

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390392

研究課題名（和文） 臍帯血細胞移植による未熟肺血管床の発育に関する研究

研究課題名（英文） Human Umbilical Cord Blood-derived Mononuclear Cell Transplantation Improves Pulmonary Arterial Hypertension in Immunodeficiency Mouse

研究代表者：北川 哲也 (KITAGWA TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：80240886

研究成果の概要（和文）：経静脈的なヒト臍帯血細胞移植がモノクロタリン誘発肺高血圧マウス (BALB/c Slc: nu/nu) の肺高血圧を改善するか否か検討した。臍帯血細胞を $1 \times 10^7/0.25\text{ml}$ 濃度に調整し、CD34+細胞を 2.57% に増幅した。臍帯血細胞移植後の細小肺動脈形態、右室/左室心筋重量比及び肺動脈血流波形は臍帯血細胞移植群と臍帯血細胞+血漿成分輸血群では肺高血圧群より有意に改善したが、臍帯血血漿成分輸血群では改善しなかった。つまり、ヒト臍帯血移植により肺高血圧が改善するがその改善には血漿成分ではなく細胞そのものが必要であった。

研究成果の概要（英文）：**Backgrounds and Objectives.** The purpose of this study is to investigate whether human umbilical cord blood-derived mononuclear cell (hUCB-MNC) transplantation improves the development of pulmonary arterial hypertension (PAH) in monocrotaline (MCT)-treated mice. HUCB-MNC transplantation may have a new therapeutic potential for several congenital heart defects with primitive pulmonary vasculatures. **Methods.** MCT-induced PAH model was made using BALB/c Slc-nu immunodeficiency mouse. HUCB-MNCs were adjusted to $1 \times 10^7/0.25 \text{ mL}$ of concentration, and injected intravenously into those mice 4 weeks after MCT administration. The mice were divided into five groups: (1) vehicle-injected mice; (2) MCT-treated mice; (3) hUCB-MNC transplantation for PAH mice; (4) hUCB-MNC+plasma transplantation for PAH mice; (5) plasma transplantation for PAH mice. Assessment of PAH were performed by the ratio of right ventricular to ventricular septum plus left ventricular weight (RV/S+LV), medial thickness of small pulmonary arteries, and pulmonary acceleration time/ejection time (PAT/ET) of the main pulmonary artery by echocardiography. **Results.** RV/S+LV ratio, medial thickness of small pulmonary arteries and PAT/ET were significantly improved by hUCB-MNC transplantation with or without plasma, respectively. **Conclusions.** Our data shows that hUCB-MNC transplantation improves MCT-induced PAH and its efficacy is dependent on hUCB-MNCs themselves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：(1)臍帯血 (2)細胞移植 (3)未熟肺血管床

1・2. 研究の背景と目的

代表的低肺血流性先天性心臓病であるファロー四徴症(TF)においては、修復術施行年齢が高くなると、QOLの低下を来すとされる。我々は、近年、QOL改善のために、チアノーゼの早期解除がもたらす重要臓器機能、とくに高次脳神経機能と精神運動機能の健全発達を期待して、修復術を可及的早期に行ってきた(Kitagawa T, et al. Technique for constructing the pulmonary trunk for tetralogy of Fallot with pulmonary atresia. Ann Thorac Surg 59: 1245-1248, 1995)。TFの乳児期早期修復術の治療成績は良好であるが、術後管理に難渋することもあり、今後、チアノーゼの早期解除が遠隔期の高次機能と精神運動発達に及ぼす成果についての検討が待たれている(Kitagawa T, et al. Surgical management of symptomatic tetralogy of Fallot in early infancy. Jpn JTCVS 56: 237, 2008. 図1)。また、体肺側副血行路によって肺血流を供給される疾患群では、可及的早期に上下・左右の肺動脈の連続性を再建する統合手術を行うべきであるが、肺血管床の未熟性とサイズの問題からくる技術的困難性がある(Kitagawa T, et al. Surgical management of pulmonary atresia with VSD and MAPCAs. Ped Cardiol Card Surg 24: 338, 2008)。

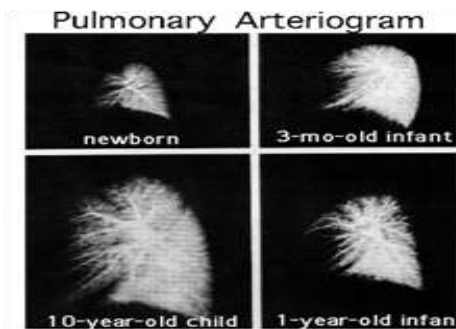
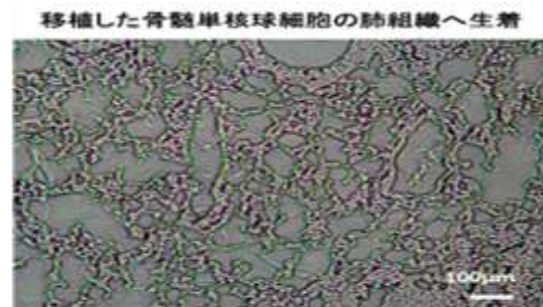
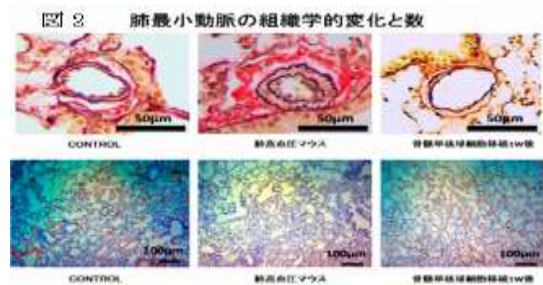


図1

一方、肺高血圧に対する血管新生療法は1997年に Isner らのグループにより VEGF 遺伝子の導入により開始され、その後、細胞治療の対象として基礎的研究が進められているが、その効果や血管新生機序に関しては未だ一定の結論に至っていない。そこで、我々はマウス monocrotaline 誘発肺高血圧モデルにおいて、経静脈的な同種骨髄単核球細胞移植が肺血管床の質的、量的な改善をもたらす、それが VEGF-VEGFR によるパラクリ

ン系を介する血管新生によって惹起され、結果として肺高血圧が改善すること、この治療的血管新生は肺血管床の増加によって肺循環を改善する有効な手段となる可能性があることを見出した(Yoshida H, Kitagawa T, et al. Syngeneic Bone Marrow Mononuclear Cells Improve Pulmonary Arterial Hypertension Through VEGF Upregulation. Ann Thorac Surg 2009; 88: 418-25 ; 図2~4)。



経静脈的に移植した蛍光でラベルした骨髄単核球細胞は、移植後3時間、24時間、1週間の肺組織には観察されなかった。

図3

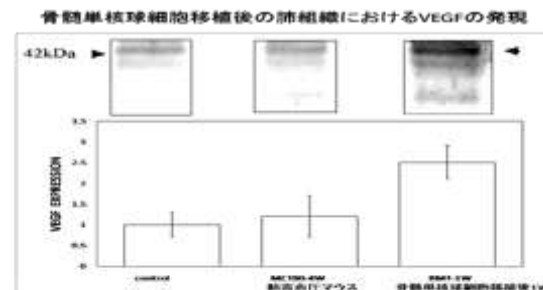


図4

このように、肺高血圧症に対する血管新生治療はこれまでに多方面から研究されてきたが、その効果と移植細胞の役割や血管新生機序については未だ明らかでない。そこで経静脈的なヒト臍帯血細胞移植が MCT 誘発肺高血圧モデルマウスにおいて肺高血圧を改

善するか否かについて研究し、以下の成果を得た。

1) 免疫欠損マウス(BALB/c Slc- nu/nu)において、monocrotaline 誘発肺血管閉塞性病変を作製し、経静脈的なヒト臍帯血細胞移植を行って、肺血管の新生、再生に伴って肺血管床が改善するか否か検討した。

2) 肺血管床改善効果が得られるならば、その機序について検討し、その効果が移植ドナー細胞に依存するか否か研究した。

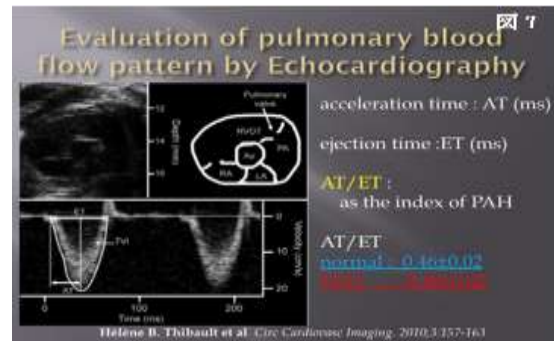
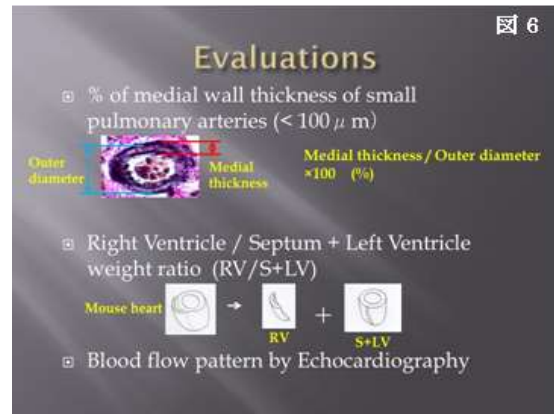
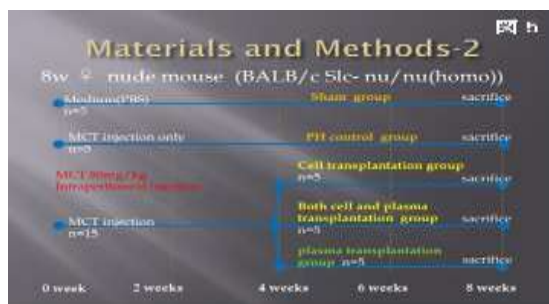
3) 分娩時に患児の自己臍帯血を採取し、分娩後の低肺血流性先天性心臓病の診断確定後に、自発呼吸が開始され肺血流量が増加しはじめた可及的 24 時間以内に臍帯血細胞移植を行い、未熟肺血管床をより発育させて低肺血流性心臓病の修復治療を有利にすることを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

前研究として、8 週齢 C57/BL6 マウスを用いて monocrotaline (MCT) 誘発肺高血圧病変を作製し、4 週後に経静脈的な同種骨髄単核球細胞移植により、VEGF の発現を介して、肺血管床の増加によって肺高血圧を改善することを明らかにしてきた。

そこで、まず、8 週齢免疫欠損マウス (BALB/c Slc- nu/nu) において、MCT 80mg/kg を腹腔内投与し、4 週後生存率は 80% 未満で、C57/BL6 マウスと同様の肺高血圧モデルを 90%-100% に作製できることを確認した。

同時に、本施設倫理委員会の承認を得、かつ本研究に対する同意を得た産婦の分娩時にヒト臍帯静脈血を採取した。同種骨髄単核球細胞移植による前研究をふまえて、肺血管床改善に効果的と思われる臍帯血単核球細胞濃度を $1 \times 10^7 / 0.25 \text{ml}$ に調整した。このヒト臍帯血細胞を免疫欠損肺高血圧マウスの眼窩静脈より移植し、その 4 週後を end point として、肺高血圧病変の改善が得られるか否か、心エコー法を用いた肺動脈血流波形の解析 (AT/ET: acceleration time/ejection time) と右室/左室心筋重量比から検討した。それぞれシャム群 (S 群)、肺高血圧コントロール群 (PH 群)、臍帯血細胞移植群 (C 群)、臍帯血血漿移植群 (P 群)、臍帯血細胞 + 血漿移植群 (A 群) の 5 群に分けて比較検討した。図 5~7)



4. 研究成果

目的とする異種移植実験のため、免疫欠損マウス BALB/c Slc- nu/nu (homo)、BALB/c Slc- nu/+ (hetero) を用いて、雌性 C57/BL6 マウスと同様に、monocrotaline 誘発肺血管閉塞性病変を有する肺高血圧モデルを作製し得た。

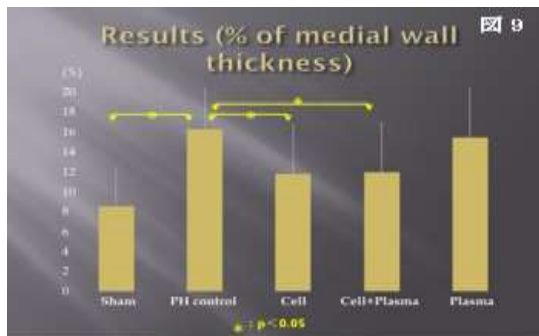
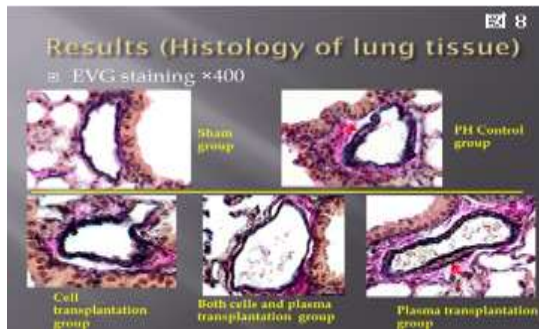
細胞移植後の肺高血圧病変の程度の評価法として、具体的に C57/BL6 マウス肺高血圧マウスに対する細胞移植から 4 週後の $100 \mu \text{m}$ 以下の細小肺動脈の中膜/外径比右室心筋重量比による評価とともに、マウス心エコー法で肺動脈血流波形を解析し、加速時間 acceleration time: AT (ms) と駆出時間 ejection time: ET (ms) の比 AT/ET から肺血管床評価が可能であることをみだした。

同時に、本研究に対する同意を得た産婦の分娩時に臍帯静脈血を採取し、CD34 陽性血管内皮前駆細胞を単核球細胞層より分離して、CD34 + 細胞の豊富な medium を作製し、肺血管の新生、再生に伴う肺血管床の改善が得られるか、上記方法により検討し、肺血管床改善に最も効率の良い細胞濃度、細胞数を $1 \times 10^7 / 0.25 \text{ml}$ に調整した。臍帯血の解析では CD34+、CD45+、CD133+ 前駆細胞は全体の 1.02% を占め、投与調整液 0.25ml 中では 2.57% に濃縮された。

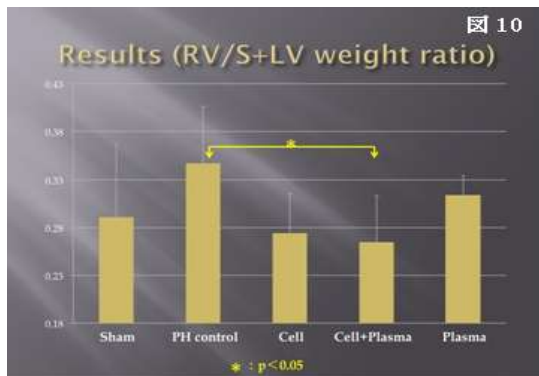
そして、8 週齢免疫欠損マウス (BALB/c Slc- nu/nu (homo)) 肺高血圧モデルに対してヒト臍帯血細胞を異種移植して、肺血管床の改善度を評価した。

その結果、臍帯血細胞移植 4 週後の細小肺

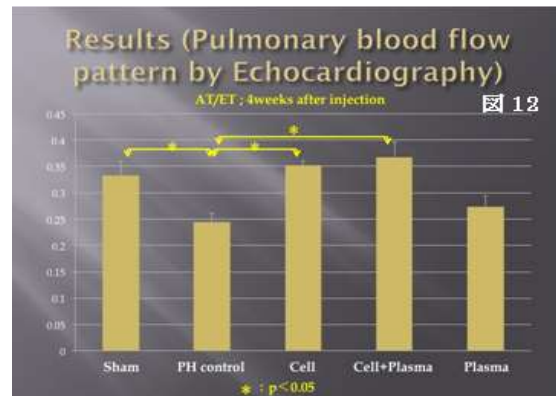
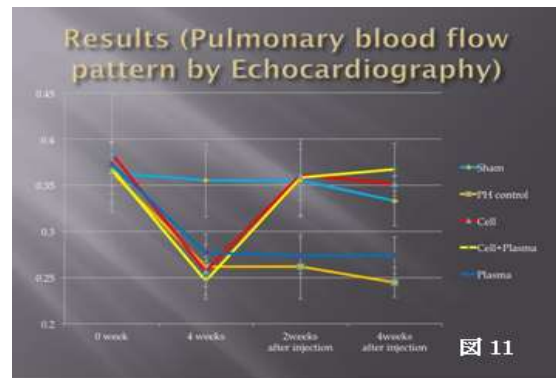
動脈の中膜/外径比は S 群 0.084 ± 0.035 、PH 群 0.159 ± 0.043 、C 群 0.115 ± 0.048 、P 群 0.151 ± 0.054 、A 群 0.117 ± 0.047 と、C 群と A 群では PH 群に対して有意に改善したが ($p < 0.05$)、P 群では改善しなかった (図 8, 9)。



右室/左室心筋重量比は S 群 0.245 ± 0.033 、PH 群 0.341 ± 0.036 、C 群 0.274 ± 0.041 、P 群 0.314 ± 0.021 、A 群 0.265 ± 0.048 と、C 群と A 群では PH 群に対して有意に改善したが ($p < 0.05$)、P 群では改善しなかった (図 10)。



AT/ET は S 群 0.363 ± 0.034 、PH 群 0.277 ± 0.009 、C 群 0.352 ± 0.008 、P 群 0.274 ± 0.009 及び A 群 0.367 ± 0.029 と、C 群と A 群では PH 群に対して有意に改善したが ($p < 0.05$)、P 群では改善しなかった (図 11, 12)。



つまり、臍帯血細胞投与群と臍帯血細胞＋血漿投与群でのみ、BALB/c Slc- nu/nu (homo) 肺高血圧モデルの肺高血圧病変が改善した。成熟肺血管床の改善には臍帯血細胞成分の移植が必要であった。

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 11 件)

1) Kanbara T, Kurobe T, Kitaichi T, Sugano M, Nakayama T, Kinoshita H, Iwase T, Akaike M, Abe M, Sata M, Matsumoto T, Kitagawa T.

Autologous Peripheral Blood-Derived Mononuclear Cells Induced by Erythropoietin Improve Critical Ischemic Limbs

Annals of Vascular Diseases.

2012;5(1):52-60 査読有

2) Sugano M, Kurobe H, Hirata Y, Nakagawa R, Yoshida H, Kitaichi T, Nakayama T, Kinoshita H, Motoki T, Kanbara T, Sugasawa N, Miki M, Maeda K, Sata M, Kitagawa T

Human cord-blood cell transplantation to monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in mice.

Gen Thorac Cardiovasc Surg, 59

Supplement, p213, 2011 査読有

3)Fujimoto E, Yoshizumi M, Kanbara T,
Kurobe H, Motoki T, Sugano M, Nakayama
T, Kitaichi T, Kitagawa T.

Functional restoration of endothelial cells
of the cryopreserved heart valve.

Gen Thorac Cardiovasc Surg. 2011

Mar;59(3):169-74. Epub 2011 Mar 30. 査読
有

4)Hirata Y, Kurobe H, Akaike M, Chikugo
F, Hori T, Bando Y, Nishio C, Nakaya Y,
Kitagawa T, Sata M.

Enhanced inflammation in epicardial fat in
patients with coronary artery disease.

Int Heart J. 2011;52(3):139-42. 査読有

5)Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T,
Akaike M, Nishio C, Higashida M,
Mikasa H, Nakaya Y, Takanashi S,
Igarashi T, Kitagawa T, Sata M.

Coronary atherosclerosis is associated with
macrophage polarization in epicardial
adipose tissue.

J Am Coll Cardiol. 2011 Jul

12;58(3):248-55 査読有

6)Kurobe H, Aihara K, Higashida M,
Hirata Y, Nishiya M, Matsuoka Y, Kanbara
T, Nakayama T, Kinoshita H, Sugano M,
Fujimoto E, Kurobe A, Sugawara N,
Kitaichi T, Akaike M, Sata M, Matsumoto
T, Kitagawa T.

Ezetimibe monotherapy ameliorates

vascular function in patients with
hypercholesterolemia through decreasing
oxidative stress.

J Atheroscler Thromb. 2011;18(12):1080-9.

Epub 2011 Oct 26. 査読有

7)Matsui N, Nakane S, Saito F, Ohigashi I,
Nakagawa Y, Kurobe H, Takizawa H,
Mitsui T, Kondo K, Kitagawa T, Takahama
Y, Kaji R

Undiminished regulatory T cells in the
thymus of patients with myasthenia
gravis.

Neurology. 2010 Mar 9;74(10):816-20. 査読
有

8)Kitagawa T, Kitaichi T, Yoshida H

LETTERS TO THE EDITOR: Optimal
surgical approach for repair of
aortopulmonary window with aortic origin
the right pulmonary artery

J Thorac Cardiovasc Surg

139(1):238-239,2010 査読有

9)Hayabuchi Y, Inoue M, Watanabe N,
Sakata M, Nabo MM, Kitagawa T, Kitaichi
T, Kagami S

Assessment of systemic-pulmonary
collateral arteries in children with cyanotic
congenital heart disease using
multidetector-row computed tomography:

Comparison with conventional

Int J Cardiol 138(3):266-271,2010 査読有

10)Kurobe H, Urata M, Ueno M, Ono S,
Izawa-Ishizawa Y, Fukuhara Y, Gukuhara
Y, Yu L, Ripen AM, Kanbara T, Aihara K,
Ishizawa K, Akaike M, Gonzalez FJ,

Tamaki T, Takahama Y, Yoshizumi M,
Kitagawa T, Tomita S.

Role of Hif-1 α in T cells as a negative
regulator in development of vascular
remodeling

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular
Biology 30(2):210-7, 2010 査読有

11) Yoshida H, Kitaichi T, Urata M, Kurobe
H, Kanbara T, Motoki T, Kitagawa T

Syngeneic bone marrow mononuclear cells
improve pulmonary arterial hypertension
through vascular endothelial growth factor
upregulation.

Annals of Thoracic Surgery 88(2): 418-24,
2009 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1) 第 64 回日本胸部外科学会定期学術集会
(2011 年 10 月 9 日-12 日 名古屋)

肺高血圧症に対するヒト臍帯血細胞移植治
療の可能性

菅野幹雄、黒部裕嗣、平田陽一郎、中川竜二、
吉田 誉、北市 隆、中山泰介、木下 肇、
元木達夫、神原 保、菅澤典子、三木美枝、
前田和寿、佐田政隆、北川哲也

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 哲也 (KITAGAWA TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：80240886

(2) 研究分担者

北市 隆 (KITAICHI TAKASHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：20335813

中川 竜二 (NAKAGAWA RYUJI)

徳島大学・病院・助教
研究者番号：10403685

前田 和寿 (MAEDA KAZUTOSHI)

徳島大学・病院・准教授
研究者番号：30294680

菅野 幹雄 (SUGANO MIKIO)

徳島大学・病院・特任助教
研究者番号：70563807

神原 保 (KANBARA TAMOTSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：20380082
(H23 研究分担者)

黒部 裕嗣 (KUROBE HIROTSUGU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：30380083

吉田 誉 (YOSHIDA HOMARE)

徳島大学・病院・助教
研究者番号：50448338

(H21 研究分担者)