

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390331

研究課題名(和文) 出生後早期の臍帯血細胞移植による未熟肺血管床発育動態に関する研究

研究課題名(英文) Effects of Transplanted Human Cord Blood-Mononuclear Cells on Pulmonary Hypertension in Immunodeficient Mice and Their Distribution

研究代表者

北川 哲也 (KITAGAWA, Tetsuya)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：80240886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧マウスにヒト臍帯血細胞を移植すると、肺高血圧症が改善した。その効果発現にはヒト臍帯血の血清成分ではなく移植細胞自体が必要であった。CMTMRでラベルした臍帯血細胞は肺内蛍光は移植3時間後まで徐々に減少するが、肺小動脈内皮細胞の近傍に検出された。IVIS imagingを用いてヒト臍帯血単核球細胞を追跡すると、肺高血圧マウス群において、臍帯血投与24時間後の体内臓器分布、特に肺組織への局在が他臓器よりも強く観察された。

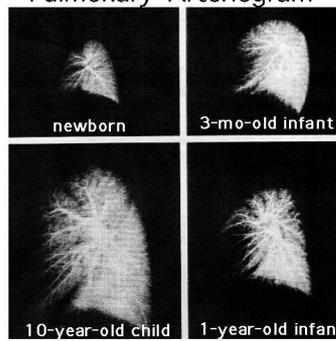
研究成果の概要(英文)：Objectives: To investigate the effects of human umbilical cord blood-derived mononuclear cell (hUCB-MNC) transplantation on pulmonary hypertension (PH) induced by monocrotaline (MCT) in immunodeficient mice and their distribution. Methods: Fresh hUCB-MNCs harvested from a human donor after her delivery were injected intravenously into those PH mice (BALB/c Slc-nu/nu) 4 weeks after MCT induction. To reveal the incorporation into the lung, CMTMR-labeled hUCB-MNCs were observed in the lung. DiR-labeled hUCB-MNCs were detected in the lung and other organs by bioimaging. Results: PH was significantly improved 4 weeks after hUCB-MNC transplantation. CMTMR-positive hUCB-MNCs were observed in the lung 3 hours after transplantation. Bioluminescence signals were detected more strongly in the lung than in other organs for 24 hours after transplantation. Conclusions: The results indicate that hUCB-MNCs are incorporated into the lung early after hUCB-MNC transplantation and improve MCT-induced PH.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：臍帯血 細胞移植 未熟肺血管床

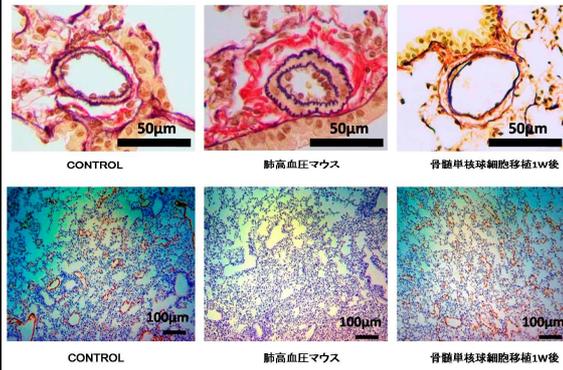
1. 研究開始当初の背景

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

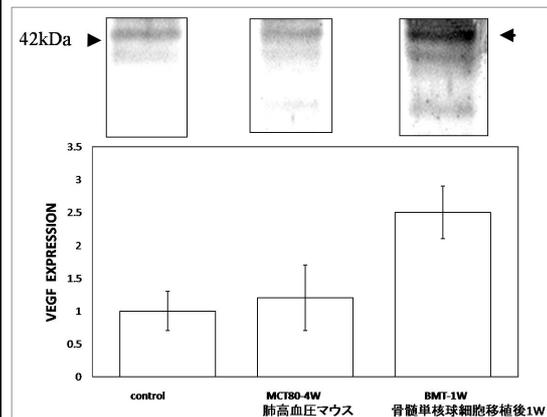


(Kitagawa T. Technique for constructing the pulmonary trunk for TF with pulmonary atresia. *Ann Thorac Surg* 59: 1245-8, 1995)。TFの乳児期早期修復術の治療成績は良好であるが、術後管理に難渋することもあり、今後、チアノーゼの早期解除が遠隔期の高次機能と精神運動発達に及ぼす成果についての検討が待たれている(Kitagawa T. Surgical management of symptomatic TF in early infancy. *Jpn JTCVS* 56: 237, 2008)。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. Surgical management of pulmonary atresia with VSD and MAPCAs. *Ped Cardiol Card Surg* 24: 338, 2008)。一方、肺に対する血管新生療法は1997年にIsnerらのVEGF遺伝子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し、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し、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(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, 3)。

肺最小動脈の組織学的変化と数 図2



骨髄単核球細胞移植後の肺組織におけるVEGFの発現 図3



また、近年、難治性の神経疾患であるALSマウスモデルにヒト臍帯血細胞移植をすると、ALSの進行が抑制され、寿命が延びることが確認された(Sanberg P, et al. 2008)。

以上から、動脈管及びその他の側副路に肺血流量を依存する低肺血流性先天性心臓病では、胎児心エコー検査で妊娠16-18週の時期に胎内診断が可能である。出生前診断の意義は大きく、診断が確定されれば、包括的な治療が可能な第3次施設に母体搬送し、分娩直後より患児に対して系統的な治療を開始することができる。

このような経緯から、神経細胞や上皮細胞など、より広範な組織への多分化能を有する血管内皮前駆細胞を有するとされる臍帯血細胞移植により、肺血管床を改善させる研究を想起した。

2. 研究の目的

“出生後早期の臍帯血細胞移植による未熟肺血管床発育動態に関する研究”を行った。(1) 分娩時に低肺血流性先天性心臓病患児の自己臍帯血を採取し、分娩後の診断確定後、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時間以内に静脈管から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する。

(2) 本研究では、まず、肺高血圧モデルマウ

スの傷害された肺血管床が臍帯血細胞移植や骨髄幹細胞移植により同程度に改善するか研究した。

(3) その肺血管床改善効果の機序について、経静脈的に移植した臍帯血細胞あるいは骨髄幹細胞の行方と役割について明らかにする。

本研究期間内に 雌性免疫欠損マウス左肺切除モデルに対する経静脈的なヒト臍帯血細胞移植が、野生型マウス左肺切除モデルに対する同系統骨髄幹細胞移植より、同数の単核球数なら、どちらがより肺血管の新生、再生に伴って肺血管床を改善するか明らかにする。その経静脈的に移植した臍帯血細胞あるいは骨髄幹細胞の行方と体内動態を追跡し、肺血管床改善効果の機序について検討し、移植細胞の役割とパラクライン効果等の効率について明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 経静脈的なヒト臍帯血細胞移植がモノクロタリン(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検討した。

8週齢の雌性 C57/BL6 野生型マウスを気管内挿管下に人工呼吸器に装着し、左肺切除モデル作りを行った。しかし、安定した生存率を得られず、ヒト臍帯血細胞移植のレシピエントとして用いるには技術的な困難さがあった。そこで、本研究の肺血管床減少性レシピエント動物モデルとしては、モノクロタリン(MCT)誘発肺高血圧モデルマウスを用いることとした。

MCT 40-160 mg/kg のマウス腹腔内単回投与により、マウス肺高血圧モデル作製可否の検討を行うと、80 mg/kg 以上の腹腔内単回投与により肺高血圧モデルを作製し得た。MCT による肝毒性を考慮すると、より低濃度の 80 mg/kg (腹腔内投与) が肺高血圧モデルマウス作製に適していると判断した。

8週齢免疫欠損マウス(BALB/c Slc-nu/nu)においても、MCT 80 mg/kg を腹腔内投与し、4週後に C57/BL6 マウスと同様の肺高血圧モデルを作製し得た。本施設倫理委員会の承認を得、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、我々の前研究の結果から肺血管床改善に効果的と思われる細胞濃度 $1 \times 10^7/0.25 \text{ ml}$ 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に眼窩静脈から経静脈的に移植し、4週後に肺高血圧の改善が得られるか否か、経時的な、肺血管(小動脈から肺胞毛細血管)と肺胞の発育に伴う肺血管床の改善度について、肺小動脈数($<100 \mu\text{m}$)、肺小動脈($<100 \mu\text{m}$)中膜肥厚度(中膜厚/血管径: %medial thickness)と、マウス心エコー法による肺動脈血流波形の加速時間 acceleration time: AT (msec) と駆出時間 ejection time: ET(msec)の比 AT/ET、ならびに右室/左室心筋重量比 RV/(LV+S)から評価した。それぞれシ

ヤム群(S群)(n=10)、肺高血圧コントロール群(PH群)(n=10)、臍帯血細胞移植群(C群)(n=10)、臍帯血漿移植群(P群)(n=10)、臍帯血細胞+血漿移植群(A群)(n=10)の5群で比較検討した。

(2) 移植細胞の追跡: マウス体内動態について

血管新生のために動員された細胞の起源を特定する研究を行った。細胞移植後の肺組織標本をヒト抗体で免疫染色することにより、ドナー細胞がどの程度の比率でレシピエント肺血管床の改善に関与しているか検討した。

ヒト臍帯血細胞を Di-I(カルボシアニン蛍光: Molecular probes, Eugene, OR)にてラベルし、その臍帯血投与 10 分後、30 分後、1 時間後、3 時間後と経時的にレシピエントマウス肺内での移植臍帯血細胞の存在、動態(viability, activity)を確認した。また、バイオイメージング法や RT-PCR 法にて肺組織内で血管新生のために動員された細胞の起源を特定する研究を行っている。

移植したヒト臍帯血細胞の体内動態と分布を見るため、蛍光標識したヒト臍帯血単核球細胞を IVIS imaging を用いて追跡した。臍帯血を投与したモノクロタリン肺高血圧マウスと投与しない肺高血圧マウス群において、それぞれ臍帯血投与 10 分後、30 分後、1 時間後、3 時間後、6 時間後及び 24 時間後の体内臓器分布、特に肺組織への局在について多角的に追跡研究した。

(3) 肺内の血管新生因子発現の遺伝学的検索

マウスモデル作製前、完成時、細胞移植 2 週後、4 週後と各群のマウス肺を摘出し、液体窒素にて急速冷凍後、ホモゲネイトし、VEGF の遺伝子発現をウエスタンブロッティング法により測定した。

4. 研究成果

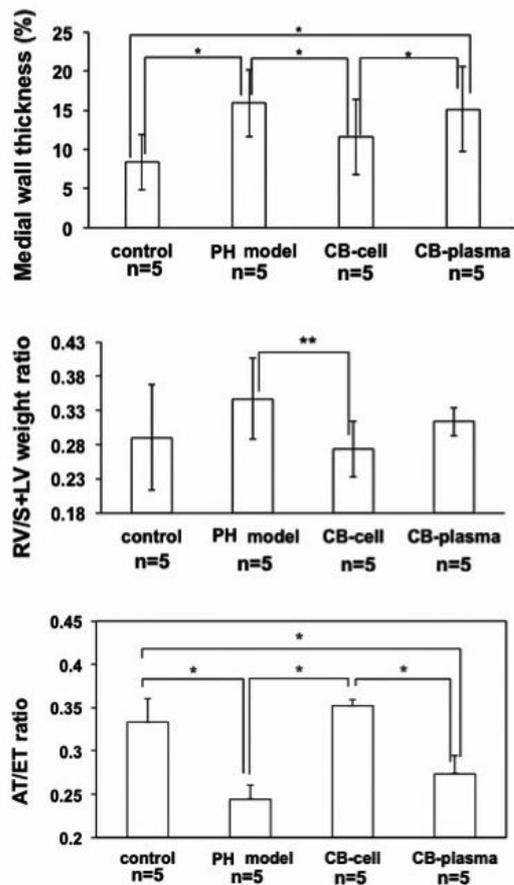
(1) 経静脈的なヒト臍帯血細胞移植がモノクロタリン(MCT)誘発肺高血圧モデルマウスにおいて肺高血圧を改善するか否かについて

ヒト臍帯血の解析では、CD34+、CD45+、CD133+前駆細胞は全体の1.02%を占め、投与調整液としては2.57%濃縮液を用いた。

臍帯血細胞移植4週後の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群では改善しなかった。また、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群では改善しなかった。MCT誘発免疫欠損

肺高血圧マウスでは、ヒト臍帯血細胞移植により肺高血圧が改善し、その改善には臍帯血中の血漿成分ではなく細胞そのものが必要であった。マウスにヒト臍帯血細胞を眼窩静脈より移植すると、肺高血圧症を改善し得た。その効果発現にはヒト臍帯血の血清成分ではなく移植細胞自体が必要であった。

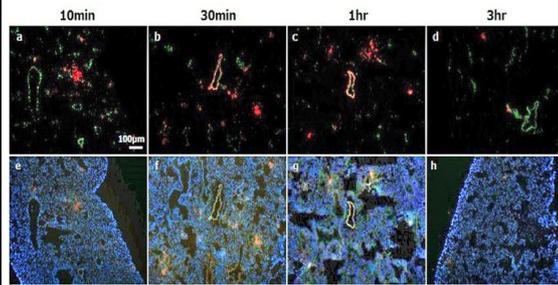
要約すると、8週齢免疫欠損マウス(BALB/c Slc-nu/nu(homo))のmonocrotaline誘発肺高血圧モデルにヒト臍帯血細胞を異種移植すると、肺血管床が改善し、その効果発現には血清成分ではなく臍帯血細胞自体が必要であることを証明した (Kitagawa T. Human cord blood cell transplantation to monocrotaline-induced PAH in mice. *Jpn JTCVS* 59: 213, 2011)。



(2) 経静脈的に移植した臍帯血細胞あるいは骨髄幹細胞の行方と役割について

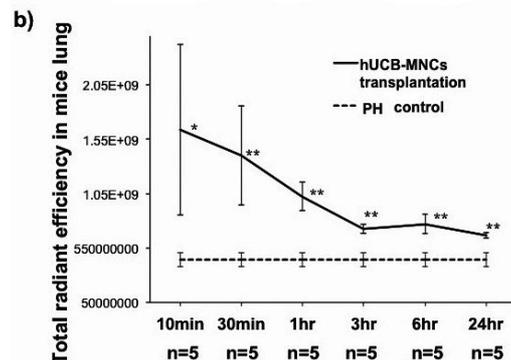
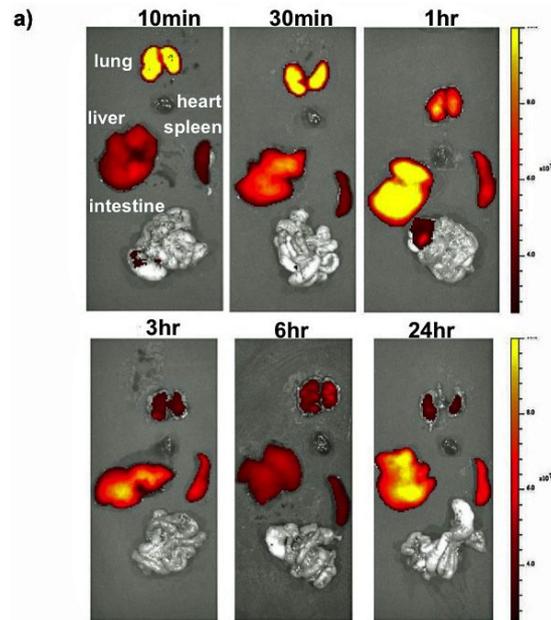
我々のこれまでの研究では、骨髄単核球細胞移植 3時間後、24時間後および 7日後において移植細胞を肺内で検索したが、いずれの標本にも移植骨髄細胞の蛍光を確認できなかった。本研究ではヒト臍帯血細胞をDi-I (カルボシアニン蛍光) にてラベルして移植して、10分後、30分後、3時間後とマウス肺内の蛍光を探索した。すると、徐々にマウス肺内の

蛍光は減少するが、移植細胞は肺小動脈内皮細胞の近傍に検出された。



(3) 移植したヒト臍帯血細胞の体内動態と分布

移植したヒト臍帯血細胞の体内動態と分布を見るため、蛍光標識したヒト臍帯血単核球細胞を IVIS imaging を用いて追跡した。臍帯血を投与した肺高血圧マウスと投与しない肺高血圧マウス群において、それぞれ臍帯血投与 10 分後、30 分後、1 時間後、3 時間後、6 時間後及び 24 時間後の体内臓器分布、特に肺組織への局在が他臓器よりも強く観察された。



(4) 肺組織の RT-PCR では、臍帯血中単核球注射後肺内の VEGF 及び VEGF-R の遺伝子発現の低下が一時的に認められた。肺組織の

RT-PCR では、臍帯血中単核球注射後肺内の VEGF 及び VEGF-R の遺伝子発現の低下が一時的に認められた。

研究の要約と意義

“ 出生後早期の臍帯血細胞移植による未熟肺血管床発育動態に関する基礎研究 ” を施行し、以下の結果を得た。

CMTMR でラベルしたヒト臍帯血細胞をマウスに移植し、マウス肺小動脈の近傍に着床して活動しているか、移植 10 分後、30 分後、3 時間後の肺組織を vWF 等で免疫組織染色した。CMTMR でラベルした細胞の肺内の蛍光は徐々に減少するが、肺小動脈内皮細胞の近傍に検出された。

肺組織の RT-PCR では、臍帯血中単核球注射後肺内の VEGF 及び VEGF-R の遺伝子発現の低下が一時的に認められた。

移植したヒト臍帯血細胞の体内動態と分布を見るため、蛍光標識したヒト臍帯血単核球細胞を IVIS imaging を用いて追跡した。臍帯血を投与した肺高血圧マウスと投与しない肺高血圧マウス群において、それぞれ臍帯血投与 10 分後、30 分後、1 時間後、3 時間後、6 時間後及び 24 時間後の体内臓器分布、特に肺組織への局在が他臓器よりも強く観察された。

ヒト臍帯血細胞移植は骨髓単核球細胞移植と同等以上に健全な肺血管の新生、再生に伴って肺血管床を発育、増大し、その効果発現には臍帯血細胞自体が必要である。その効果はレシピエントに対して age dependent であるかどうか、即ち低年齢レシピエントでより肺血管床発育効果があるか検討することが必要であるが、これらの研究成果は、“ 分娩時に採取した患児の自己臍帯血を、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うことで、未熟肺血管床をより発育させる ” 新しい治療法開発の足がかりとなる。ひいては低肺血流性心臓病のより早期の修復治療を可能とし良好な QOL を期待できると思われる。

臍帯血には造血幹細胞が多量に含まれていることが知られているが、最近、それ以外の体性幹細胞である間葉系幹細胞が臍帯血中に見出され、さらに、神経細胞や上皮細胞など、より広範な組織への多分化能を有する血管内皮前駆細胞の存在も示唆され、再生医療への臨床応用へ適用できる可能性が示されている。

本研究は、マウス傷害肺血管床に対する同種骨髓単核球細胞移植及び臍帯血細胞移植の良好な肺血管床再生実績をもとに、臍帯血細胞移植により健全な未熟あるいは低容量肺血管床をより早く発育、増大させ得るか研究しようとしている。

臍帯血細胞移植はドナーの負担がほとんど無く、レシピエントに良好な研究成果が確

認されれば、エンドポイントとする「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できる」ことから、低肺血流性先天性心臓病に対する新たな治療戦略を進展、展開させる事が期待できる。臍帯血細胞移植は他家移植においても移植可能な HLA 型の範囲が広いのが特徴で、理想的なドナー細胞供給源と考えられる。得られた結果を取りまとめて成果を投稿中である (Effects of Transplanted Human Cord Blood-Mononuclear Cells on Pulmonary Hypertension in Immunodeficient Mice and Their Distribution)。

<参考文献>

Yoshida H, Kitaichi T, Urata M, et al. Syngeneic bone marrow mononuclear cells improve pulmonary arterial hypertension through vascular endothelial growth factor upregulation. *Ann Thorac Surg* 2009;88:418-424.

Sahoo S, Klychoko E, Thorne T, et al. Exosomes from human CD34+ stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circulation Research* 2011;109:724-728.

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12件)

北市 隆、菅野幹雄、木下 肇、中山泰介、黒部裕嗣、神原 保、藤本鋭貴、北川 哲也、Norwood 手術における Blalock-Taussig シヤント - 実験から臨床への展開 -、胸部外科、査読有、Vol.67: No.4:274-277,2014

Taisuke Nakayama、Hajime Kinoshita、Mikio Sugano、Hirotsugu Kurobe、Tamotsu Kanbara、Eiki Fujimoto、Takashi Kitaichi、Hiroshi Fujita、Hitoshi Sogabe、Tetsuya Kitagawa、Delayed-onset severe heparin-induced thrombocytopenia after total arch replacement under cardiopulmonary bypass、THE JOURNAL OF MEDICAL INVESTIGATION、査読有、Vol.60

(No.1,2) 2013、154-158、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/1.2/60_154/_article

Kurobe H、Tominaga T、Sugano M、Hayabuchi Y、Egawa Y、Takahama Y、Kitagawa T、Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune response:

Three-year tracing study after pediatric cardiac surgery, J Thorac Cardiovasc Surg, 査読有、2013 Mar、145(3)、656-662.e2. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.12.015. Epub 2013 Jan 9.

〔学会発表〕(計16件)

木下 肇、中山泰介、菅野幹雄、黒部裕嗣、神原 保、藤本鋭貴、北市 隆、北川哲也、二尖性大動脈弁に対する大動脈弁置換術時の上行大動脈壁の問題点、第42回日本血管外科学会学術総会、2014年5月21日-23日、リンクステーションホール青森【青森市文化会館】・ホテル青森(青森県・青森市)
Hirotsugu Kurobe、Noriko Sugawara、Yoichiro Hirata、Mitsuo Shimabukuro、Taisuke Nakayama、Takeshi Yoshida、Mark W. Maxfield、Tetsuya Kitagawa
Vascular remodeling effects by administrating Ezetimibe after arterial wire-injury in mice、ASCVTS 2014、April 3-6 2014、ISTANBUL CONVENTION&EXHIBITION CENTER (ISTANBUL, TURKEY)

菅野幹雄、菅澤典子、黒部裕嗣、中山泰介、吉田 誉、北市 隆、木下 肇、神原 保、藤本鋭貴、苛原 稔、北川哲也、臍帯血細胞移植は肺高血圧を改善させるか、第44回日本心臓血管外科学会学術総会、2014年2月19日-21日、ホテル日航熊本/熊本県民交流館パレア/鶴屋ホール(熊本県・熊本市)

〔図書〕(計1件)

北市 隆、北川哲也、医歯薬出版株式会社、歯界展望 別冊『歯科医師のための医学ハンドブック』Chapter1 症候チアノーゼ、224(23-24)、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 哲也(KITAGAWA, Tetsuya)
徳島大学・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・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・大学病院・助教
研究者番号：10403685

前田 和寿(MAEDA, Kazuhisa)
独立行政法人国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター(臨床研究部(成育)臨・総合周産期母子医療センター・部長
研究者番号：30294680
(H24, H25)

菅野 幹雄(SUGANO, Mikio)
徳島大学・大学病院・医員
研究者番号：70563807
(H24, H25)

中山 泰介(NAKAYAMA, Taisuke)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・特別研究員
研究者番号：80582791
(H24, H25)

黒部 裕嗣(KUROBE, Hirotsugu)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：30380083
(H26)

木下 肇(KINOSHITA, Hajime)
徳島大学・大学病院・特任助教
研究者番号：80611227
(H26)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：