

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16857

研究課題名（和文）新生児慢性肺疾患に対するCRISPLD2タンパクの有用性の検討

研究課題名（英文）Usefulness of CRISPLD2 protein for neonatal chronic lung disease

研究代表者

柴田 直昭（Naoaki, Shibata）

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：60633138

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：新生児慢性肺疾患（CLD）は早産児に多く見られ、肺の未熟性、炎症、酸素毒性が原因であるが、治療法が確立していない。間葉系幹細胞（MSC）は免疫調整や組織修復作用があり、CLD治療に期待されているが、効果は一定しない。高純度MSCから得られる、抗炎症作用や肺組織の再生促進作用を認めるCRISPLD2がCLD治療薬としてなりうるか検討した。in vitroで炎症惹起条件および高酸素条件の元で培養した肺上皮細胞株にCRISPLD2を投与したが、抗炎症作用と繊維化抑制効果、抗酸化作用を明らかにすることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPLD2の有効性と安全性を示すことができれば、CRISPLD2をヒトへ応用を行い、CLDの標準的治療になりうる可能性がある。さらに、CLD以外の、急性呼吸窮迫症候群や慢性閉塞性肺疾患、間質性肺炎などの難治性肺疾患の治療薬になりうる可能性も秘めており、多くの患者さんのQOL・ADLの向上だけでなく、医療費・福祉費の低減、ひいては国益の発展にもつながる。

研究成果の概要（英文）：Neonatal chronic lung disease (CLD) is often observed in preterm infants, caused by lung immaturity, inflammation, and oxygen toxicity, but no definitive treatment exists. Mesenchymal stem cells (MSCs) have immunomodulatory and tissue repair functions, and are expected to be effective in CLD treatment, but their effects are inconsistent. This study examined whether CRISPLD2, derived from high-purity MSCs and known for its anti-inflammatory and lung tissue regeneration effects, could be a potential treatment for CLD. In vitro, CRISPLD2 was administered to lung epithelial cell lines cultured under inflammatory and high-oxygen conditions, but its anti-inflammatory, antifibrotic, and antioxidant effects could not be demonstrated.

研究分野：新生児

キーワード：間葉系幹細胞 新生児慢性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

- (1) 新生児慢性肺疾患 (CLD): CLDは、厚生労働省研究班により「先天奇形を除く肺の異常により酸素投与を必要とするような呼吸窮迫症状が新生児期に始まり日齢28を超えて続くもの」と定義され、ほとんどが早産児に発症する。原因として、肺の組織的な未熟性、炎症、酸素毒性などがあげられる。CLD以外の重症な早産児合併症が減少し死亡率は低下している一方で、新生児集中治療室 (NICU) 入院患者のCLD発症率は4.2%であり、CLDの発症は増加傾向にある (慢性肺疾患全国調査2010)。また、重症例は呼吸器からの離脱ができず、また、酸素を中止できないため、呼吸器症状だけでなく、感染症の悪化、肺高血圧や精神運動発達遅滞などの合併症を引き起こし、成人期の高血圧や慢性閉塞性肺疾患を発症する危険も高い。さらに、NICU入院中のCLDの死亡率は3.7%と依然高い値で推移している (慢性肺疾患全国調査2010)。したがって、CLDに対する治療法の開発が不可欠である。

しかし、現在の治療に関して、利尿剤、一酸化窒素吸入療法、ステロイド等が行われているが、その治療効果は明らかではない。

- (2) 間葉系幹細胞 (MSC): MSCは、骨髄や脂肪、臍帯などに存在するなどに存在する幹細胞で、幹細胞としての機能である自己複製能と中胚葉系への分化能 (骨および軟骨、脂肪への分化) を有している。MSCは、骨・軟骨・脂肪への分化能だけでなく、免疫調整作用、組織修復作用などの多種多様な能力を有している。CLDにおいて、MSCが持つ組織修復作用に加えて、抗炎症作用や抗酸化作用などの効果を期待して、国内外で臨床研究や治験が行われているが、その効果は十分とは言えない。申請者らも、骨髄や臍帯血由来MSCを用いて新生児CLDモデルラットの治療研究を行ってきたが、治療反応性が一定ではなかった。

- (3) 高純度MSC: MSCの効果が安定しない原因として、通常のMSCはheterogenousな細胞集団であるため、その機能が均一ではないことが考えられた。そこで、申請者らはセルソーターでCD271とCD90共陽性の細胞を単離し、1細胞ずつプレートに播種して均一な機能を有する高純度MSCを培養することに成功した。しかし、高純度MSCを新生児CLDモデルラットに投与したが、通常のMSCと同様の結果であった。その原因として、高純度MSCはCLDに一定の効果を示す物質が存在するが、細胞サイズが小さく肺に捕捉されないため、効果を示すことができないと考えた。

- (4) 高純度MSCから同定したCRISPLD2: そこで、申請者らはCLDに影響を与える物質を探索するために、高純度MSCを用いて網羅的にRNAシーケンス解析を行ったところ、気道分岐と肺胞の形成に必須で、肺胞上皮細胞や気道平滑筋細胞の炎症を抑制するCRISPLD2が非常に高く発現していることを同定した。また、このCRISPLD2が非常に高濃度に高純度間葉系幹細胞の培養上清中に分泌していることも明らかにした。さらに、CRISPLD2は高濃度酸素の暴露で発現が低下することが報告されていることから、CLDでもCRISPLD2の発現が低いため、肺胞の再生や炎症抑制効果が減弱していることが予想される。

2. 研究の目的

本研究では、肺の形成と抗炎症作用を有する CRISPLD2 が CLD の治療薬としてなりうるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CRISPLD2タンパクの作成：

CRISPLD2 の全長の cDNA を作成した後、pcDNA Vector に搭載する。この Vector を 293T 細胞に導入して、培養上清中の CRISPLD2 タンパクを精製する。

(2) CRISPLD2 による in vitro の効果：

リポサッカロイド (LPS) で肺上皮細胞 (1HAEO cell) に炎症を惹起させた状態あるいは高酸素で培養した状態で、CRISPLD2 を投与して、抗炎症作用、繊維化抑制能、抗酸化作用および肺組織の再生能(遺伝子発現、Western blotting、免疫染色)遊走能(ボイデデンチャンバーアッセイ)を評価する。

4. 研究成果

(1) CRISPLD2タンパクの作成：

CRISPLD2 の全長の cDNA を搭載した pcDNA Vector を作成することができた。その後、293T 細胞に導入して、培養上清中から CRISPLD2 タンパクを精製した。

また、CRISPLD2 の全長の cDNA を搭載したベクターを強制発現する細胞株を作成した。

(2) CRISPLD2による in vitroの効果：

リポサッカロイド (LPS) で肺上皮細胞株 (1HAEO cell) に炎症を惹起させるために、LPS で刺激した。また、同じ細胞株を用いて、高酸素状態にミミックした状況を作成するために、高酸素を模倣する薬剤 (Cobalt Chloride、Dimethyloxalylglycine) を使用した。両方の培養条件下で、CRISPLD2 を投与して、抗炎症作用 (炎症性サイトカインおよび炎症抑制サイトカイン)、繊維化抑制能(繊維化に関する遺伝子発現、免疫染色)、抗酸化作用 (酸化作用に関与する遺伝子発現、ELISA による抗酸化物質の測定)および肺組織の再生能(再生に関与する遺伝子発現および免疫染色)を評価した。

- 1) LPS で刺激した肺上皮細胞株に対して、CRISPLD2、デキサメサゾン、DMSO (control) をそれぞれ添加して、抗炎症作用および繊維化抑制作用、肺組織の再生能を検討した結果、デキサメサゾンにおいて抗炎症作用および繊維化抑制作用を認めたが、CRISPLD2 は DMSO と同じ結果であった。そのため、CRISPLD2 の投与量を変化させて投与したが、高濃度では肺上皮細胞株がアポトーシスした。また、CRISPLD2 の全長の cDNA を搭載したベクターを強制発現する細胞株と肺上皮細胞株を共培養した条件下でも、肺上皮細胞株がアポトーシスした。なお、肺組織の再生能に関しては、CRISPLD2、デキサメサゾン、DMSO のすべてにおいて、再性能の回復はみられなかった。
- 2) 次に、高酸素を模倣する薬剤 (Cobalt Chloride、Dimethyloxalylglycine) を添加して肺上皮細胞株を培養した条件下で、CRISPLD2 および DMSO を投与

した。その結果、繊維化抑制能、抗酸化作用および肺組織の再生能すべてにおいて、変化はみられなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 柴田 直昭, 山本 慧, 吾郷 真子, 竹谷 健
2 . 発表標題 NDUFAF6遺伝子変異はfetal akinesia deformation sequenceと先天性乳び胸の原因になる.
3 . 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会
4 . 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------