Submucosal Dissection for Gastric-phenotype Adenoma on the Surface of Gastric Gastrointestinal Stromal Tumor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 1-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/58806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山名啓司
2. 発表標題 プレオマイシン誘発肺障害モデルラットにおける臍帯由来間葉系幹細胞の効果
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----