

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659772

研究課題名(和文)自家臍帯幹細胞シート移植による先天性横隔膜ヘルニアにける低形成肺の再生

研究課題名(英文)Effect of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells On The Growth Of Nitrofen Induces Hypoplastic Lung Explants

研究代表者

新開 統子(Shinkai, Toko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80301612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いた細胞シートの作成。タカラバイオ社のhMSC-UCを用いて、細胞シートの作成を行った。35mm培養皿にP2継代培養細胞を $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>濃度で培養を開始。培養5日目に回収した。約1cm径のシートとして作成出来た。2. ラット胎児肺とhMSC-UCの共培養。hMSC-UCと妊娠13.5日目の正常またはnitrofenモデル低形成ラット胎児肺をのせて共培養した。48時間の無血清培養後、共培養した胎児肺は、しないものに比しterminal lung budの増加率が優位に高く、VEGF、BMP-4、TTF-1の発現が優位に高かった。

研究成果の概要(英文)：Adipose stem cells have been reported to accelerate alveolar and vascular regeneration in damaged rat lungs. Therefore, we are investigating the possibility of regeneration therapy using human umbilical cord mesenchymal stem cells in an experimental hypoplastic lung models. We used stem cells (hMSC-UC) which are commercially available from PromoCell. 1. I used P2 passage culture cells. I created hMSC-UC sheet in 1cm diameter for 5 days culture. 2. The ratio of the terminal bud increments of cultured lung was calculated. VEGF, BMP-4, TTF-1 mRNA expression levels were analyzed by RT-qPCR. Terminal lung buds significantly proliferated in embryonic lungs when co-cultured with hMSC-UC. VEGF, BMP-4, and TTF-1 mRNA expressions were all significantly higher in normal embryonic lungs when co-cultured with hMSC-UC. The study showed that hMSC-UC may stimulate secretion of lung growth factors such as; VEGF, BMP-4, and TTF-1 from the embryonic lung.

研究分野：小児外科

キーワード：再生医療 幹細胞 臍帯由来間葉系幹細胞 横隔膜ヘルニア 肺低形成

### 1. 研究開始当初の背景

肺はその構造の複雑さのため再生は困難とされている。しかし、近年レチノイン酸など再生因子投与、幹細胞移植、Tissue Engineering などの手法を用いた研究により肺組織再生の研究成果が示されている。中でも、肺切除後の障害肺に脂肪幹細胞をメッシュシートに培養し障害部に移植する方法は、外科治療と同時に施行でき低侵襲で有効な方法として注目される。しかし、日齢0の新生児から脂肪細胞を多量に抽出するのは困難である。そこで、児の組織である臍帯 Wharton's Jelly に比較的多量に存在する臍帯由来間葉系幹細胞(UCMSCs)を抽出しこれをシート状足場に培養し用いることを着想した。

### 2. 研究の目的

先天性横隔膜ヘルニア(以下 CDH)は、胎児期の横隔膜閉鎖障害から、横隔膜の欠損孔を介して腹腔内臓器が胸腔内へ脱出する疾患である。合併する肺低形成と遷延性肺高血圧症のため、現在でも救命率は約70%にとどまり、救命可能であっても低酸素脳症による後遺症や在宅酸素療法が必要となるなど患児の Quality of Life (QOL)は不良である。そこで、CDH 児の救命率と QOL 向上のための革新的な治療法を確立する必要があると考えた。我々は、CDH の予後を規定する肺低形成に対し、Tissue Engineering の手法を用いて児の臍帯から抽出した臍帯幹細胞をシート状足場に培養し、このシートごと根治手術時に患側肺へ貼付することにより、低形成肺の発育を促進する治療法を考案した。この治療法の確立が本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1)臍帯由来間葉系幹細胞シートの作成

使用細胞：Promo Cell (タカラバイオ) ヒト臍帯マトリックス由来間葉系幹細胞

使用培地：Promo Cell (タカラバイオ) 間葉系幹細胞増殖培地

培養条件：37℃、O<sub>2</sub> 21%、CO<sub>2</sub> 5%

上記細胞を用いて、培養皿と細胞濃度の条件を変えて検討。

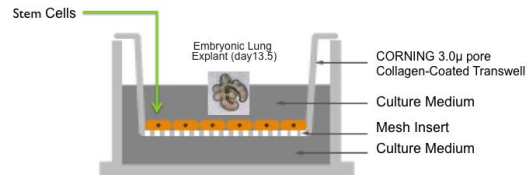
培養皿	温度応答性培養皿 UP CELL35mm (セルシート)	35mm培養皿	12well培養皿 (12mm)
継代	P2	P4	P4
細胞数 (cells/cm <sup>2</sup> )	5000	1x10 <sup>5</sup>	5000, 1x10 <sup>4</sup> , 1x10 <sup>5</sup>

#### (2)ラット胎児肺と UCMSCs 共培養

メッシュインサート上に UCMSCs をあらかじめ 5x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> 濃度で培養しておき、その上に妊娠 13.5 日目のラット胎児肺を置いて共培養した。低形成肺モデルは、妊娠 9.5 日目のラットに Nitrofen(100mg)の経胃管投与で作成し、妊娠 13.5 日目に肺を摘出した。無血清培地で 48 時間培養後、terminal bud の増加率と肺成長因子の mRNA 発現を

RT-qPCR で確認した。

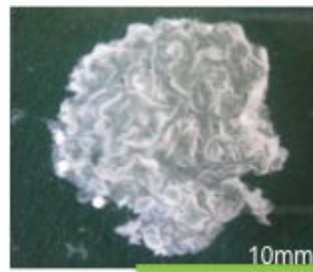
培養 48 時間後に、慎重にメッシュ膜から胎児肺を剥がし、肺を RNAlater (Ambion, UK)に入れた。各肺から total RNA を取り出すには、RNeasy Mico Kit (Qiagen, Germany)を用いて行った。検索した mRNA は、VEGF, HIF1a, BMP-4, TTF1 とした。



### 4. 研究成果

#### (1)臍帯由来間葉系幹細胞シート

継代培養 P4 細胞を用いて、35mm 培養皿を用いて細胞数 1x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>、5 日間培養したものが至適条件であった。直径約 1cm のシートが作成できた。



培養皿	温度応答性培養皿 UP CELL35mm (セルシート)	35mm培養皿	12well培養皿 (12mm)		
継代	P2	P4	P4		
細胞数 (cells/cm <sup>2</sup> )	5000	1x10 <sup>5</sup>	5000	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>5</sup>
培養期間(日)	7-10	5	5	5	5
評価	UP CELL 高価	良	シート 薄い	小	小

#### (2) terminal lung bud の増加率

結果は 4 群に分けて検討した。

Group A: control with UCMSCs

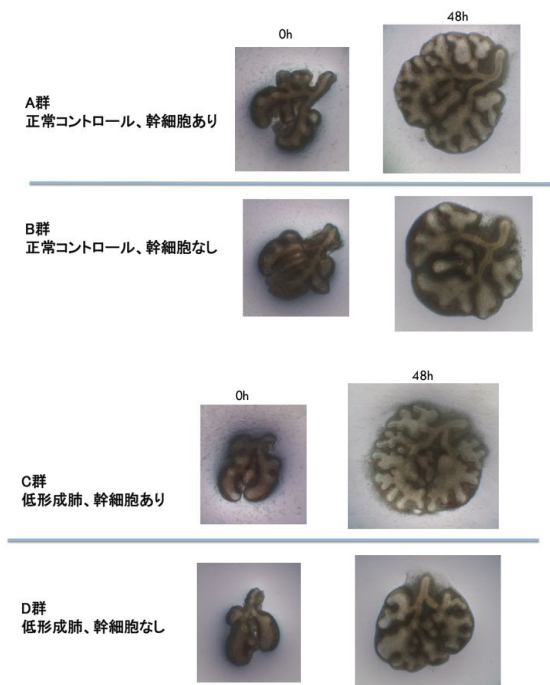
Group B: control with UCMSCs

Group C: nitrofen with UCMSCs

Group D: nitrofen without UCMSCs

terminal lung bud とは、肺実質の末梢で明らかな隔壁をもって、ぶどうの房状に球形の形態をしており、肺成長の先端と考えられる。terminal lung bud の増加率は、培養 48 時間後の terminal lung bud の数を、培養開始時である 0 時間での terminal lung bud の数で割った数とした。

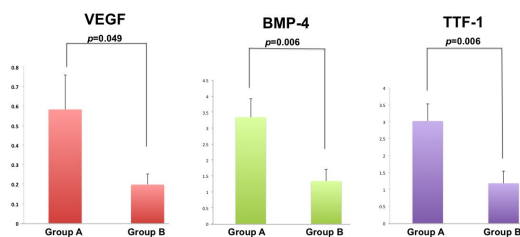
共培養した群は細胞の無い群に比べ、増加率が高く、正常群の A 群は B 群に比し有意に増加率が高かった(p=0.018)。



### (3)mRNA 発現

肺成長因子として、VEGF-A、HIF1、BMP-4、TTF-1 の mRNA 発現を RT-qPCR で検討した。正常胎児肺においては、VEGF-A、BMP-4、TTF-1 の発現は Group A は Group B に比し有意に高かった ( $p=0.049$ ,  $p=0.006$ ,  $p=0.006$ )。HIF1 に有意差は無かった。nitrofen による肺低形成モデルでは、UCMSCs の有無に限らず、いずれの因子も有意差は認めなかった。

正常胎児肺の 48 時間共培養後の mRNA 発現



### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 新開統子、増本幸二、萩原幸輝、高安 肇、田中秀明、瓜田泰久、上杉 達、五藤 周、神保教広

臍帯由来間葉系幹細胞を用いた低形成肺に対する分化誘導に関する検討

第 51 回日本小児外科学会学術集会

(2) Toko Shinkai, Kouji Masumoto Kouki Hagiwara, Takahiro Jimbo, Takato Sasaki, Toru Uesugi, Chikashi Gotoh Yasuhisa Urita, Hajime Takayasu, Hideaki Tanka

EFFECTS OF UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE GROWTH OF NITROFEN INDUCED HYPOPLASTIC LUNG EXPLANTS

15<sup>th</sup> Annual Congress of European Pediatric Surgeon's Association

(3) Toko Shinkai, Kouji Masumoto, Kouki Hagiwara, Chikashi Gotoh, Yasuhisa Urita, Makoto Nakao, Naoya Sakamoto, Fumiko Chiba, Takato Sasaki, Shunsuke Fujii, Tsubasa Aiyoshi, Hajime Takayasu, Hideaki Tanka

EFFECTS OF UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE GROWTH OF ENBRYONIC LUNG EXPLANTS

48<sup>th</sup> Annual Congress of Pacific Association of Pediatric Surgery

〔図書〕(計 0 件)

〔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 なし

6．研究組織

(1)研究代表者  
新開 統子 (SHINKAI, Toko)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：80301612

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし