

令和元年5月17日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15534

研究課題名(和文)慢性肺疾患児の複数臓器障害に対する包括的細胞療法の開発

研究課題名(英文)The development of cell therapies for complications in several organs in infants with CLD

研究代表者

早川 昌弘 (Hayakawa, Masahiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授

研究者番号：40343206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：新生児慢性肺疾患(CLD)は呼吸器関連障害に加え、精神運動発達遅滞などの危険因子であり、呼吸器以外の様々な臓器に影響をもたらす可能性が指摘されている。本研究では炎症性ケモカインCCL2を阻害するMSC(7ND-MSC)やMultilineage-differentiating stress enduring cells(Muse細胞)の静脈内投与の複数臓器への効果を検討した。7ND-MSCおよびMuse細胞の静脈内投与は、通常の間葉系幹細胞よりも強く全身性炎症および気道炎症を抑制し、肺組織における肺胞発達障害や心臓における肺高血圧性変化に対し治療効果をもたらすことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られた結果は、新生児慢性肺疾患(CLD)児において、呼吸器疾患のみならず肺高血圧症や心機能の長期予後改善につながる可能性がある。また、CLDモデルの中樞神経の評価において正常ラットとの差異をみとめ、CLD児の神経学的予後不良の基礎データをえることができた。

早産・低出生体重児の生存率が上昇しているが、CLDの罹患率は依然として高率である。幹細胞療法によりCLD児の長期予後を改善させるという本研究の成果は、CLD児の健康のみならず医療費削減につながり大きな社会的意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Neonatal chronic lung disease is a risk factor for not only respiratory disorder but also psychomotor developmental delay. And it is well known that that it may affect various organs other than respiratory organs. In this study, we investigated the effects of multiple organs to administer 7ND-MSC and Multilineage-differentiating stress enduring cells (Muse cells). Intravenous administration of 7ND-MSC and Muse cells suppresses systemic inflammation and airway inflammation more strongly than normal mesenchymal stem cells, and is effective in treating alveolar developmental disorders in lung tissue and pulmonary hypertensive changes in the heart.

研究分野：胎児・新生児学

キーワード：細胞療法 慢性肺疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新生児慢性肺疾患 (chronic lung disease : CLD) は、新生児医療の重大かつ頻度の高い合併症である。新生児医療の進歩に伴い、この 20 年間で先進諸国における出生体重 1500g 未満の児の生存率は上昇しているが、CLD の罹患率は依然として高率である。CLD 罹患児は幼児期における呼吸器感染症の増加、青年期にまで及ぶ呼吸機能低下など、様々な呼吸器関連障害を起こしうる。それに加え、CLD は精神運動発達遅滞や学童期の低知能指数、注意欠陥多動性障害などの危険因子であり、呼吸器以外の様々な臓器に影響をもたらす可能性が指摘されている。呼吸器管理方法の改善などで一定の治療効果は得られるが十分な治療法はないため、新生児医療において CLD の新規治療法の開発は急務の課題である。その解決策の 1 つとして幹細胞治療が注目されている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、周産期 CLD モデルラットを確立し、従来の MSC のみならずさらに効用が期待できる幹細胞を投与することで、複数臓器に対する治療効果を検討することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験モデル動物の作成

CLD における肺障害の主な要因が酸素毒性であることから、新生仔ラットに生直後から高酸素負荷を行うことでモデルを作成することとした。死亡率、体重増加推移などを参考に投与酸素濃度や酸素投与期間を変更しモデル作成を行った。次に組織評価を行い、CLD モデルとしての有効性を確認した。肺組織については、肺胞発達障害の指標として肺組織体積密度の測定を行った。心臓については、右室肥大の指標として右室と心室中隔+左室の乾燥重量比 (RV/LV+IVS) を測定した。また、脳組織については髄鞘を染めるミエリン塩基性蛋白質 (MBP) 抗体を用いた免疫組織学的染色によって検討を行った。次に、確立した CLD モデルラットに対して幹細胞を投与し、慢性肺疾患の治療効果を検討した。投与する幹細胞は、従来の間葉系幹細胞 (MSC) に加え、炎症性ケモカイン CCL2 を阻害する MSC (7ND-MSC) や、組織修復能を持つと言われている Multilineage-differentiating stress enduring cells (Muse 細胞) とした。

#### (2) 7ND-MSC 投与と治療効果確認

出生後 24 時間以内に高酸素負荷を開始し、日齢 4 に 7ND-MSC、通常の MSC (各  $1 \times 10^5$  cells/個体) または酢酸リンゲル液 (0.1ml) を右外頸静脈から投与した。その後も高酸素負荷を継続し日齢 15 に各種評価を行った。評価は各 CLD ラットを 7ND 群、MSC 群、vehicle 群の 3 群に分類し、室内大気で飼育したラットを sham 群として、4 群について行った。評価については、前項と同様に肺組織体積密度と RV/LV+IVS の測定し、組織学的評価を行った。さらに日齢 15 に採取した血液と肺胞洗浄液を用いて細胞学的評価を行い、全身性炎症および気道炎症について検討を行った。また qPCR により IL-6、CCL2 などの炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定し、肺組織の生化学的評価を行った (図 1)。

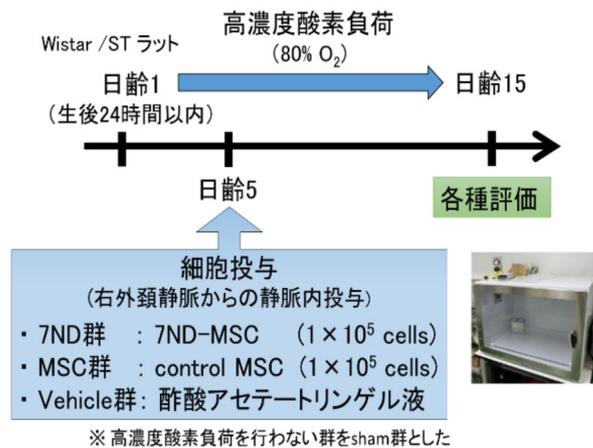


図 1

#### (3) Muse 細胞投与と治療効果確認

出生後 24 時間以内に高酸素負荷を開始し、日齢 4 に Muse 細胞、Muse 細胞を除外した残りの MSC (non Muse 細胞) (各  $1 \times 10^4$  cells/個体) またはハンクス平衡塩溶液 (0.1ml) を静脈内投与した。治療効果確認について、Muse 細胞には再生、組織修復効果が期待できることから、一部はこれまでと同様の日齢 15 で行い、残りはさらに 2 週間室内酸素で飼育し日齢 29 で評価した。評価は、組織学的評価として肺組織体積密度と RV/LV+IVS の測定を行い、さらに肺胞洗浄液を用いて細胞学的評価を行った。次に、Muse 細胞、non Muse 細胞の体内分布確認を行うために、日齢 29 に各種臓器 (右側肺・左側肺・肝臓・脾臓・脳) を採取した。ヒトゲノムに特異的な Alu 配列の定量的 PCR を行い、各臓器におけるヒト細胞を検出することで、投与後の体内分布を確認した。なお、Muse 細胞は、ヒト骨髄由来 MSC のうち、FACS で SSEA-3 と CD105 が共に陽性であった細胞とし、non Muse 細胞は Muse 細胞を分離した後の残りの細胞とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験モデル動物の確立

酸素濃度を 95%、90%、80%、60% の 4 群に設定し 2 週間負荷を行った。その結果生存率はそれぞれ 10%、20%、40%、90% であった。次に 80% 酸素濃度下で負荷期間を 7 日、14 日、28 日とし負荷を行った。その結果生存率はそれぞれ 100%、60%、10% であった。以上の結果から、安定したモデル作成のための酸素負荷条件を酸素濃度 80%、負荷期間 14 日とした。次に高酸素負荷 14 日後に屠殺したラットの各種臓器を用い組織評価を行った。肺組織について、CLD 群では肺組織体積密度の減少がみられ ( $p < 0.01$ : CLD 群 vs. 対照群)、肺胞発達障害が確認された (図 2)。また心臓では CLD 群で RV/LV+IVS の上昇を認め ( $p < 0.01$ : CLD 群 vs. 対照群)、右室肥大の進行すなわち心臓の肺高血圧性変化を確認することができた。さらに MBP 抗体を用いた脳切片の免疫組織学的染色では、CLD モデルにおいて明らかに染色部位が減少していた (図 3)。

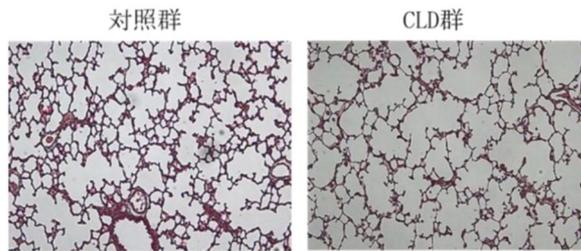


図2

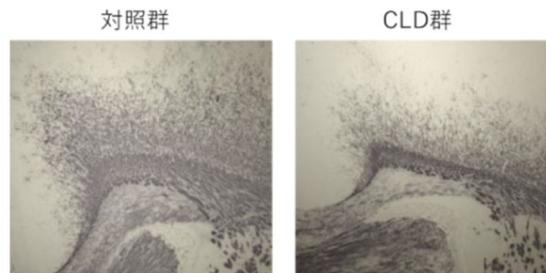


図3

##### (2) 7ND-MSc 投与と治療効果確認

###### 死亡率、体重増加推移

死亡率について、CLD 群のうち 3 群間で差は認めなかった。高酸素負荷終了時 (日齢 15) の体重について、CLD 群のうち 7ND 群は MSC 群、vehicle 群と比較して増加傾向を認めた ( $p < 0.01$ : 7ND 群 vs. vehicle 群、 $p = 0.06$ : 7ND 群 vs. MSC 群)。

###### 組織学的評価

肺組織について、7ND 群では MSC 群、vehicle 群と比較して肺組織体積密度の有意な改善を認め、7ND-MSc の肺胞発達障害抑制効果が確認された ( $p < 0.01$ : 7ND 群 vs. vehicle 群および MSC 群)。心臓についても、7ND 群では MSC 群、vehicle 群と比較して RV/LV+IVS の有意な改善を認め、右室肥大の改善すなわち心臓の肺高血圧抑制効果を確認した ( $p < 0.01$ : 7ND 群 vs. vehicle 群、 $p < 0.05$ : 7ND 群 vs. MSC 群)。

###### 細胞学的評価

血液検査において、vehicle 群は白血球数、特にリンパ球数の増加がみられ、高酸素負荷による全身性非特異的炎症が生じていると考えられた。それに対し、7ND 群では有意な細胞数の減少を認め、非特異的炎症の改善効果が確認された。一方 MSC 群では、細胞数の低下は認めなかったものの、有意差は見られなかった ( $p < 0.01$ : 7ND 群 vs. vehicle 群)。また肺胞洗浄液を用いた評価では、白血球、特に肺胞マクロファージの数が高酸素負荷により増加していたが、MSC 群では改善が見られ、さらに 7ND 群ではその改善効果が顕著であった ( $p < 0.01$ : 7ND 群 vs. vehicle 群および MSC 群、MSC 群 vs. vehicle 群)。

###### 生化学的評価

肺組織を用いた生化学的評価について、高酸素負荷により IL-6、CCL2 など炎症性サイトカインの mRNA 発現量が増加していた。さらに 7ND 群でのみ有意な改善がみられ、7ND-MSc による炎症性サイトカイン抑制効果を確認した ( $p < 0.01$ : 7ND 群 vs. vehicle 群)。

##### (3) Muse 細胞投与と治療効果確認

###### 死亡率、体重増加推移

死亡率、体重増加推移について、CLD 群のうち 3 群間で差は認めなかった。

###### 組織学的評価

高酸素負荷により肺組織体積密度は低下していたが、細胞投与により改善がみられた。さらに vehicle 群と比較して、non Muse 群では肺組織体積密度の改善効果は見られたものの有意ではなかった。一方、Muse 群は日齢 15、日齢 29 いずれにおいても有意な改善を認めた ( $p < 0.05$ : Muse 群 vs. vehicle 群: 日齢 15、 $p < 0.01$ : Muse 群 vs. vehicle 群: 日齢 29)。以上のことから、Muse 細胞の方が non Muse 細胞よりも肺胞発達障害に対する強い治療効果を有することが確認できた。また心臓について、Muse 群では vehicle 群と比較して RV/LV+IVS の有意な改善を認め、右室肥大の改善効果を確認した ( $p < 0.01$ : Muse 群 vs. vehicle 群および non Muse 群: 日齢 29)。

###### 細胞学的評価

肺胞洗浄液を用いた細胞学的評価について、CLD 群では白血球、特にマクロファージやリンパ球などの炎症性細胞が増加していた。さらに vehicle 群と比較して、Muse 群では炎症性細胞の増加が有意に抑制されていた ( $p < 0.05$ : Muse 群 vs. vehicle 群) が、non Muse 群では Muse 群と同様な傾向があったものの、抑制効果は有意ではなかった。

Muse 細胞、non Muse 細胞の体内分布確認

Alu 配列の定量的 PCR による評価では、いずれの臓器でも Muse 細胞、non Muse 細胞は検出された。さらに肺組織では、non Muse 細胞と比較して Muse 細胞がより多く検出され、Muse 細胞の方が肺組織に多く生着することが確認できた。

これらの結果から、CLD モデルラットに対する 7 ND-MSc や Muse 細胞の静脈内投与は、通常の MSC よりも強く全身性炎症および気道炎症を抑制し、肺組織における肺胞発達障害や心臓における肺高血圧性変化に対し治療効果をもたらすことが確認された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Sugiyama Y, Sato Y, Kitase Y, Suzuki T, Kondo T, Mikrogeorgiou A, Horinouchi A, Maruyama S, Shimoyama Y, Tsuji M, Suzuki S, Yamamoto T, Hayakawa M: Intravenous Administration of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell, but not Adipose Tissue-Derived Stem Cell, Ameliorated the Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury by Changing Cerebral Inflammatory State in Rat. *Frontiers in neurology*. 9:757,2018, 10.3389/fneur.2018.00757 (査読有)

Sato Y, Ueda K, Kondo T, Hattori T, Mikrogeorgiou A, Sugiyama Y, Suzuki T, Yamamoto M, Hirata H, Hirakawa A, Nakanishi K, Tsuji M, Hayakawa M: Administration of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Contributed to the Reduction of Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Frontiers in neurology*. 9:987,2018, 10.3389/fneur.2018.00987 (査読有)

Mikrogeorgiou A, Sato Y, Kondo T, Hattori T, Sugiyama Y, Ito M, Saito A, Nakanishi K, Tsuji M, Kazama T, Kano K, Matsumoto T, Hayakawa M: Dedifferentiated Fat Cells as a Novel Source for Cell Therapy to Target Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Dev Neurosci*. 39:273-86,2017, 10.1159/000455836 (査読有)

### 〔学会発表〕(計12件)

北瀬 悠磨, 佐藤 義朗, 上田 一仁, 田中 雅人, 田中 亮, 呉 尚治, 浅田 英之, 三浦 良介, 見松 はるか, 鈴木 俊彦, 伊藤 美春, 齊藤 明子, 村松 友佳子, 辻 雅弘, 早川 昌弘. Muse 細胞を用いた胎児発育不全における神経発達障害に対する新規治療法の開発. 第 54 回日本周産期・新生児医学会. 2018 年 7 月 8 日-10 日

鈴木 俊彦, 佐藤 義朗, 村松 友佳子, 高橋 義行, 早川 昌弘. 新生児分野で臨床応用が期待される基礎研究 新生児慢性肺疾患(CLD)に対する幹細胞療法. 第 121 回日本小児科学会. 2018 年 4 月 20 日-22 日

鈴木 俊彦, 佐藤 義朗, 呉 尚治, 上田 一仁, 見松 はるか, 北瀬 悠磨, Mikrogeorgiou Alkisti, 杉山 裕一郎, 近藤 大貴, 中西 圭子, 辻 雅弘, 早川 昌弘. Multilineage-differentiating stress enduring cells を用いた新生児低酸素性虚血性脳症に対する新規治療法の開発. 第 62 回日本新生児成育医学会 2017 年 10 月 12 日~14 日

鈴木 俊彦, 佐藤 義朗, 上田 一仁, 田中 雅人, 田中 亮, 三浦 良介, 呉 尚治, 浅田 英之, 北瀬 悠磨, 立花 貴史, 見松 はるか, 伊藤 美春, 齊藤 明子, 村松 友佳子, 早川 昌弘, 出澤 真理, 串田 良祐. 新生児慢性肺疾患に伴う肺高血圧症に対する Multilineage-differentiating stress enduring cells を用いた新規治療法の開発. 第 62 回日本新生児成育医学会 2017 年 10 月 12 日~14 日

佐藤 義朗, 鈴木 俊彦, 田中 雅人, 上田 一仁, 田中 亮, 三浦 良介, 呉 尚治, 浅田 英之, 北瀬 悠磨, 立花 貴史, 見松 はるか, 伊藤 美香, 齊藤 明子, 村松 友佳子, 早川 昌弘, 出澤 真理, 串田 良祐. Multilineage-differentiating stress enduring cells を用いた新生児慢性肺疾患に対する新規治療法の開発. 第 62 回日本新生児成育医学会 2017 年 10 月 12 日~14 日

鈴木 俊彦, 佐藤 義朗, 上田 一仁, 片岡 英里奈, 北瀬 悠磨, 杉山 裕一郎, 立花 貴史, 見松 はるか, 伊藤 美春, 齊藤 明子, 村松 友佳子, 中西 圭子, 早川 昌弘. 新生児慢性肺疾患モデルラットにおける CCL2 を抑制する間葉系幹細胞投与の影響についての検討. 第 53 回日本周産期・新生児医学会 2017 年 7 月 16 日~18 日

北瀬 悠磨, 佐藤 義朗, 上田 一仁, 見松 はるか, 鈴木 俊彦, 杉山 裕一郎, 近藤 大貴, 立花 貴史, 伊藤 美春, 齊藤 明子, 村松 友佳子, 向井 丈雄, 長村 登紀子, 辻 雅弘, 早川 昌弘. 今後の臨床応用が期待される基礎的研究 胎児発育遅延モデルラットの中枢神経障害に対する幹細胞療法の開発. 第 53 回日本周産期・新生児医学会 2017 年 7 月 16 日~18 日

日

鈴木 俊彦, 佐藤 義朗, 上田 一仁, 片岡 英里奈, Mikrogeorgiou Alkisti, 北瀬 悠磨, 杉山 裕一朗, 立花 貴史, 見松 はるか, 松沢 要, 伊藤 美春, 齋藤 明子, 村松 友佳子, 中西 圭子, 早川 昌弘 . CCL2 ドミナントネガティブ阻害剤導入幹細胞を用いた慢性肺疾患モデルに対する改善効果(Mesenchymal stem cells stably transduced with a dominant-negative inhibitor of CCL2 ameliorate chronic lung disease) . 第 61 回日本新生児成育医学会 2016 年 12 月 1 日 ~ 3

日

北瀬 悠磨, 佐藤 義朗, 見松 はるか, 鈴木 俊彦, Mikrogeorgiou Alkisti, 杉山 裕一朗, 中西 圭子, 辻 雅弘, 早川 昌弘 . 新生児低酸素性虚血性脳症に対する stem cells from human exfoliated deciduous teeth を用いた幹細胞療法(Administration of stem cells from human exfoliated deciduous teeth ameliorates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats)(英語) . 第 61 回日本新生児成育医学会 2016 年 12 月 1 日 ~ 3 日

Mikrogeorgiou Alkisti, 佐藤 義朗, 近藤 大貴, 杉山 裕一朗, 鈴木 俊彦, 北瀬 悠磨, 見松 はるか, 辻 雅弘, 中西 圭子, 早川 昌弘 . 新生児低酸素性虚血性脳症の治療候補としての脱分化型脂肪細胞(Dedifferentiated fat cells as a candidate for the treatment of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy) . 第 61 回日本新生児成育医学会 2016 年 12 月 1 日 ~ 3 日

鈴木 俊彦, 佐藤 義朗, 近藤 大貴, 杉山 裕一朗, Mikrogeorgiou Alkisti, 北瀬 悠磨, 見松 はるか, 早川 昌弘 . 新生児低酸素性虚血性脳症に対する Multilineage-differentiating stress enduring cells を用いた幹細胞療法 . 第 52 回日本周産期・新生児医学会 2016 年 7 月 16 日 ~ 18 日

Mikrogeorgiou Alkisti, 佐藤 義朗, 近藤 大貴, 杉山 裕一朗, 鈴木 俊彦, 北瀬 悠磨, 見松 はるか, 辻 雅弘, 中西 圭子, 早川 昌弘 . 新生児ラットモデルにおいて脱分化脂肪細胞は低酸素性虚血性脳損傷を軽減する(Dedifferentiated fat cells ameliorate hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal rat model) . 第 52 回日本周産期・新生児医学会 2016 年 7 月 16 日 ~ 18 日

日

〔図書〕(計 1 件)

Hayakawa M. Pathophysiology and pathology of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. In: Shintaku H, Oka A, Nabetani M, editors. Cell Therapy for Perinatal Brain Injury. Tokyo: Springer; 2018. p. 25-35.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称: 多能性幹細胞による胎児発育不全に伴う脳障害の改善及び治療

発明者: 佐藤義朗、北瀬悠磨、清水忍、水野正明、早川昌弘、出澤真理 辻雅弘

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-153263

出願年: 平成 29 年

国内外の別: 国内

名称: Multilineage-differentiating Stress Enduring ( Muse ) 細胞による肺障害、肺高血圧改善

発明者: 佐藤義朗、鈴木俊彦、清水忍、水野正明、早川昌弘、出澤真理

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-153263

出願年: 平成 28 年

国内外の別: 国内

名称: 多能性幹細胞による周産期脳障害の改善及び治療

発明者: 佐藤義朗、鈴木俊彦、清水忍、水野正明、早川昌弘、出澤真理

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-098186

出願年: 平成 28 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 義朗

ローマ字氏名：SATO Yoshiaki

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：30435862

研究分担者氏名：奥村 彰久

ローマ字氏名：OKUMURA Akihisa

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60303624

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。