

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790760
 研究課題名（和文） 臍帯血 CD34 陽性細胞(血液幹細胞)を用いた肺 型上皮細胞の再生に関する基礎研究
 研究課題名（英文） Basic research for regeneration of pulmonary type II epithelial cells by using cord blood CD34 positive cells

研究代表者
 北東 功（HOKUTO ISAMU）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：00296625

研究成果の概要：

臍帯血中 CD34 陽性細胞を Matrigel 上、又はフィルターメンブレンを用いた気相液相境界面での培養で肺 型上皮細胞に分化を誘導することは不可能であった。少なくとも臍帯血中 CD34 陽性細胞から肝細胞、血管内皮細胞への分化誘導と同様の手法(primary culture と同様の条件での CD34 陽性細胞の培養により血管内皮細胞、肝細胞は分化可能)では困難である。FGF-7、ハイドロコルチゾン以外に何らかの成長因子などが必要なのかも、今後の検討課題である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：臍帯血幹細胞、FGF-7、肺 型上皮細胞、サーファクタント蛋白

1. 研究開始当初の背景

慢性肺疾患は超早産児における重要な合併症で、新生児医療の進んだ現在においても、早産児の養育を行う上で管理の困難な疾患の一つである。その病態は、

1) 呼吸状態の悪い早産児に人工呼吸管理を長期に行うこと

2) 胎児期の羊膜絨毛膜炎などによる炎症が肺に波及すること

が原因で、肺胞構造が破綻することにある。

人工呼吸管理を離脱することにともない構築の破綻した部位は正常組織が再生し治癒していくが、自然治癒には時間がかかることが知られており、治癒までに感染症に罹患

し命を落とす例や、人工呼吸から離脱困難となり人工呼吸器の設定を変更（酸素濃度を増やす、吸気圧を上げる）せざるを得ず、組織破壊の悪化という悪循環に陥り、人工呼吸器離脱困難となる例も認められる。

慢性肺疾患の病因に関する検討は多数報告があり、妊娠中の感染、患児に対する酸素投与・過剰な吸気圧、水分負荷などが発症に寄与していると考えられている。慢性肺疾患の予防法に関する論文も多数認められており、一般的に上述のことを避けるべきであると記載されている。しかし、治療に関する論文は少なく、有効性が示されているものはステロイドホルモンの投与のみである。

肺 型上皮細胞は、肺胞領域に存在し、サーファクタントを産生する細胞である。様々な研究により、肺 型上皮細胞は、自己増殖能・I 型上皮細胞への分化能を有していることが明らかとなっている。また、損傷を受けた肺を修復するときに重要な役割を果たしていることが知られており、肺 型上皮細胞を補充することが出来れば、慢性肺疾患のような高度に障害を受けた肺の修復が容易になると推測される。

臍帯血には造血幹細胞が多数含まれており、現在では血液腫瘍患者の移植に数多く利用されている。

近年、臍帯血中の CD34 陽性細胞は血液幹細胞としての機能以外に、様々な実質臓器に分化可能であることが明らかになってきている。例えば

1) 臍帯血幹細胞を用いて血管内皮細胞の培養液を使用し培養すると血管内皮細胞に分化する

2) マウスを用いた臍帯血移植の実験では、移植後のマウスの肺組織中に移植した幹細胞から肺 型上皮細胞が分化する（長期には定着しないという報告

有り）。

といった結果が報告されている。その他にも *in vitro* で CD34 陽性造血幹細胞から、肝細胞、神経細胞、皮膚細胞など様々な組織細胞が分化することも近年報告されている。

現在、臍帯血は移植目的以外では、生下時の血液検査を行うときに採取するのみで、余剰な血液は破棄している。そこで今回、臍帯血幹細胞を慢性肺疾患の治療として利用可能であるかにつき、基礎的な検討を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臍帯血幹細胞が慢性肺疾患の治療に利用可能であるかにつき、基礎的検討を行うことである。

申請期間中に、正常新生児の臍帯血 CD34 陽性細胞が *in vitro* で肺 型肺上皮細胞に分化・増殖が可能であるか、を明らかにするものである

3. 研究の方法

凍結 CD34 陽性細胞は Cambrex 社より購入した。

37 water bath にて上記細胞を解凍後、BEGM を用いて洗浄、800rpm、15 分の遠心を 2 回行った。2 回目の洗浄、遠心後に上清を破棄し、BEGM5ml を加え細胞数、生細胞率を倒立顕微鏡下で測定した。

上記で得られた臍帯血 CD34 陽性細胞を
1) Matrigel で coat した well 培養 plate 上
または

2) 培養液上に浮遊させたフィルターメン
ブレン上

で培養した。培養液は気管支上皮細胞培地 (BEGM) に 5% 活性炭処理 FBS を最終濃度 0.25% となるように加えたものを使用し、37、5% 炭酸ガス下の条件で培養を行った。

BEGM 培地は2日に一度交換した。

臍帯血幹細胞から肺上皮細胞に分化する際の至適 KGF の濃度や、ステロイドホルモンの必要性について検討した。KGF の濃度、ステロイドホルモンの添加については結果に示す。

培養期間中、実体顕微鏡で細胞の増殖状態や細胞形態を観察した。また、培養液中のサーファクタント蛋白 A (SP-A) を ELISA 法にて定量した。

4 . 研究成果

1 パイアルから CD34 陽性細胞は 50×10^6 回収出来、生細胞率も 90 から 95% であった。

1well に 10×10^6 を使用した。

(1) Matrigel を用いた検討

まず、12well plate を用い、7 日間の培養を行った。

FGF-7 の濃度

0ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml。

ハイドロコルチゾン

無添加、10 μ g/ml 添加。

の条件で検討した。

FGF-7 の濃度、ハイドロコルチゾンの有無に関わらず細胞増殖が悪く、細胞の形態にも変化が認められなかった。培養液中にサーファクタント蛋白 A は検出されなかった。

細胞の密度が低く細胞相互作用が少ないのではないかと考え、24well plate での培養に変更、さらに、観察期間も 14 日に延長しもう一度検討し直した。FGF-7 濃度、ハイドロコルチゾンの有無に関しては、上記と同じ条件を用いた。

同条件下では細胞増殖は FGF-7 の投与量が多い方が良好な印象であったが、細胞の形態に変化は認められなかった。また、培養液を用いた検討では、FGF-7 の投与量、ステロイ

ドの投与の有無にかかわらず、SP-A の産生は認められなかった。

(2) フィルターメンブレンを用いた検討

(1) では分化した細胞が認められなかったため、2 年目はフィルターメンブレンを用いた気相液相境界面を利用して細胞培養を試みた (肺は空気と接する面であるため、同条件の方がより肺の環境に近いと考えた)。

(1) と同様、24well plate を用い、FGF-7 濃度、ハイドロコルチゾンの有無についても (1) と同様の条件を用いて細胞形態の観察、14 日後の培養液中のサーファクタント蛋白 A の定量を行った。

経過中細胞の形態に変化は認められず、培養液中の SP-A 濃度の測定を行ったが、どの条件下でも、SP-A の検出はなされなかった。

今回の検討では、肺型上皮細胞への分化は認められなかった。現在までに、臍帯血の CD34 陽性細胞のみから肺上皮細胞への分化を誘導する事が出来たという報告は存在しない。

培養条件を検討する必要があるが、既存の肺型上皮細胞初代培養条件では、CD34 陽性臍帯血細胞を肺型肺上皮細胞に分化誘導することは困難であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 2件)

北東 功、三輪 雅之、池田 一成
当院における AFD 超低出生体重児に対する積極的経静脈栄養の短期予後 日本周産期新生児学会雑誌 44(3)、955-957、2008.8

北東 功

最新! 新生児栄養管理ステップアップブック
実践編 疾患別の栄養管理 在胎 24 週未満の超低出生体重児の栄養管理
Neonatal care 2008 秋期増刊 241-244、2008.9

[学会発表](計 7件)

北東 功、三輪雅之、本間英和、倉辻言、松崎陽平、栗原伸芳、有光威志、池田一成
当院で生存退院した 400g 未満の児 4 例の栄養管理 Aggressive Nutrition の効果と合併症
第 53 回未熟児新生児学会総会、2008.11.1、札幌

栗原伸芳、三輪雅之、松崎陽平、北東功、池田一成

母体免疫抑制剤内服中の先天性サイトメガロウイルス感染症の一例

第 53 回未熟児新生児学会総会、2008.11.1、札幌

Miwa, Hokuto, Ikeda et al
Serum Steroid Profile in Newborn: Comparison between Term and Preterm Infant by Using Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry
2nd Congress of The European Academy of Pediatrics、2008.10.25、Nice

北東 功、三輪 雅之、池田 一成

当院における AFD 超低出生体重児に対する積極的経静脈栄養の短期予後
第 44 回周産期・新生児学会総会、2008.7.14、横浜

栗原伸芳、三輪雅之、松崎陽平、北東功、池田一成

血中ステロイドホルモン一斉測定による早産 AGA・SGA 児の副腎機能評価

第 44 回周産期・新生児学会総会、2008.7.14、横浜

Hokuto、Arimitsu、Ikeda et al

Expression of HGF receptor (c met) in experimental hypoplastic lungs

European Respiratory Society Annual Congress、2007.9.16、Stockholm

淵本康史、山田洋平、大野通暢、下島直樹、星野健、北東功、池田一成、森川康英

超低出生体重児腸穿孔における外科治療
第 45 回日本小児外科学会学術集会、2008.5.29、筑波

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北東 功 (HOKUTO ISAMU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00296625

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者