

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792031

研究課題名(和文) 自家間葉系幹細胞を用いた先天性横隔膜ヘルニアの低形成肺に対する再生医療

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell transplantation in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model

研究代表者

永田 公二 (Nagata, Kouji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20419568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔の横隔膜欠損を確認したものをCDH群とした。間葉系幹細胞を採取し、母獣の子宮静脈内に注射し、胎仔の横隔膜欠損を確認したものをMSC投与-CDH群とした。MSC投与-CDH群では、CDH群と比較して肺胞中隔や末梢肺動脈の中膜径の有意な菲薄化を認めた。また、MSC投与-CDH群では、CDH群と比較して肺胞面積は拡張していた。MSC投与によってCDHの低形成肺が成熟した可能性があるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the efficacy of MSCs in a nitrofen-induced CDH rat model. Pregnant rats were exposed to nitrofen on E9.5. MSCs were isolated from the eGFP transgenic rat lungs. The MSCs were transplanted into the nitrofen-induced E12.5 rats via the uterine vein, and the E21 lung explants were harvested. The study animals were divided into three: the control group, the CDH group, and the MSC-treated CDH group. The specimens were morphologically analyzed using HE and immunohistochemical staining. The alveolar and medial walls of the pulmonary arteries were significantly thinner in the MSC-treated CDH group than in the CDH group. The alveolar air space areas were larger than in the CDH group. MSC transplantation potentially promotes alveolar and pulmonary artery development, thereby reducing the severity of pulmonary hypoplasia.

研究分野：小児外科学

科研費の分科・細目：肺低形成

キーワード：再生医療 細胞治療 間葉系幹細胞 肺低形成

### 1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニアは小児外科領域では比較的予後不良な疾患であり、未だ生存率は約 80%に満たない。予後を規定する病因は、肺胞と肺血管の未熟性に伴う新生児遷延性肺高血圧症である。これらの発生的問題点を克服するため、今日、動物実験でその効果が実証されてきた FETO が臨床応用され、欧州・北米を中心とする TOTAL trial が実施されているが、未だ重症例に対する有効性を確認するには至らない。

一方、最近の再生医療の進歩に伴い、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞の臨床応用も現実味を帯びてきている。我々が関与する先天性疾患や形態異常を持つ疾患領域では、気管などの形態的な役割を担う臓器において、細胞治療と細胞工学を組み合わせた方法により臓器を再生した報告も認められるようになってきている。

しかしながら、細胞を分化・制御して移植する方法は、複雑な形態と機能を有する高次器官においては困難である。そこで今回の研究では、幹細胞をそのまま移植し、分化は生体内に委ねる方法が最も簡便で適切であると考えた。

胚性幹細胞や人工多能性幹細胞は、多分化能を有するが、長期投与における安全性や免疫の問題があるため、免疫寛容を有すると言われている間葉系幹細胞を胎児の骨髄から採取して抽出し、肺に投与する計画とした。

実験経過において、胎児骨髄からの間葉系幹細胞の採取は困難を極めたため、母獣肺から間葉系幹細胞を採取し、胎児期に母獣に投与することで胎児肺の低形成肺が改善するかを検討した。

### 2. 研究の目的

この研究の目的は、間葉系幹細胞を胎児期に投与する事によって、ニトロフェン投与先天性横隔膜ヘルニアモデルラットの低形成肺が改善を示すか否かと検討する事が、研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(実験モデル動物作成と実験方法)

胎生 9.5 日目に 100mg のニトロフェンをオリーブオイル 1ml に溶解し、母獣の胃内に投与し、胎生 21 日目に母獣を犠死せしめ、胎仔の横隔膜欠損を確認したものを横隔膜ヘルニアモデルラット (CDH 群) とした。

コントロール群 (Control 群) として、胎生 9.5 日目に母獣の胃内にオリーブオイル 1ml を入れたものをコントロール群とした。

eGFP 成獣ラット肺から間葉系幹細胞を採取し、培養、増殖させた。間葉系幹細胞の確認は、細胞培養により多分化能を有することを

確認すること、フローサイトメトリーで細胞表面マーカーを確認すること、細胞を染色することで確認を行った。

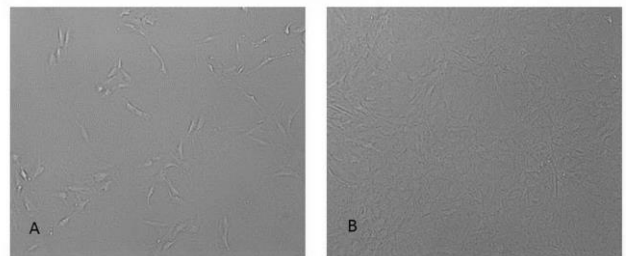
胎生 12.5 日目に母獣を開腹し、母獣の子宮静脈内に間葉系幹細胞を注射した後に閉創し、胎生 21 日目に母獣を犠死せしめ、胎仔の横隔膜欠損を確認したものを間葉系幹細胞投与・横隔膜ヘルニアモデルラット (MSC 投与・CDH 群) とし、コントロール群、CDH 群、MSC 投与 CDH 群として 3 群に分類した。3 群の胎仔から摘出した肺をヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E. 染色)、抗 PCNA 抗体、抗 Sp-C 抗体、抗  $\alpha$ -SMA 抗体を用いた免疫染色を行い、形態的評価を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 間葉系幹細胞の形態と特徴

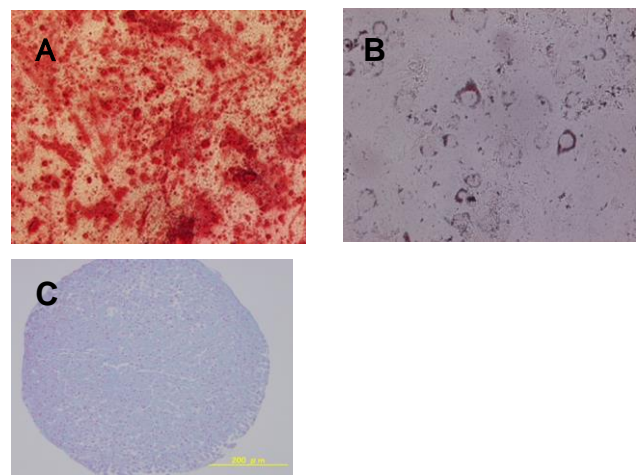
eGFP 成獣ラット肺から抽出した間葉系幹細胞をカルチャーディッシュに散布した。細胞は紡錘形を呈しており、線維芽細胞のような形態であった。(Figure1-A) 加えて、細胞はカルチャーディッシュに接着し、ディッシュ内でコロニーを形成し、増殖した。(Fig. 1b).

Figure1.



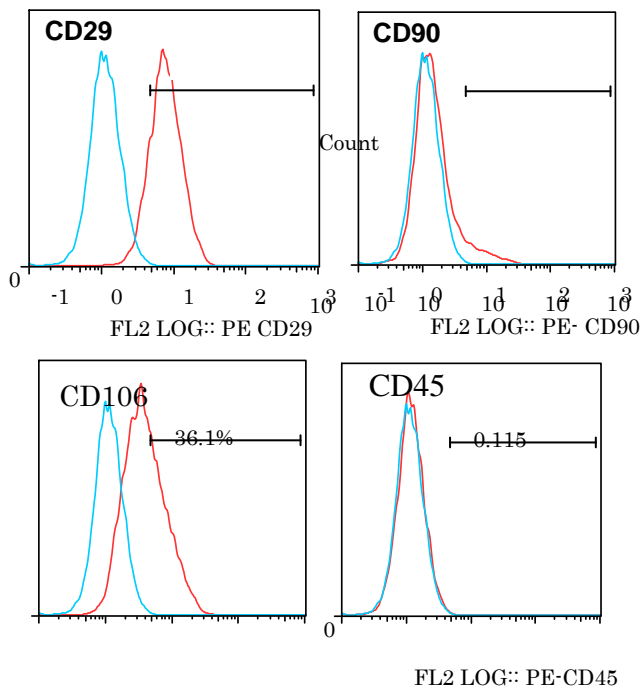
Passage 3 の MSC 培養経過では、単形性外観し、細胞は骨芽細胞、脂肪芽細胞、軟骨芽細胞へと分化した。骨芽細胞は Alizarin Red 染色 (Figure2-A)、脂肪芽細胞は Oil Red O 染色 (Figure2-B)、軟骨芽細胞は Alcian blue 染色 (Figure2-C) で確認した。

Figure2.



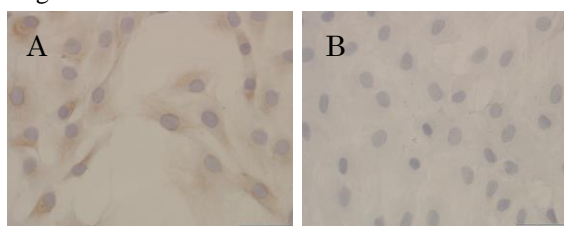
さらにフローサイトメトリーにおいて、各種細胞表面マーカー（CD29、CD90、CD106、CD45）に関する解析を行った結果、CD29、CD106 に関しては陽性、CD90、CD45 に関しては陰性の結果が出た。(Figure3)

Figure3.



また、抗 vimentin 抗体と抗  $\alpha$ -SMA 抗体にて細胞染色を行った結果、vimentin に陽性であり (Figure4-A)、 $\alpha$ -SMA に陰性の結果が得られた。(Figure4-B)

Figure4.



これらの結果から、ラット成獣肺から抽出された幹細胞が、鑑別を必要とする繊維芽細胞や骨髄幹細胞ではなく、多分化能を有する間葉系幹細胞であることが示された。

## 2) 肺胞間質の評価

コントロール群、CDH 群、MSC-投与 CDH 群に分類し、各々を H.E.染色によって形態学的評価を行った。

MSC 投与-CDH 群では、CDH 群と比較して肺胞中隔壁長において有意な菲薄化を認めた。また、MSC 投与-CDH 群では、CDH 群と比較して肺胞面積において有意な拡張を認めた。(Figure5, Table1)

Figure5

A: control  
B:CDH  
C:MSC 投与-CDH

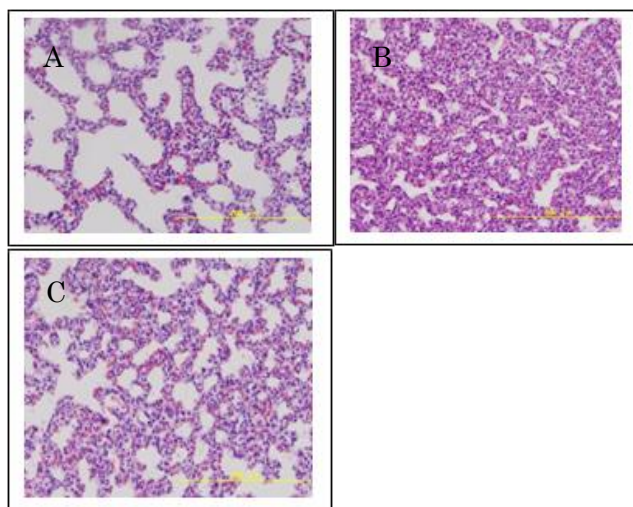


Table1.

Morphological Assessment	Control	CDH	MSC-treated CDH
Alveolar wall thickness ( $\mu\text{m}$ )	7.81 $\mu\text{m}$ (7.18-8.58)	10.84 $\mu\text{m}$ (9.85-12.08)*	8.77 $\mu\text{m}$ (7.91-9.61)**
Alveolar air space area ( $\text{mm}^2/\text{field}$ )	0.056 $\text{mm}^2$ (0.053-0.061)	0.028 $\text{mm}^2$ (0.026-0.032)*	0.041 $\text{mm}^2$ (0.038-0.046)**

また、PCNA, Sp-C,  $\alpha$ -SMA を用いて免疫染色を行った。(Figure6) MSC 治療 CDH 群と CDH 群を比較したところ、MSC 治療 CDH 群において PCNA 陽性細胞 (Figure7-A) や Sp-C 陽性細胞 (Figure7-B) が有意に多かった。 $\alpha$ -SMA を用いて肺血管を染色し、MSC 治療 CDH 群と CDH 群を比較したところ、MSC 治療 CDH 群において中膜の菲薄化を認めた。(Figure7-C)

Figure6

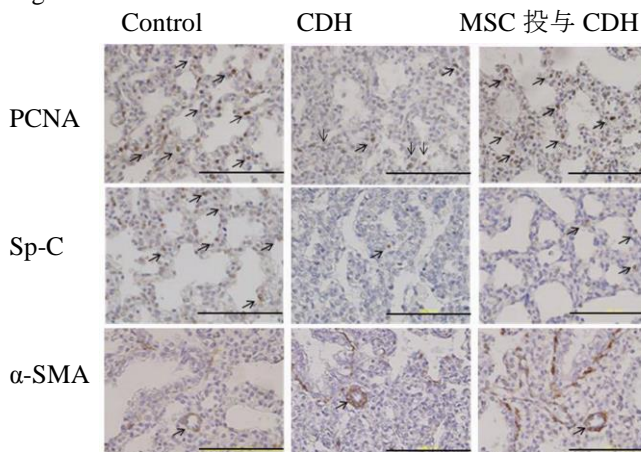


Figure7-A  
PCNA 陽性細胞  
の比較

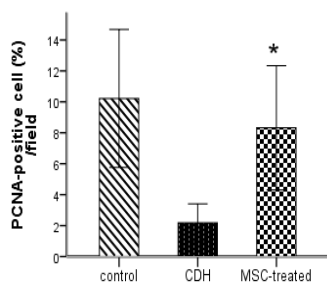


Figure7-B  
Sp-C 陽性細胞  
の比較

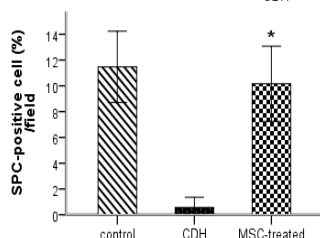
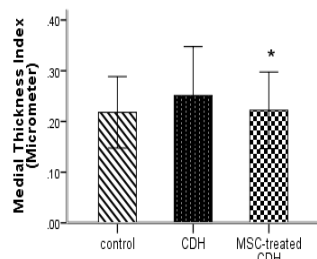


Figure7-C  
肺血管径の比較



以上の結果より、ラット母獣肺から採取した間葉系幹細胞を胎児期に母獣に投与したところ、ニトロフェン投与 CDH モデルラットの肺低形成は肺胞の成熟と肺血管径において改善を示したことが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

1. Ratih Y, Nagata K, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell transplantation in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Pediatr Surg Int*. accept
2. Nagata K, Usui N, Kanamori Y, Takahashi S, Hayakawa M, Okuyama H, Inamura N, Fujino Y, Taguchi T. The current profile and outcome of congenital diaphragmatic hernia: A nationwide survey in Japan. *J Pediatr Surg* (2013) 48: 738-744
3. Hayakawa M, Ito M, Hattori T, Kanamori Y, Okuyama H, Inamura N, Takahashi S, Nagata K, Taguchi T, Usui N. The effect of hospital volume on the mortality of congenital diaphragmatic hernia in Japan. *Pediatr Int* (2013) 55(2): 190-196
4. Usui N, Okuyama H, Kanamori Y, Nagata K, Hayakawa M, Inamura N, Takahashi S, Taguchi T. The lung to thorax transverse area ratio has a linear correlation with the observed to expected lung area to head circumference ratio in fetuses with congenital diaphragmatic hernias. *J Pediatr*

*Surg* (2014)

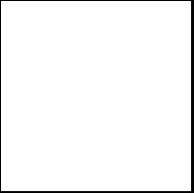
5. Shiono N, Inamura N, Takahashi S, Nagata K, Fujino F, Hayakawa M, Usui N, Okuyama H, Kanamori Y, Taguchi T, Minakami H. The outcome of patients with congenital diaphragmatic hernia and having indications for a Fontan operation: Results of a national survey in Japan. *Pediatr Surg Int* (2014) Accept In press
6. 永田公二、他. 長期中心静脈カテーテル管理中の微量元素欠乏症(銅、亜鉛、セレンなど) (小児外科 45.(4),2013:442-446)
7. 木下義晶、手柴理沙、江角元史郎、永田公二、田口智章. 当科における腹壁破裂の治療戦略 日本周産期・新生児医学会雑誌 49(1): 40-42, 2013

〔学会発表〕 (計 13 件)

1. 第 43 回日本小児消化管機能研究会「先天性横隔膜ヘルニア術後 GER が 成長発達に与える影響に関する検討」(2/9 久留米)
2. 第 38 回九州代謝栄養研究会「小児在宅静脈栄養患者に対する多職種連携の取り組み」(3/9 in 福岡)
3. 第 24 回日本小腸移植研究会「当科における超短腸症候群の栄養管理の実際/腸管機能不全長期生存例の問題点」(3/16 福岡)
4. PAPS2103 「The intact discharge predictors and associated risk of mortality and morbidity in neonates with isolated left CDH.- A report from a nationwide survey in Japan-」(4/8 Australia, Hunter Valley)
5. 第 113 回外科学会定期学術集会「新生児外科疾患における intact survival を目指した治療戦略」(4/12 福岡)
6. 第 50 回日本小児外科学会「当科における超短腸症候群の栄養管理の実際」「九州地区における先天性食道閉鎖症 100 例の現況と生命予後」(5/31,6/1 in 横浜)
7. CDH Workshop 2013 「The current profile and outcome of congenital diaphragmatic hernia: the nationwide survey in Japan」(6/14 Netherland, Rotterdam)
8. 第 40 回外科代謝栄養学会「当科における超短腸症候群の栄養管理」(7/4 in 東京)
9. 第 48 回日本周産期新生児学会「出生前診断された CDH に対する当科標準治療プロトコール確立への取り組み」(7/15 横浜)
10. 第 43 回小児外科代謝研究会「腸管壁内気腫を呈した短腸症候群の 1 例」(10/24 東京)
11. 第 24 回小児呼吸器外科研究会「小児嚢胞性肺疾患術後の Re-do Surgery」(10/25 東京)
12. 第 30 回日本小児栄養消化器肝臓学会「A case report of hypophosphatemic and hypomagnesemic osteomalacia induced by the prolonged course of the hypoganglionosis.」(11/2 in 東京)
13. 第 11 回日本胎児治療学会「新生児横隔膜ヘルニア研究班における治療プロトコール作成に向けた取り組み」(11/17 東京)

〔図書〕 (計 件)

なし。



〔産業財産権〕

なし。

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(永田公二)

研究者番号：20419568

(2) 研究分担者

なし。