

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11513

研究課題名(和文)先天性横隔膜ヘルニアモデルマウス低形成肺に対する脱落乳歯歯髄幹細胞の有用性の検討

研究課題名(英文) Examination of usefulness of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for hypoplastic lung of congenital diaphragmatic hernia

研究代表者

近藤 琢也 (KONDO, Takuya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00644725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニトロフェンを母体マウスに投与することで横隔膜ヘルニアモデルを作成し、幹細胞投与による治療効果を検討することを目標とした。妊娠8.5日のマウスにニトロフェン25mgを経口投与してモデルマウス作成を試みた。胎仔体重の減少など薬剤の一定の影響は認められたものの、横隔膜ヘルニアの胎仔での発生は全体の10%程度と非常に少ない状況であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験で当初目的とした間葉系幹細胞を用いた横隔膜ヘルニアの新たな胎児治療の創出には至らない結果であった。本疾患の研究において、モデル動物作製は可能であるものの、その作成効率は非常に悪いことが確認され、新たな例報開発に関しても、代替的なモデルや実験方法の検討が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to investigate the therapeutic effect of stem cell administration by creating a diaphragm hernia model by administering nitrophen to maternal mice. We tried to make a model mouse by orally administering 25 mg of nitrophen to a mouse on 8.5 days of pregnancy. Although some effects of the drug were observed, such as a decrease in fetal body weight, it was confirmed that the incidence of diaphragmatic hernia in fetuses was about 10% of the total, which was extremely small.

研究分野：小児外科

キーワード：横隔膜ヘルニア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日の新生児集学的治療の進歩により、新生児外科疾患の予後は飛躍的に向上した。**CDH** に関しても、出生後より **gentle ventilation** を中心とした高頻度振動換気法 (以下 **HFO**) や **NO** 吸入療法、体外式膜型人工肺 (**ECMO**) などの高度な治療法の導入に伴い、徐々に生命予後は改善が得られるようになってきている。



救命に至らなかった症例の剖検

しかし、重症例 (右図に示すような高度低形成肺を有する症例) に関しては、欧米での胎児治療 (胎児鏡下の気管支バルーン閉塞など) の報告はあるものの、未だに革新的な生命予後の改善には至っていない。更なる生命予後、**QOL(Quality of life)**改善のためには、この研究の目的である肺成熟を誘導する新たな治療方法の開発が求められているといえる。

2. 研究の目的

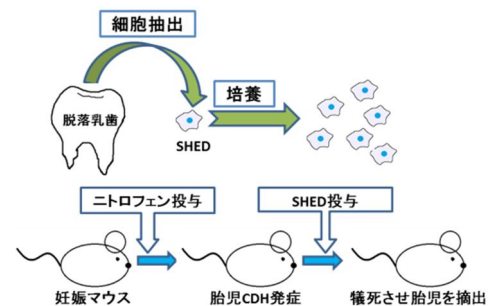
上記より、ヒトへの臨床応用を視野に入れた、新たな治療方法確立のための実験が必要と考えられた。ニトロフェン誘導 **CDH** モデルマウスの肺の成長発達過程に、ヒト由来の間葉系幹細胞を経母獣的に投与することで、胎内で肺成熟の促進が得られ、今後の臨床応用に向けた基礎的知見が得られるのではないかと考え、本実験を計画した。

3. 研究の方法

1,ニトロフェンを母獣の胃内に投与し、**CDH** モデルマウスを作製する。

2,母獣に **SHED** を投与し、出生前に犠死胎仔を摘出し横隔膜ヘルニアの有無を確認、肺を摘出する。

3,摘出した肺の成熟度や肺への **SHED** ホーミングの有無を確認し、形態学的肺成熟促進効果の判定を行う。

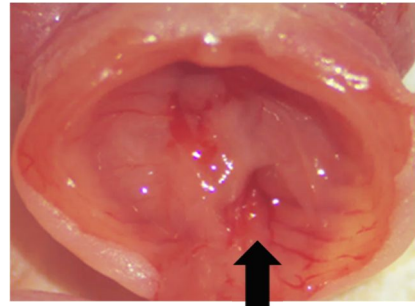


4. 研究成果

CDH モデルマウス作成のために **ICR** マウスを用いることとした。交配済みのマウスを購入し、妊娠 **8.5** 日にニトロフェン **25mg**/個体をオリーブオイルに溶解して投与する計画とした。まずは、第 **1** 群として6頭のマウスで実験をケ計画し、**1** 頭はオリーブオイルのみ投与のコントロールとし、5頭はニトロフェンを溶解したオリーブオイルを投与した。その妊娠 **18.5** 日で犠死せしめ、胎仔を回収し、妊娠の有無、胎仔の頭数、体重、横隔膜ヘルニアの発生有無を確認した (表1)

表1	投与	妊娠有無	胎仔数	平均体重	疾患発生数
1	Olive Oil	なし	0	-	-
2	Nitrofen	あり	16	1.27g	2
3	Nitrofen	なし	0	-	-
4	Nitrofen	注入時死亡	-	-	-
5	Nitrofen	あり	9	1.44g	1
6	Nitrofen	あり	13	1.26g	0

平均体重を計測したものの、コントロールが非妊娠であったため、比較困難であった。横隔膜ヘルニアは**3/38(7.9%)**に認めるのみと、非常に少なかった。また、**1**頭で注入後に死亡も認めた。上記結果からは、妊娠に確定前に薬剤投与を計画するため、妊娠していないマウスも場合によって含まれること、薬剤投与時の死亡が起こ



ること、横隔膜ヘルニアの発生が低い可能性が示唆された。確認された胎仔マウスの横隔膜欠損孔
また、オリーブオイルへのニトロフェンの溶解は難しく、一部溶解不十分であった可能性を考慮し、次回投与では溶解に細心の注意を払いつつ、再度、第**2**群として**6**頭のマウスを設定することとした(表2)

表2	投与	妊娠有無	胎仔数	平均体重	疾患発生数
1	Olive Oil	なし	-	-	-
2	Olive Oil	あり	10	1.31g	-
3	Nitrofen	あり	13	1.08g	1
4	Nitrofen	なし	-	-	-
5	Nitrofen	あり	2	1.06g	0
6	Nitrofen	あり	9	1.13g	2

(胎盤形成認めたものの、胎仔を認めないものも多数認めた)

第2群では投与時死亡は認めなかったものの、6匹中2匹が未妊娠マウスであり。コントロールとしての母体は1頭であった。薬剤投与マウスに関しては3頭の妊娠であったが、胎仔数は、24匹と少なかった。横隔膜の欠損孔は3頭に認め、発生数は3/24(12.5%)であった。上記の結果を表3にまとめる。

表3	胎仔数	平均体重	疾患発生数(率)	体重 p 値
コントロール	10	1.31	-	-
ニトロフェン	62	1.23	6(9.7%)	0.095

ニトロフェンに投与により胎仔の体重が減少傾向にあり、薬剤の影響が出ている可能性が考えられたが、横隔膜ヘルニア発生数は10%以下と少ない状況であり、今後の実験に進むにあたり不安定性があると判断。実験で用いるマウスの種類をICRマウスからB6マウスへ変更して、再度第3群として実験を行った。しかしB6マウスに関しては、6頭いずれも犠死にて妊娠していないという結果であった。

上記より、マウスでのニトロフェンを用いた横隔膜ヘルニアモデルマウスでの実験は困難と判断。胎仔の肺の発生学的評価に変更の方針とし、胎児肺の染色を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	田口 智章 (TAGUCHI Tomoaki) (20197247)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	江角 元史郎 (ESUMI Genshiro) (30452759)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	木下 義晶 (KINOSHITA Yoshiaki) (80345529)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	