

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16888

研究課題名（和文）幹細胞を用いた小腸再生を標的とした新生児壊死性腸炎の治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel regenerative therapy using stem cells for necrotic enteritis

研究代表者

谷口 顕信 (Taniguchi, Akinobu)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：00868523

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：新生児壊死性腸炎（NEC）の治療において、幹細胞の投与が有望な治療法となる可能性がある。この研究では、A細胞を使用した新規治療法の開発を目指し、新生児NECモデルを作製し、A細胞の効果を検討した。しかしながら、A細胞の投与では、治療効果を見出せなかったため、B細胞の静脈内投与、腹腔内投与による効果を検討した。B細胞の両投与方法においても、体重増加、死亡率、組織学的評価のどの評価においても差を見出す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

本研究において、これまで、外科的でしか根治治療がなかった新生児NECに対して、外科的手技よりも侵襲が少なくより簡便な幹細胞投与が有効であると示すべく、二つの細胞で検討したが、効果を見出すことができなかった。しかしながら、モデルの確立、投与方法、評価方法の確立ができたため、今後、細胞腫の変更、また、投与細胞数や投与方法の変更などで、効果のある方法を見出していける可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Stem cell administration may be a promising treatment for neonatal necrotizing enterocolitis (NEC). In this study, we aimed to develop a novel therapy using A cells, and created a neonatal NEC model to examine the efficacy of A cells. However, since no therapeutic effect was found with administration of A cells, the effects of intravenous and intraperitoneal administration of B cells were examined, and no differences were found in weight gain, mortality, or histological evaluation with either method of B cell administration.

研究分野：新生児学

キーワード：壊死性腸炎 新生児

1. 研究開始当初の背景

近年、新生児医療は進歩しているのにも関わらず、新生児壊死性腸炎（necrotizing enterocolitis: NEC）は、未だに死亡率が約 20～30%と高い。重症例では、根治治療である外科的手術を行うが、全身が未熟な早産児には侵襲が高いため、より安全で簡便な新規治療法の開発は喫緊の課題である。幹細胞による治療はヒトにおいても腸管疾患で応用されつつあるが、新生児領域における検討は未だに報告は少ない。A 細胞は、障害部位への遊走効果を持ち、受傷組織に生着し、その場に応じた細胞に分化する特徴を持つため、直接的な再生効果が期待できる。ヒトへの応用には、腹腔内ドレナージの際に A 細胞を腹腔内に投与するモデルが考えられる。これは、技術的に簡易であり、倫理面においても応用までの距離が短いと考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、A 細胞を投与することで、新生児 NEC の改善があることを示し、新規治療につなげるための基礎研究を行うことである。

成人モデルでは、様々な組織における A 細胞の再生作用が証明されており、新生児 NEC に対しても有効な効果が期待されている。本研究において高い有効性と安全性が示すことが出来れば、ヒトへの臨床応用は可能と考えられる。

これまで、外科的でしか根治治療がなかった新生児 NEC に対して、外科的手技よりも侵襲が少なくより簡便な方法が有効であると示すことができれば、格段に児の予後を改善させ、新生児医療に大きく貢献することができる。

A 細胞以外の MSC の作用機序は、幹細胞から分泌される多種多様の成長因子やサイトカインを産生し分泌され、それらが組織保護作用をもたらすものである（trophic effect）。しかし、多くの間葉系幹細胞は生着せずに除去されてしまうために作用は長続きしないとされている。それに対して、A 細胞では、trophic effect に加えて、多くの細胞が直接障害された部位に生着するため、他の種類の MSC よりもさらに組織再生が見込める。

3. 研究の方法

(1)新生児 NEC モデルの作製方法

妊娠 21 日目の SD ラットに帝王切開し新生仔を出生させる。人工栄養 3 回/日、低酸素および低体温負荷（100%CO₂ 10 分+4℃ 5 分）2 回/日+LPS4mg/kg 経腸管投与（生後 2 時間、48 時間）し、全 96 時間で新生児 NEC モデルを作製する（図 1）。

(2) A 細胞を投与による効果の判定

A 細胞以外の MSC（non A 細胞）との比較）

a) 細胞投与群とコントロール群との体重増加や生存率の違いを判定する。

b) 生後 96 時間に腸管切片を採取し、病理学的スケール（図 2.Guven, Journal of pediatrics surgery 2009）を用いて NEC の重症度を判定する。各種 caspases など で染色し壊死および炎症性変化を免疫組織学的に評価する。

(3) 最適な A 細胞の投与方法の選択

モデルラットの最適な投与時期を決めるため、初回刺激後の生後 24 時間あるいは 48 時間にそれぞれ違う量 (1×10^4 , 1×10^5) の細胞を腹腔内、あるいは静脈内に投与する。

投与時期および投与量の違いにおける細胞の生着、治療効果を生後 96 時間で検討する。

4. 研究成果

(1) モデルの作製

NECモデルの作成を、元々は妊娠21日目のSDラットを帝王切開し新生仔を出生させ、人工栄養3回/日、低酸素および低体温負荷（100%CO₂ 10分 + 4℃ 5分）2回/日+LPS4mg/kg経腸管投与（生後2時間、48時間）の全96時間で行っていた。しかし、帝王切開で出生した新生仔は未熟性が強く、INSTECH feeding tubeを用いた人工乳およびLPSの経管投与の際、気管への誤挿入や穿孔による死亡率も高く、実験を行う上で一定数の新生仔を確保することが困難であった。そのため、NECモデルの作成の見直し、新生仔を「自然分娩」にて出生させ初回哺乳を終えた後、人工栄養3回/日、低酸素および低体温負荷（100%CO₂ 10分 + 4℃ 5分）2回/日+LPS4mg/kg経腸管投与（生後2時間、48時間）の全72時間で行った（図3）。その結果、経管投与による誤挿入や穿孔は無くなり、死亡率も低くなり、新生仔を一定数確保できるようになった。

図 1: NEC モデルの作製と治療介入

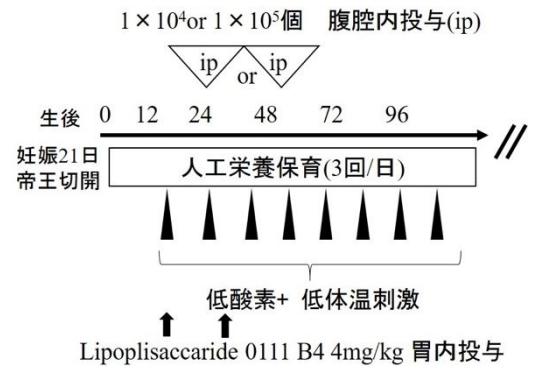


図 2：病理学的重症度スケール（HE 染色）

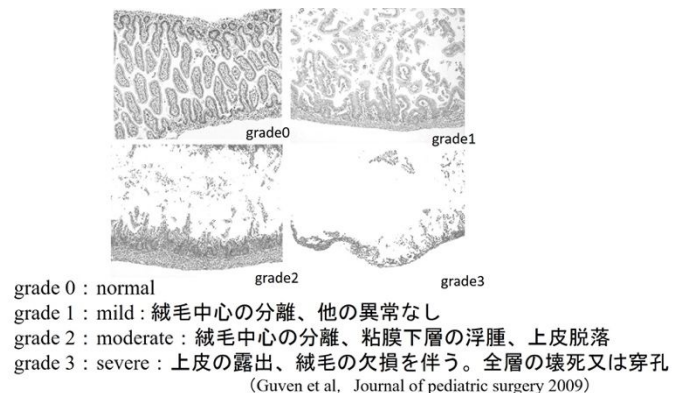
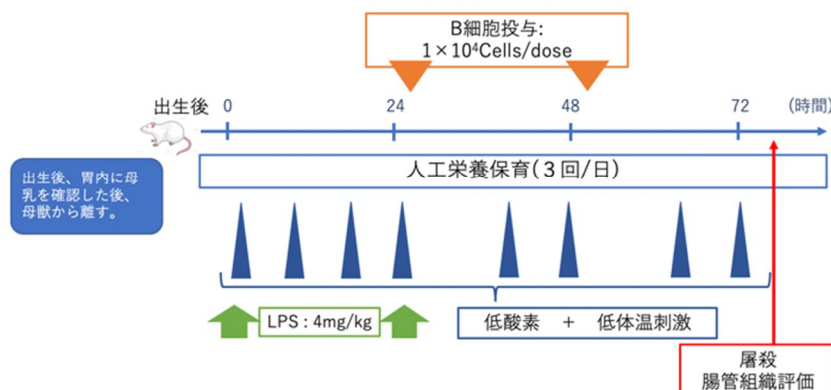


図3：NEC自然分娩プロトコル



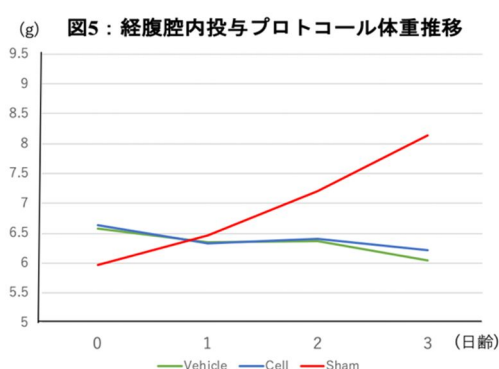
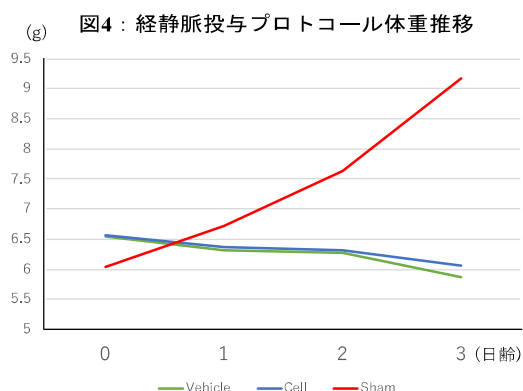
(2) 投与細胞・投与方法

幹細胞での治療介入は、生後24時間および48時間にA細胞 (1×10^4 cells)、A細胞以外の間葉系幹細胞 (nonA細胞、 1×10^4 cells) またはVehicle (HBSS) を腹腔内に投与するプロトコールを実施した。しかしながら、生存率はA細胞投与群で47.6%、non A細胞投与群で21%、Vehicle群で34.7%であり、3群間で有意差を認めなかった。また、静脈内投与も試みたが、死亡率が高く評価ができなかった。

A細胞の腹腔内投与では効果が示せなかったため、A細胞に代わりB細胞を (1×10^4 cells)、またはVehicle (HBSS) を外頸静脈に投与するプロトコール、およびB細胞を (1×10^5 cells)、またはVehicle (HBSS) を腹腔内に投与するプロトコールいずれも実施した。

(3) 出生後体重の推移

出生後から生後 72 時間までの 1 日ごとの体重の推移を Sham (自然分娩しそのまま母獣にて母乳保育された仔ラット) 群、Vehicle 群、B 細胞投与 (Cell) 群で比較するために評価した。経静脈投与プロトコールの体重推移を (図 4)、経腹腔内投与プロトコールの体重推移 (図 5) に示す。まず、経静脈投与プロトコールの出生後体重の推移は、Sham 群では日齢 0: 6.04 ± 0.053 g、日齢 1: 6.71 ± 0.06 g、日齢 2: 7.63 ± 0.1 g、日齢 3: 9.17 ± 0.187 g と日毎に体重増加が得られた一方、Vehicle 群 (日齢 0: 6.54 ± 0.054 g、日齢 1: 6.31 ± 0.052 g、日齢 2: 6.26 ± 0.1 g、日齢 3: 5.86 ± 0.106 g) と Cell 投与群 (日齢 0: 6.56 ± 0.054 g、日齢 1: 6.36 ± 0.054 g、日齢 2: 6.31 ± 0.075 g、日齢 3: 6.05 ± 0.096 g) は日毎に減少傾向であった。続いて実施した経腹腔内投与プロトコールでも体重の推移の傾向は同様に、Sham 群では日齢 0: 5.96 ± 0.207 g、日齢 1: 6.46 ± 0.217 g、日齢 2: 7.21 ± 0.271 g、日齢 3: 8.15 ± 0.31 g と日毎に体重増加が得られた一方、Vehicle 群 (日齢 0: 6.56 ± 0.084 g、日齢 1: 6.35 ± 0.072 g、日齢 2: 6.36 ± 0.074 g、日齢 3: 6.04 ± 0.119 g) と Cell 投与群 (日齢 0: 6.64 ± 0.083 g、日齢 1: 6.43 ± 0.071 g、日齢 2: 6.39 ± 0.076 g、日齢 3: 6.02 ± 0.130 g) は減少傾向であった。

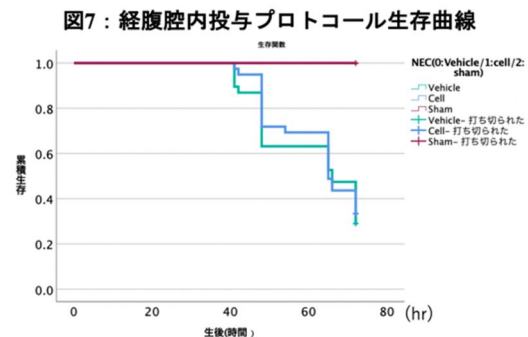
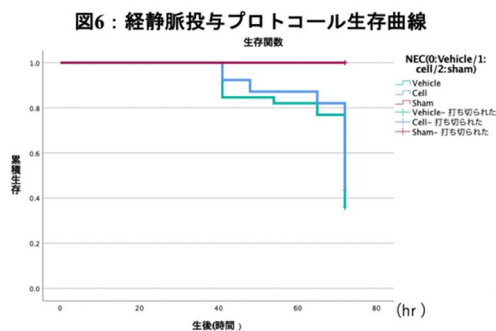


(4) 生存率

続いて、生後 72 時間までの各群の生存率を比較した。結果を経静脈投与プロトコール (図 6)、経腹腔内投与プロトコール (図 7) に示す。経静脈投与プロトコールでは、Sham 群は生存率 100%であったのに対し、Vehicle 群は 35.9%、Cell 群は 43.6%であった。Log-rank

検定で Vehicle 群と Cell 群を比較したところ、 $p = 0.445$ と生存率に優位差を認めなかった。

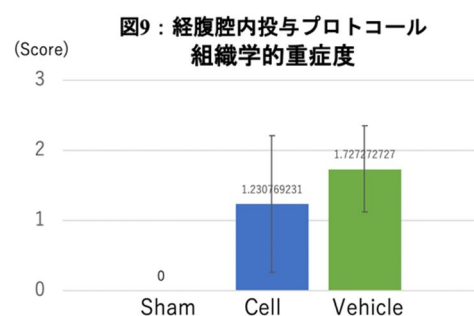
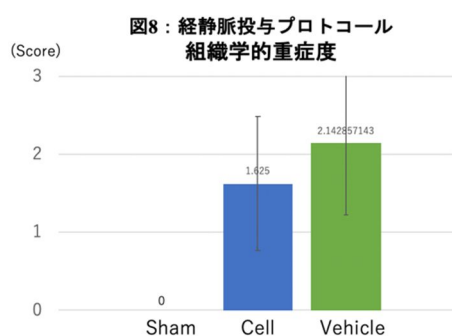
続いて経腹腔内投与プロトコルでは、Sham 群は生存率 100%に対し、Vehicle 群が 28.9%、Cell 群は 33.3%であった。Log-rank 検定で Vehicle 群と Cell 群を比較したところ、 $p = 0.692$ と生存率に優位差を認めなかった。



(5)組織学的評価

組織学的評価の結果を経静脈投与プロトコル (図 8)、経腹腔内投与プロトコル (図 9) それぞれ示す。Sham 群では正常な腸、スコア 0 が確認できた。一方、Vehicle 群および Cell 群では半数以上の仔で、スコア 1 または 2 を認めた。経静脈投与プロトコルでは Sham 群のスコアの平均値は 0、Vehicle 群は 2.14 ± 0.91 、Cell 群は 2.14 ± 0.91 であった。Vehicle 群と Cell 群の両群間 (Vehicle vs Cell $p = 0.1861$)で優位な差は認められなかった。

続いて経腹腔内投与プロトコルでは Sham 群のスコアの平均値は 0、Vehicle 群は 1.73 ± 0.62 、Cell 群は 1.23 ± 0.97 であった。Vehicle 群と Cell 群の両群間 (Vehicle vs Cell $p = 0.1387$)で優位な差は認められなかった。



以上のことから、NEC に対する A 細胞、および B 細胞での有効性は示せなかった。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi Akinobu, Hayakawa Masahiro, Kataoka Erina, Fujishiro Naozumi, Sato Yoshiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Relationship between Neonatal MRI Findings and Emotional/Behavioral Evaluation in Early Childhood for Extremely Low-Birth-Weight Infants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 772～772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11030772	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 —

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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