

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670493

研究課題名(和文) 新生児肺発達障害の発症機序の解明と革新的予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms and development of new therapies for lung hypoplasia

研究代表者

藤永 英志 (Fujinaga, Hideshi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60623733

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)：新生児肺発達障害の代表的な疾患である先天性横隔膜ヘルニア(CDH)と健常新生児より臍帯血を得て、endothelial colony-forming cell (ECFC)を分離・培養した。臍帯血 ECFC定量、ECFCの *in vitro*における自己複製能・コロニー形成能、増殖能、遊走能、一酸化窒素合性能、NOD/SCID マウスへの移植による *in vivo* 血管形成能などを比較した。CDH 症例由来 ECFC においては、臍帯血 ECFC 数の低下、*in vitro* 細胞機能の障害、*in vivo* 血管形成能の低下が見られ、肺低形成における血管形成障害の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vascular growth is necessary for normal lung development. We hypothesized that the function of endothelial colony-forming cells (ECFCs), a type of endothelial progenitor cells (EPCs), is impaired in congenital diaphragmatic hernia (CDH), that is associated with lung hypoplasia. Cord blood (CB) was collected from CDH patients and healthy controls. We assessed CB progenitor cell populations and CB ECFC functions. CB ECFCs were decreased in CDH. CDH ECFCs had reduced potential for self-renewal, proliferation and migration. Their capacity for nitric oxide (NO) production was enhanced but response to VEGF was blunted. The *in vivo* potential for vasculogenesis was reduced in CDH ECFCs. There was no difference in VEGF and SDF1 levels in CB plasma and culture media, and ECFC mRNA expression associated with VEGF-NO and SDF1-CXCR4 signaling between groups. In conclusion, CB ECFC function is disrupted in CDH, probably due to mechanisms other than alteration of VEGF-NO and SDF1-CXCR4 signaling.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：肺低形成 血管内皮前駆細胞 ECFC VEGF SDF1

1. 研究開始当初の背景

- (1)近年、新生児肺障害は、胎児期・新生児期の様々な成因による肺発達障害と考えられている。そのメカニズムとして、肺血管発育障害、とくに **VEGF signaling** の障害が関与しているが、詳細は不明である。
- (2)超低出生体重児の慢性肺疾患の発症頻度は減少しておらず(超低出生体重児の 54%; 2000 年 厚生労働省研究班)、神経学的予後を悪化させる主要な因子である。サーファクタント欠乏、低抗酸化能などの未熟性や、感染、炎症、高濃度酸素、人工呼吸による障害への高感受性が慢性肺疾患の成因で、肺胞肺血管発育障害が病理的特徴である。
- (3)一方、新生児期の呼吸障害の代表的な疾患に肺低形成がある。肺低形成の90%以上は、横隔膜ヘルニア、腎泌尿器疾患や長期破水に伴う羊水過少、胸腔内占拠性病変、神経筋疾患、骨系統疾患などの出生前異常に伴う二次性であるが、その共通の成因は胎児期の肺拡張障害で、病理学的特徴は気道肺胞肺血管発育の障害である。
- (4)申請者は、早産児臍帯血由来 endothelial colony-forming cell, **ECFC**(血管内皮前駆細胞 **EPC** の **subtype** の 1つ)は慢性肺疾患の主要な発症要因の一つである高濃度酸素により増殖能低下、**VEGFR-2** 蛋白発現、**eNOS** 蛋白発現、**NO** 産生能が低下することを明らかにした(Fujinaga H. et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**(6):L1160-9.)。
- (5)これまでも新生児肺障害の発症機序や予防・治療法に関する研究は多くなされてきた。しかし、これらのほとんどは感染や人工呼吸などによる二次的肺障害とその軽減に関する研究で、結果として生じる肺発達障害の発症機序や発達を促す予防・治療法に関する研究は少なく、有効な肺発達障害の予防・治療法は、現在のところ存在しない。
- (6)肺発達障害ではその成因によりEPC 機能障

害を生じている可能性は高く、外因性因子などによる EPC 機能の回復、正常機能を有する EPC の同種移植、遺伝子改変・導入などにより機能回復した EPC の自家移植などが肺発達障害に対する予防・治療法となる可能性がある。

2. 研究の目的

新生児肺発達障害における血管内皮前駆細胞 (**EPC**)機能障害を明らかにし、**EPC** 移植の新生児肺発達障害予防・治療応用へと展開するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

- (1)健常新生児 (コントロール群) と横隔膜ヘルニア (CDH)、腎泌尿器疾患や長期破水に伴う羊水過少、胸腔内占拠性病変、神経筋疾患、骨系統疾患など肺低形成を伴う可能性のある疾患の胎児診断された新生児、慢性肺疾患を発症するリスクの高い早産児例のうち、出生前に家人から同意を得られた症例より臍帯血を採取し、母体・新生児の診療情報を診療録より収集した。
- (2)コントロール群と、正期産で出生した CDH 症例のうち先天感染症、染色体異常症、胎児鏡下バルーン気管閉塞術 (FETO) を受けた患者は除外した症例 (CDH 群) から得られた臍帯血について、polychromatic flow cytometry に より 、 ECFC (CD45⁻CD34⁺AC133⁻CD31⁺), angiogenic circulating progenitor cell (angiogenic CPC:CD45^{dim}CD34⁺AC133⁺CD31⁺), non-angiogenic CPC (CD45^{dim}CD34⁺AC133⁻CD31⁺)の定量と、血漿 VEGF、SDF1 α 濃度の測定を行った。
- (3)コントロール群と CDH 群より得られた臍帯血より、ECFC を分離・培養し、single cell colony formation assay で自己複製能とコロニー形成能を、増殖曲線の作成により増殖能を、modified Boyden chamber assay と scratch wound healing assay により遊走能

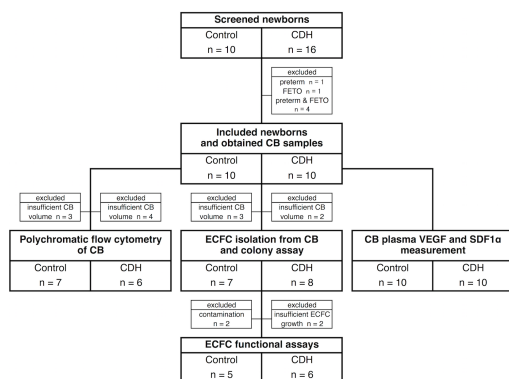
を、DAF-FM DA を用いて一酸化窒素 (NO) 産生能を、growth factor reduced Matrigel を用いた tube formation assay で *in vitro* における脈管形成能を、NOD/SCID マウスへの移植により *in vivo* 血管形成能を測定し、ECFC の生理活性の比較を行った。

(4)コントロール群と CDH 群の臍帯血由来 ECFC の生理活性に対する VEGF-NO シグナルと SDF1-CXCR4 シグナル伝達の影響を調べるために、臍帯血血漿と細胞培養液中の VEGF, SDF1 α 濃度の測定と、ECFC における VEGF-A, FLT1, KDR, NOS1-3, SDF1, CXCR4 mRNA の発現をリアルタイム PCR にて比較した。

4. 研究成果

(1)コントロール群 10 例、胎児診断症例群 38 例、早産児群 32 例より、研究への参加の同意、臍帯血を得ることができた。

(2)コントロール群、CDH 群とも 10 例ずつ臍帯血を採取することができたが、採取できた臍帯血の量や、ECFC 分離培養過程における増殖不良や contamination の問題などから、このフローチャートに示すように、各実験項目について、コントロール群は n=5~10、CDH 群は n=6~10 となった。

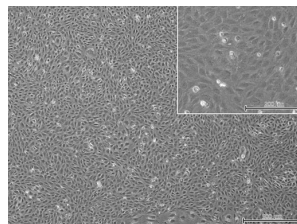


各実験において、在胎週数、出生体重、前期破水の有無、羊水混濁の有無など、これまでに臍帯血 ECFC 数や機能に影響を及ぼす可能性があるとして報告された周産期因子

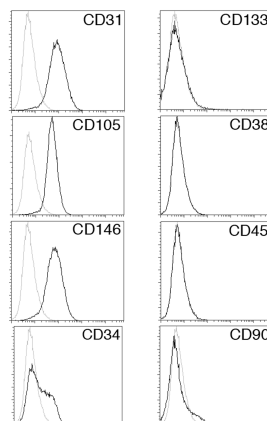
については、両群間に統計学的有意差はなかった。

(3)臍帯血から分離された細胞は ECFC に矛盾しないことを確認した。

① 敷石状の外観

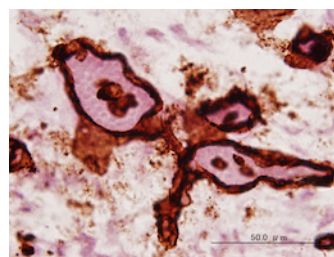


② 血管内皮表面抗原の発現



③single cell colony formation assay にて、自己複製能の確認と増殖能の高い細胞集団の存在

④ *in vivo* における血管形成能



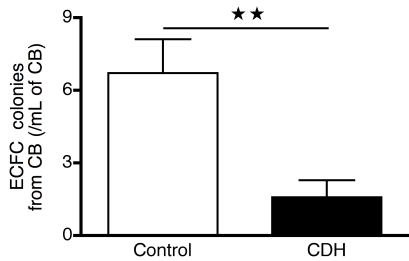
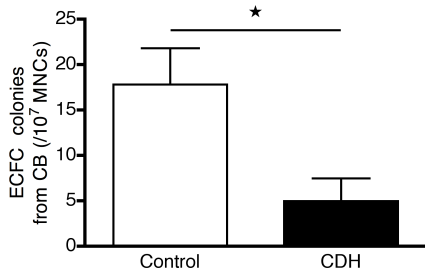
(3)CDH 患者では臍帯血 ECFC が少ない。

①臍帯血 MNCs における polychromatic flow cytometry

Table 1. Circulating progenitor cell populations in cord blood

Cell populations	Control (n=7)	CDH (n=6)	P value
ECFCs ^a (%) ^b	0.0098 ± 0.0020	0.0020 ± 0.0005	0.008
angiogenic CPCs ^c (%) ^b	0.0018 ± 0.0005	0.0012 ± 0.0004	0.325
non-angiogenic CPCs ^d (%) ^b	0.0322 ± 0.0113	0.0130 ± 0.0085	0.215
CPC/non-CPC ratio ^e	0.1057 ± 0.0434	0.4930 ± 0.1942	0.109

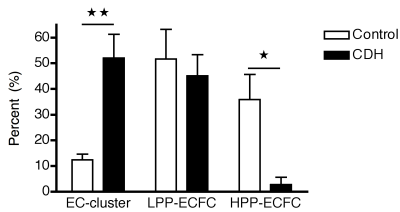
②分離培養における ECFC コロニー定量



*P=0.015, **P=0.005

(4)CDH 患者由来の臍帯血 ECFC の自己複製能、コロニー形成能は低い。

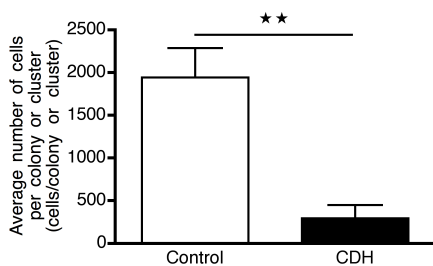
① single cell colony formation assay:ECFC 分画



*P=0.032, **P=0.009

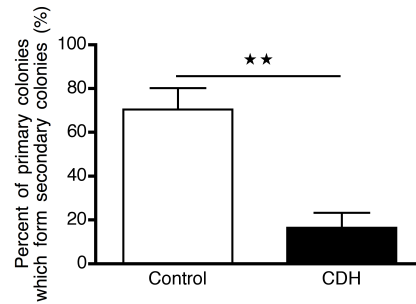
Endothelial cell cluster:EC-cluster;2-50cells/well
Low proliferative ECFC:LPP-ECFC; 51-2000cells/well
High proliferative ECFC:HPP-ECFC; >2000cells/well

② single cell colony formation assay:cell colony または cluster の平均細胞数



**P=0.001

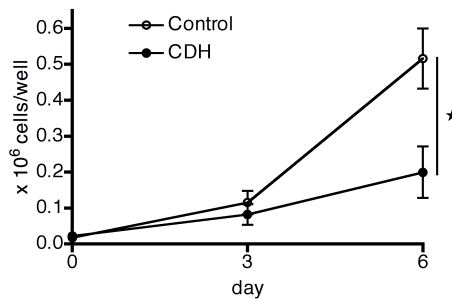
③ single cell colony formation assay:secondary colony を形成する割合



**P=0.001

(5)CDH 患者由来の臍帯血 ECFC の増殖能は低い。

標準培地における増殖曲線

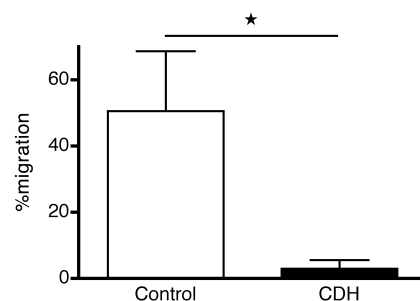


*P=0.018

(6)CDH 患者由来の臍帯血 ECFC の遊走能は低い。

①modified Boyden chamber assay

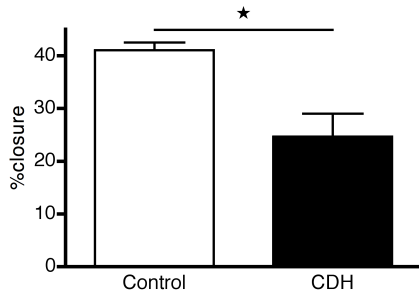
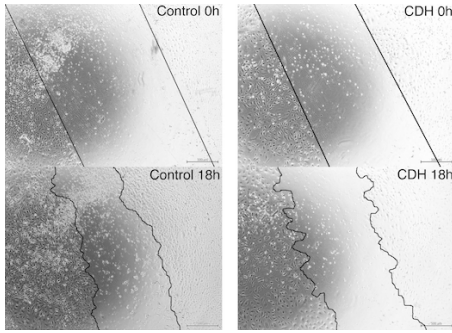
- chemoattractants: EGM-2 with 2% FBS
- incubation time: for 48 hours



*P=0.023

②scratch wound healing assay

- incubation time: for 18 hours

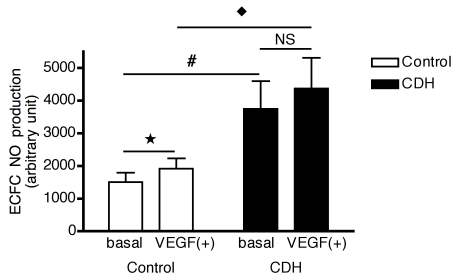


*P=0.017

(7)CDH 患者由来の臍帯血 ECFC は NO 産生が増加しているが、VEGF に対する反応は鈍化している。

ECFC 細胞内 NO 濃度

- DAF-FM DA
- with or without 25ng/ml of rhVEGF

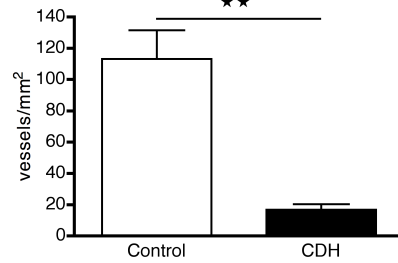
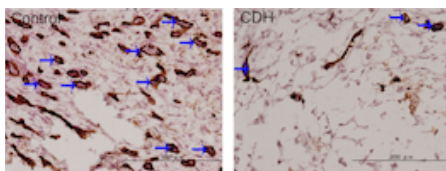


*P=0.010, #P=0.047, ♦P=0.048, NS: not significant

(8)CDH 患者由来の臍帯血 ECFC は *in vivo* において、血管形成能が低い。

In vivo vasculogenesis assay

- ECFC transplantation into NOD/SCID mice
- Incubation time: for 14 days



**P=0.007

(9)CDH 患者由来の ECFC に対する VEGF, SDF1 への暴露と VEGF-NO, SDF1-CXCR4 シグナル伝達に関連する一部の遺伝子発現には明らかな変化は見られない

- 臍帯血血漿 VEGF, SDF1 α 濃度: ELISA
- ECFC による VEGF, SDF1 α 産生: 培養液の ELISA
- ECFC における VEGF-A, FLT1, KDR, NOS1-3, SDF1, CXCR4 mRNA 発現: real-time PCR

(10)結果のまとめ

① 健常新生児と CDH 患者臍帯血由来 ECFC の生理活性の比較

- CDH 患者由来 ECFC における
 - 臍帯血中細胞数の減少
 - 自己複製能、コロニー形成能、増殖能、遊走能の低下
 - NO 産生のベースライン上昇と、VEGF 刺激への反応の鈍化
 - 血管形成能の低下

② 健常新生児と CDH 患者臍帯血由来 ECFC における VEGF-NO、SDF1-CXCR4 シグナル伝達の比較

- 統計学的有意差なし
 - 臍帯血 VEGF, SDF1 濃度
 - VEGF, SDF1 蛋白産生能
 - VEGF-A, FLT1, KDR, NOS, SDF1, CXCR4 遺伝子発現

(11)考察

- CDH では circulating ECFC の生理活性が低下している。
- ECFC の生理活性低下には、VEGF-NO や SDF1-CXCR4 シグナル伝達における変化

以外のメカニズムの関与が示唆される。

- ECFC の生理活性低下は、CDH に伴う肺低形成における肺血管形成の減少に関与している可能性がある。
- 肺の発生・分化における ECFC の役割や、CDH に伴う肺低形成の新しいバイオマーカーや治療標的としての ECFC の可能性をより深く理解するためには、さらなる研究が必要である。

(12) 結論

CDH における肺低形成の発症には、EPC の生理活性低下を伴う肺血管形成の破綻が重要な役割を果たしている。

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 1 件)

- ① Fujinaga H, Fujinaga H, Watanabe N, Kato T, Tamano M, Terao M, Takada S, Ito Y, Umezawa A, Kuroda M. Cord Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cell Function is Disrupted in Congenital Diaphragmatic Hernia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016 in press 査読有 DOI: 10.1152/ajplung.00357.2015.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Fujinaga H, Fujinaga H, Watanabe N, Kato T, Tamano M, Terao M, Takada S, Ito Y, Umezawa A, Kuroda M. Cord Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cell Function is Disrupted in Congenital Diaphragmatic Hernia. American Thoracic Society 2016 international conference 2016. 5.13-18. San Francisco (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤永英志 (Fujinaga Hideshi)

独立行政法人国立成育医療研究センター
周産期・母性診療センター 新生児科 医員

研究者番号：60623733

(2) 連携研究者

梅澤明弘 (Umezawa Akihiro)

独立行政法人国立成育医療研究センター
再生医療センター センター長

研究者番号：70213486