

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461644

研究課題名(和文)胎児付属物由来の間葉系幹細胞を用いた新生児慢性肺疾患に対する新規治療の開発

研究課題名(英文)The development of new therapy for neonatal chronic lung disease using mesenchymal stem cells derived from fetal appendages.

研究代表者

溝淵 雅巳 (Mizobuchi, Masami)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：50643954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新生児慢性肺疾患は早産児に高率に発症する重篤な疾患であるが、有効な治療法は存在しない。原因として周生期の炎症やそれに対する免疫反応の異常が指摘されている。間葉系幹細胞は多能性の細胞で、傷害組織の修復、炎症や免疫反応を調節する物質を分泌することが報告されている。

本研究の目的は早産児の胎児付属物から間葉系幹細胞を分離・培養し、患児の肺内に移植するという新生児慢性肺疾患に対する新しい治療法を開発することである。我々は早産児の臍帯から間葉系幹細胞を簡便かつ効率的に分離・培養する方法を確立した。さらに、得られた間葉系幹細胞の有効性を検討するための、プレオマイシン気管内投与肺傷害動物モデルを確立した。

研究成果の概要(英文)：Chronic lung disease (CLD) of prematurity is a common and serious complication in preterm infants. To date, there is no effective treatment for CLD. Perinatal inflammation and regulation of the immune responses have been reported to play a crucial role in the development of CLD. Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stromal cells that can differentiate into a variety of cell types, including osteocytes, adipocytes and chondrocytes. Recently, MSCs have been reported to secrete a variety of factors that promote tissue repair and decrease inflammatory and immune reactions.

The objective of study was to develop new therapy for CLD using MSCs isolated from fetal appendages in premature infants. In this study, we successfully established a simple and efficient method isolating MSCs from umbilical cord. Furthermore, to determine the effectiveness of MSCs for CLD, we developed an experimental animal model of intra-tracheal bleomycin-induced lung injury.

研究分野：新生児学

キーワード：間葉系幹細胞 細胞治療 新生児慢性肺疾患 胎児付属物

1. 研究開始当初の背景

新生児慢性肺疾患 (Chronic Lung Disease、以下 CLD) は、超低出生体重児の約 40% に合併し、生命及び神経学的予後に影響する重篤な疾患である。CLD の危険因子として、早産による肺の未熟性に加え、絨毛羊膜炎などの胎内感染や炎症、人工呼吸管理や高濃度酸素投与による肺損傷などが知られている。CLD の発症には、気道内の炎症や血管透過性に影響を及ぼす種々のサイトカインや成長因子など多くの因子が関与すると考えられ、そのメカニズムの全貌は依然として明らかでない。また、CLD の予防や治療として、抗炎症、抗酸化、成長促進などの観点から、種々の治療が試みられているが、依然として有効な治療法は確立していない。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells、以下 MSCs) は、種々の傷害組織に集積・適応する能力を持ち、種々のサイトカインや栄養因子を産生することにより、抗炎症・組織保護作用を発揮することが知られている。前述のように、CLD は多因子疾患であるため、従来の単剤療法では十分な効果が得られなかったが、新しい CLD の治療法として MSCs を肺内に移植すれば、肺組織の病態に応じた種々の因子が産生されるという点において、有効性が期待される。MSCs のなかでも臍帯血由来 MSCs などの胎児由来の MSCs は、ES 細胞や iPS 細胞に比べて腫瘍原性・免疫原性が低いとされ、臨床応用が積極的に進められている。胎児由来の MSCs は、臍帯血中だけでなく、臍帯や卵膜などの胎児付属物にも豊富に含まれ、分離可能とされる。このことから、早産児の分娩時に得られる臍帯血や胎児付属物からの

MSCs を有効に分離・保存することができれば、CLD 発症時に自己の MSCs を投与することによって、CLD の改善が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、早産児の臍帯血及び胎児付属物から間葉系幹細胞を分離・培養し、患児の肺内に移植するという新生児慢性肺疾患に対する新しい治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) ヒト臍帯血及び胎児付属物からの MSCs の分離・培養法を確立する。
- (2) ヒト臍帯血及び胎児付属物からの得られた MSCs の特徴の解析を行う。
- (3) 新生仔ラットの新生児慢性肺疾患モデルを用いて、MSCs の肺内移植の方法と有効性の検討を行う。
- (4) 人工呼吸管理を要する早産児に対して、分離した間葉系幹細胞を気管内投与する新規治療法に関する第 1・2 相臨床試験を実施する。

4. 研究成果

- (1) ヒト臍帯血及び胎児付属物からの MSCs の分離・培養法の確立

MSCs は接着細胞であることから、接着培養による分離・培養を行った。臍帯血については、モノ・ポリ分離溶液を用いて有核細胞を分離して、接着培養を行った。約 1 週間後に紡錘状の接着細胞の増加を確認し、細胞増殖をまった約 2 週間後に凍結保存

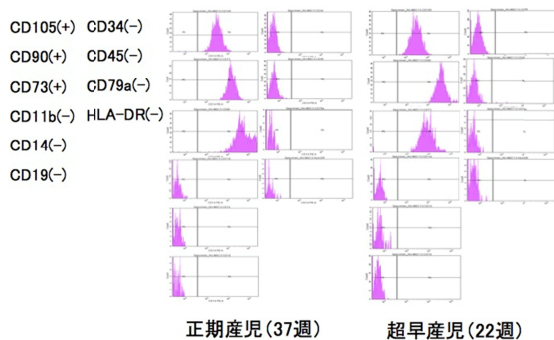
とした。臍帯については、組織を物理的に粉碎したうえで、タンパク分解酵素であるリペラーゼを用いて細胞を単離し、臍帯血と同様に接着培養を行った。約5日後に紡錘状の接着細胞の増加を確認し、細胞増殖をまって約2週間後に凍結保存とした。以上より、臍帯血および臍帯からの接着細胞の分離・培養方法を確立できた。

(2) ヒト臍帯血及び胎児付属物からの得られた MSCs の特徴の解析

細胞表面マーカーの解析

分離・培養した接着細胞が MSCs として合致するかどうかを表面マーカー解析で確認した。MSCs の特徴とされる CD105・CD73・CD90 について、蛍光抗体で標識し、フローサイトメトリーで陽性細胞の割合を解析した。臍帯血・臍帯、いずれから分離・培養した細胞においても、CD105・CD73・CD90 は 95% 以上陽性であった。一方、他の細胞で発現が知られる CD11b・CD14・CD19・CD34・CD79 ・HLA-DR については、陽性細胞が 5% 未満であった。以上より、臍帯血および臍帯から分離・培養した接着細胞が純度の高い MSCs であることを証明した。

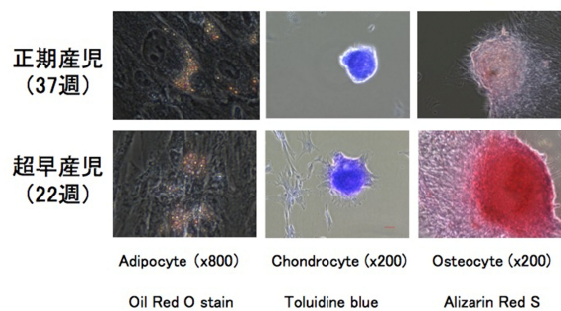
表面マーカー解析



多分化能の解析

MSCs は軟骨・骨・脂肪組織に分化することが知られている。臍帯血および臍帯から分離・培養した接着細胞について、分化誘導用特殊培養液を用いて培養したところ、骨組織、軟骨組織、脂肪組織への分化が確認された。臍帯血および臍帯から分離・培養した接着細胞が MSCs の分化能を有することが示された。

脂肪・軟骨・骨細胞への分化能



在胎週数による遺伝子発現の比較解析

多様な週数の新生児から臍帯由来 MSCs を分離し、RNA 発現の網羅的解析を行った。得られた MSCs から全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイシステム(アジレント社)を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。結果、WNT 関連遺伝子群が正期産児よりも早産児で高発現していることが明らかとなり、この結果はリアルタイム PCR 法により再現性が確認された。現在は、これら WNT 関連遺伝子群の機能解析を継続中である。

(3) 新生仔ラット CLD モデルを用いた MSCs の肺内移植の方法と有効性の検討

成体ラットの薬剤性肺傷害モデルでの検討

新生仔ラットの CLD モデルにおける検討に先立って、成体ラットの薬剤性肺傷害モデルでの検討を行

う方針とした。薬剤性肺障害をきたすことで知られるブレオマイシンを用いて、気管内投与することで肺障害をきたすかどうか検証した。8週齢のSDラット(200g程度)に対して、ブレオマイシン(3mg/kg)を気管内投与したところ、コントロール群(生理食塩水を気管内投与)に比して、投与後の体重減少が明らかで、3週間後の肺組織像を確認したところ、肺泡間距離の開大や肺泡壁の肥厚など急性肺障害後の線維化として矛盾しない所見を得た。以上より、成体ラットの薬剤性肺傷害モデルが確立されたため、臍帯由来MSCsの肺内移植を行い、その有効性の検証を行う予定である。

5. 主な発表論文等本研究課題により得られた研究成果

(1) 学会発表(計4件)

岩谷壮太、黒川大輔、西山将広、庄野朱美、吉田牧子、溝淵雅巳、森岡一郎、飯島一誠、西村範行、臍帯由来間葉系幹細胞における児の在胎週数による転写制御解析、第15回日本再生医療学会、2016年3月17～19日、大阪国際会議場(大阪府)

串田良祐、若尾昌平、明石英雄、西村範行、岩谷壮太、香田翼、森岡一郎、溝淵雅巳、飯島一誠、出澤真里、臍帯組織中に存在する多能性幹細胞 Muse 細胞の自己複製能と多分可能の検証、第15回日本再生医療学会、2016年3月17～19日、大阪国際会議場(大阪府)

串田良祐、若尾昌平、明石英雄、西村範行、岩谷壮太、香田翼、森岡一郎、溝淵雅巳、飯島一誠、出澤真里、臍帯組織中に存在する多能性幹細胞

Muse 細胞の多能性の解析、第42回日本臓器保存生物医学会学術集会、2015年11月13～14日、いわて県民情報交流センター(岩手県)

Yoshihiro Kushida, Shouhei Wakao, Hideo Akashi, Noriyuki Nishimura, Sota Iwatani, Tsubasa Koda, Ichiro Morioka, Masami Mizobuchi, Kazumoto Iijima, Mari Dezawa, Analysis of pluripotency in Muse cells derived from human umbilical cord tissue. International society for stem cell research, 2015年6月24～27日、ストックホルム(スウェーデン)

(2) ホームページ

神戸大学大学院医学研究科小児科学 新生児グループ 間葉系幹細胞研究グループ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/pediat/research/msc.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝淵 雅巳 (MIZOBUCHI, Masami)

神戸大学・大学院医学研究科・客員准教授

研究者番号: 50643954

(2) 研究分担者

西村 範行 (NISHIMURA, Noriyuki)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号: 00322719

森岡 一郎 (MORIOKA, Ichiro)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号: 80437467