

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08250

研究課題名(和文)"再生"を用いた新生児/小児肺高血圧症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/children with pulmonary hypertension

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、新生児/小児の肺高血圧症(PAH)に対する新規治療法開発のための基礎的研究を行うことである。

まず、肺高血圧(PH)単独の小児モデルの確立を行った。具体的には、Sugen 5416(VEGF拮抗薬)を生後14日目のSDラットに皮下注射し、その後、低気圧環境下で飼育することで作製した。次に、新生児がPHを来す原因としてもっとも多い慢性肺疾患(CLD)に伴うPHモデルを作製した。具体的には、生後早期のラットを80%高酸素インキュベーターに収容することにより作製した。また、作製したモデルに対して、それぞれ、ヒト脱落乳歯歯髓由来幹細胞、Muse細胞を投与し治療効果を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児/小児の肺高血圧症(PAH)は、右心不全につながり生命を脅かす重要な疾患である。現行のプロスタグランジン製剤、エンドセリン拮抗剤、ホスホジエステラーゼ5阻害薬などによる治療で一定の効果を認めるが、依然として死亡率は高い。本研究では、PAHに対する十分な治療手段を確立するために、再生医療/幹細胞療法に注目した。十分な治療法がないPAHに対して新規治療法を開発のための基礎研究を行った本研究結果は、小児、新生児医療の発展に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose in the current study was to develop novel therapies for pulmonary hypertension (PAH) in neonates/children.

First, we established a pediatric model of pulmonary hypertension (PH). In detail, Sugen 5416 (a VEGF antagonist) was administered subcutaneously to 14-day-old SD rats, and then the rats were put in a hypoxic chamber. Next, we created a model of PH associated with chronic lung disease (CLD), the most common cause of PH in newborns. In detail, early postnatal rats were placed in an 80% hyperoxic incubator.

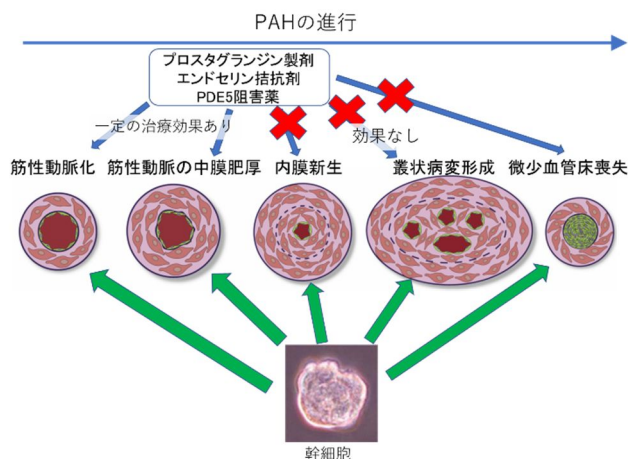
These models were treated with SHED; stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) and Muse cells, respectively, and the therapeutic effects were evaluated.

研究分野：新生児学

キーワード：肺高血圧 新生児 小児 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

新生児/小児の肺高血圧症 (PAH) は、右心不全につながり生命を脅かす重要な疾患である。現行のプロスタグランジン製剤、エンドセリン拮抗剤、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬などによる治療で一定の効果を認めるが、依然として死亡率は高い。PAH は、血管内皮の傷害/機能不全から始まり、筋性動脈化、筋性動脈の中膜肥厚、内膜新生、叢状病変形成、微小血管床喪失と病変が進む。現行の薬剤治療は、血管に働く負の因子の調節により肺血管の内皮機能を回復させる作用が主であり、中膜肥厚に対してまでは効果を期待できる。しかし、PAH 児にみられる広汎な微小血管床の喪失には無効である (右図)。これが既存の治療法で十分な効果が得られない理由として考えられる。



PAH に対する十分な治療手段を確立するために、再生医療/幹細胞療法に

注目した。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。研究代表者らの研究グループにおいても、神経幹細胞、臍帯血幹細胞、間葉系幹細胞を用いて周産期脳障害、新生児慢性肺疾患 (CLD) などに対する幹細胞療法を開発し臨床応用を目指している。“再生”としての治療戦略は、血管内皮障害の修復のみならず、肺の微小血管床の再生の可能性も有している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、幹細胞を用いて PAH に対する治療法開発の基礎的研究をすることである。

3. 研究の方法

本研究では、2 種類の PH モデルを作製した。

本開発の目的を達成するためには、肺高血圧 (PH) 単独、また進行病変での評価が欠かせない。そこで、まず、肺高血圧 (PH) 単独の小児モデルの確立を行った。成人領域の研究ではすでに使用されている SuHX モデルを小児に応用できないか試みた。他のモデルでは、初期病変しかできないが、このモデルでは、肺高血圧の進行モデルまで再現できると言われている。具体的には、Sugen 5416 (VEGF 拮抗薬) 20mg/kg を生後 14 日目の SD ラットに皮下注射し、その後、 -0.05MPa (375mmHg) の低気圧環境下で 3 週間飼育し、その後、室内気で 5 週間飼育して作製した。

次に、新生児が PH を来す原因としてもっとも多い慢性肺疾患 (CLD) に伴う PH モデルを作製した。具体的には、生後早期のラットを 80% 高酸素インキュベーターに 14 日間収容することにより作製した。

PH は、以下の方法で評価した。

(1) 右心室肥大：ラット心臓を、右室 (RV) と左室+心室中隔 (LV+IVS) に分離し、48 時間乾燥させた後に重量 (dry weight) を測定した。その後、 $RV/(LV+IVS)$ を算出し右室肥大を評価した。

(2) 右室圧：外頸静脈より極細カテーテルを右心室まで挿入し、圧トランスデューサシステムを用いて右心内圧を測定した。心内圧の収縮期圧を肺動脈収縮期圧として解析した。

モデル作製後、幹細胞を投与し、幹細胞による治療効果を評価した。SuHX モデルに対しては、ヒト脱落乳歯歯髓由来幹細胞を、CLD に伴う PH モデルには、Muse 細胞を投与した。

4. 研究成果

(1) SuHX モデルの確立

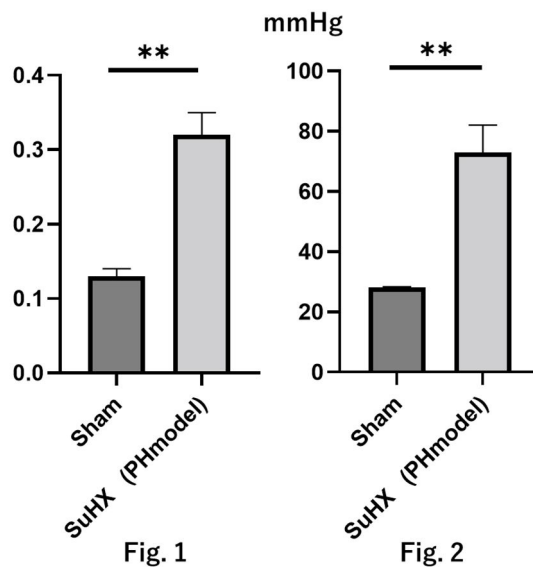
右室心筋肥厚

Sham (正常) 群 : 0.13 ± 0.01 PH 群 : 0.32 ± 0.03 であり、右室肥大を確認できた (Fig.1, $** p < 0.01$)

右室圧

Sham (正常) 群 : 28.1 ± 0.3 PH 群 : 72.9 ± 9.1 であり、右室圧上昇 (肺高血圧) を確認できた (Fig.2, $** p < 0.01$)

体重増加 : 小児モデルでは体重増加も重要なため、評価した。正常群 生後 5 週 141.3 g 生後 7 週 284.2 g 生後 10 週 400.2 g PH 群 生後 5 週 99.1 g 生後 7 週 238.9 g 生後 10 週 372.8 g であり、PH モデルでは、体重増加不良を認めた。



以上より、この PH モデルは小児ラットでも作製できることを確認した。

(2) CLD-PH モデルの確立

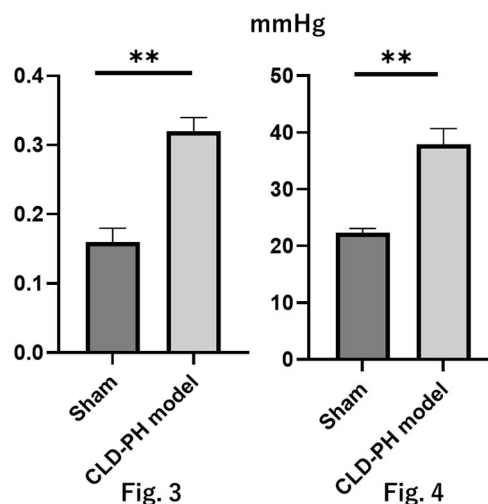
右室心筋肥厚

Sham (正常) 群 : 0.16 ± 0.02 PH 群 : 0.32 ± 0.02 であり、右室肥大を確認できた (Fig.3, $** p < 0.01$)

右室圧

Sham (正常) 群 : 22.3 ± 0.8 PH 群 : 37.9 ± 2.8 であり、右室圧上昇 (肺高血圧) を確認できた (Fig.4, $** p < 0.01$)

以上より、この新生児ラットを用いた慢性肺疾患に伴う PH モデルを作製できることを確認した。



(3) SuHX モデルに対するヒト脱落乳歯歯髓由来幹細胞 (SHED) 投与

SuHX モデルに対して、ヒト脱落乳歯歯髓由来幹細胞 (SHED; stem cells from human exfoliated deciduous teeth) を日齢 35 に外頸静脈から投与した。モデル作製後、10 週齢に PH を確認した。

右心室肥大 : Sham (正常) 群に比べ PH (Vehicle) 群では RV / (LV + IVS) が有意に高値であり、右室肥大を確認できた。しかしながら、PH (Cell) 群では、PH (Vehicle) 群より低

い傾向があったが有意差は認められなかった。

右室圧： Sham（正常）群に比べPH（Vehicle）群では右室圧上昇（肺高血圧）を確認できたが、PH（Cell）群では、改善傾向は見受けられるも有意差は認められず、SHEDの単回投与では有意な改善効果は認められなかった。

（4）CLD-PH モデルに対する Muse 細胞投与

このモデルに対して、Muse 細胞、Muse 細胞以外の間葉系幹細胞（non-Muse 細胞）を日齢 5 に外頸静脈から投与した。

non-Muse 細胞では改善効果は乏しかったが、Muse 細胞で有意な改善を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitase Yuma, Sato Yoshiaki, Arai Sakiko, Onoda Atsuto, Ueda Kazuto, Go Shoji, Mimatsu Haruka, Jabary Mahboba, Suzuki Toshihiko, Ito Miharuru, Saito Akiko, Hirakawa Akihiro, Mukai Takeo, Nagamura-Inoue Tokiko, Takahashi Yoshiyuki, Tsuji Masahiro, Hayakawa Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of a Novel Fetal Growth Restriction Model and Development of a Stem-Cell Therapy Using Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.00212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Eiko, Kitase Yuma, Tachibana Takashi, Hattori Tetsuo, Saito Akiko, Muramatsu Yukako, Takemoto Koji, Yamamoto Hikaru, Hayashi Seiji, Yasuda Ayako, Kato Yuichi, Ieda Kuniko, Oshiro Makoto, Sato Yoshiaki, Hayakawa Masahiro	4. 巻 179
2. 論文標題 Factors related to survival discharge in trisomy 18: A retrospective multicenter study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 1253-1259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.61146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	加藤 太一 (Kato Taichi) (20422777)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	佐藤 義朗 (Sato Yoshiaki) (30435862)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------