

学内グラント 報告書

平成28年度 学内グラント報告書

新生児慢性肺疾患に対する臍帯血由来幹細胞を用いた再生医療に関する研究

研究代表者 渡邊 貴明 (医学部 総合医療センター 小児科)

研究分担者 難波 文彦 (医学部 総合医療センター 小児科)

緒 言

新生児慢性肺疾患(chronic lung disease, 以下CLD)は未熟児にとって重篤な合併症である。新生児期のみならず、幼・小児期にも呼吸器合併症が持続し、感染症や喘息等で頻回の再入院を必要とする。現在、CLDに有効な治療法はない。

新生仔マウスに高濃度酸素を暴露するCLD動物モデルは、肺胞発達遅延を呈し、申請者らは72時間の高濃度酸素暴露がいかに新生仔肺に対して影響するかを病理学的、分子生物学的に検討してきた¹⁾。

ラットの骨髄由来間葉系幹細胞は高濃度酸素性肺傷害を軽減する。ヒト臍帯血から幹細胞は利用可能であり、低酸素性虚血性脳症やCLDなど新生児疾患の治療にとって魅力的である。臍帯血由来幹細胞、特に臍帯血CD34陽性細胞のCLDに対する治療効果と安全性、臨床応用への展開に関しては検討されていない。申請者らの施設は国内最大の総合周産期母子医療センターで、臍帯血の確保は両親の同意が得られた際には容易であり、またセパックスを用いて、臍帯血から間葉系幹細胞を自動分離するシステムはすでに構築されている。また、臍帯血CD34陽性細胞はLONZAから購入可能である。さらに海外でCLDに対する臨床試験に使用されている臍帯血由来間葉系幹細胞(PNEUMOSTEM, MEDIPOST社)を輸入予定である。

本研究ではCLDマウスモデルに対するヒト臍帯血由来幹細胞の効果・安全性を解析し、最終的には臨床応用を目指すことを目的とした。

材料と方法

(1)CLDマウスモデルの確立と再現性の確認

生後12時間以内の新生仔マウスに高濃度酸素(95%酸素)を96時間暴露する。暴露後、両側肺を摘出し4%パラホルムアルデヒドで定圧固定し、パラフィン包埋する。申請者らは、高濃度酸素暴露は新生仔マウスの肺胞発達遅延を引き起こすことを示してきた¹⁾。本研究ではまず、本モデルの再現性を確認する。HE染色にて肺胞の発達段階(mean linear intercept, 以下Lm)と肺胞壁の厚さを評価する。

(2)新生仔期高濃度酸素暴露によるマウス肺内CD34抗原量の変化

コントロールとして日齢0, 1, 2, 3, 4の高濃度酸素非暴露新生仔マウスをそれぞれ5匹ずつ、高濃度酸素暴露新生仔マウス(CLDマウスモデル)の日齢1, 2, 3, 4をそれぞれ5匹ずつ用意し、肺組織を採取し、蛋白を抽出後、ウェスタンブロットを施行して、CD34抗原の発現量を定量する。1次抗体にはAnti-CD34抗体[MEC 14.7] (ab8158, abcam)、内在性コントロールにはβアクチンを使用し、1次抗体にはbeta Actin antibody[AC-15] (GTX26276, GeneTex)を使用した。

結 果

(1)再現性の高いCLD動物モデルを作製した

生後96時間の新生仔期高濃度酸素暴露によりマウス肺は、肺胞発達の遅延・停止を示す、肺胞の単純化(大きく数の少ない肺胞)を示し、同病理像は少なくとも日齢14まで持続した(図1a)。肺胞の大きさを定量化したLmもルームエア群と比較して、高濃度酸素暴露群で日齢4, 14ともに有意に高値を示した(図1b)。抗酸化物質HO-1及び細胞周期停止因子p21のmRNA発現レベルは過去の報告の通り、ルームエア群と比較して、高濃度酸素暴露により有意に上昇した(図1c)。以上より、当研究室においても再現性の高いCLD動物モデルを作製した。

(2)新生仔期高濃度酸素暴露期間中、マウス肺内CD34抗原量は低下傾向を示した

ウェスタンブロットにて新生仔期高濃度酸素暴露期間中のマウス肺内CD34抗原量は低下傾向を示したが、統計学的な有意差は認めなかった。(図2a, 2b)

考 察

新生仔期高濃度酸素暴露を用いたCLD動物モデルは一般的に再現性の高い動物モデルとして最も頻用されるモデルである。当研究室でも出生後12時間以内から96時間、95%の高濃度酸素暴露することにより、既報通り再現性の高いCLDマウスモデルを作製することができた。同モデルを用いて、今後は新規再生医療・細胞療法や新規薬物療法開発のための前臨床試験を行うことが可能になるであろう。

新生仔期高濃度酸素暴露のマウス肺内CD34抗原量に対する影響は、統計学的有意差はないものの、高濃度酸素暴露により暴露期間中、低下する傾向にあることが分

かった。このことから、高濃度酸素暴露期間中にCD34陽性細胞を投与することは、新生仔期の高濃度酸素性肺傷害、つまりCLD動物モデルにおける肺傷害を軽減する可能性がある。現在、検体数を増やしてこの高濃度酸素暴露による肺内CD34抗原低下の再現性を確認中であり、もし確認されれば、実際に購入済みの臍帯血CD34陽性細胞(LONZA)投与の安全性及び有効性を確認する予定である。

まとめると、本研究において、①再現性の高いCLDマ

ウスモデルを確立し、②新生仔期高濃度酸素暴露により、暴露期間中のマウス肺内CD34抗原量が低下することを示した。

参考文献

- 1) Namba F, Ogawa R, Ito M, Watanabe T, Dennerly PA, et al. Sex-related differences in long-term pulmonary outcomes of neonatal hyperoxia in mice. *Exp Lung Res* 2016; 42(2): 57-65.

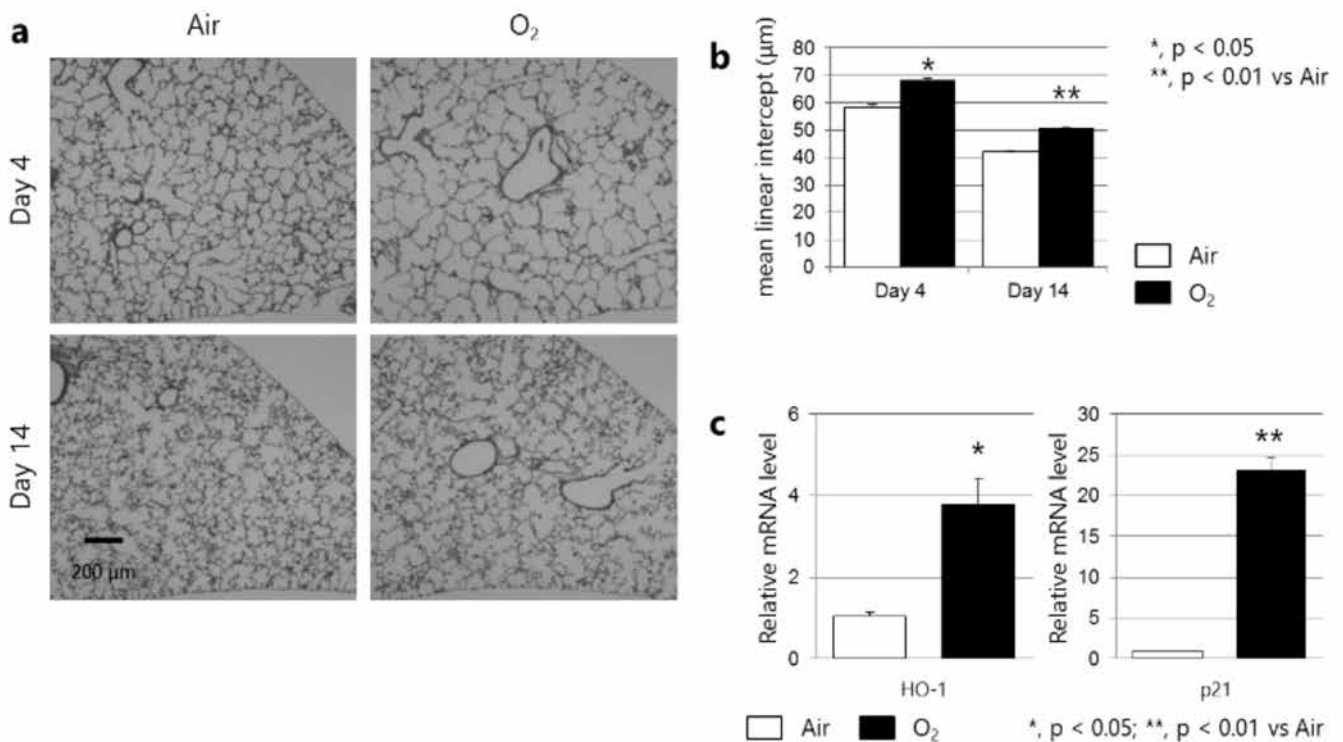


図 1. 高濃度酸素性肺傷害(CLD)モデル作製.

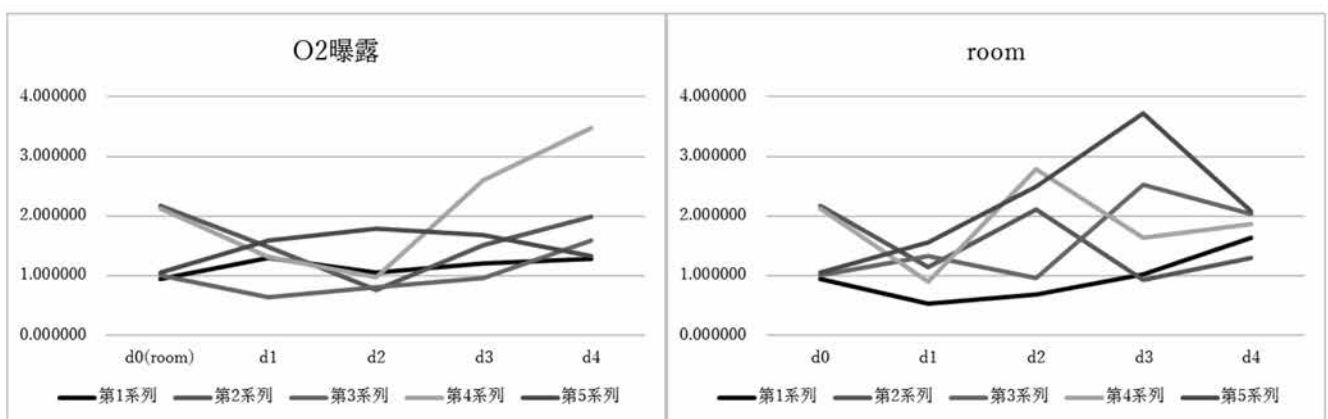


図 2a. CLDマウスモデル.

図 2b. 正常新生仔マウス.

研究成果リスト

論文

- 1) Ito M, Nagano N, Arai Y, Ogawa R, Kobayashi S, Motojima Y, Go H, Tamura M, Igarashi K, Dennery PA, Namba F. Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes. *Pediatr Res* 2017; 81(6): 926-31.
- 2) Go H, La P, Namba F, Ito M, Yang G, et al. MiR-196a regulates heme oxygenase-1 by silencing Bach1 in the neonatal mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 311(2): L400-11.
- 3) Namba F, Ogawa R, Ito M, Watanabe T, Dennery PA, et al. Sex-related differences in long-term pulmonary outcomes of neonatal hyperoxia in mice. *Exp Lung Res* 2016; 42(2): 57-65.
- 4) 難波文彦. 慢性肺疾患のトランスレーショナル研究. 新生児医療 最新トピックNext!, Journal in Journal for Neonatologist, ネオネイタルケア, 2017年7月号, 2017. メディカ出版.

学会発表

- 1) Namba F, Nagano N, Ito M, Ozawa J, Watanabe T, et al. Identification and importance of hyaluronan and proteoglycan link protein 1 in the developing mouse lung. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting*, 2017.5: San Francisco, poster presentation
- 2) Namba F, Ito M, Nagano N, Ozawa J, Watanabe T, et al. A metabolomics approach for studying the effects of hyperoxia on the lungs of neonatal and adult mice using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.

Pediatric Academic Societies Annual Meeting, 2017. 5: San Francisco, poster presentation

- 3) Nagano N, Arai Y, Watanabe T, Miyake F, Matsumura S, Tamura M, Namba F. Human thioredoxin-1 attenuates neonatal hyperoxic lung injury in mice by modulating interleukin-6 gene expression. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting*, 2017. 5: San Francisco, poster presentation
- 4) Ito M, Arai Y, Ogawa R, Go H, Tamura M, Dennery PA, Namba F. Genetic ablation of the Bach1 gene upregulates HO-1 and IL-6 expression in the newborn lung exposed to hyperoxia. *Pediatric Academic Societies Annual Meeting*, 2016. 4: Baltimore, poster presentation
- 5) 渡邊貴明, 田中広輔, 伊藤誠人, 長野伸彦, 小澤純一, 新井幸男, 三宅美由, 松村峻, 難波文彦. 新生仔および成獣マウス肺の高濃度酸素暴露に対する感受性の相違—メタボローム解析を用いて—. 第62回日本新生児育成医学会, 2017. 10: 大宮, 一般口演
- 6) 長野伸彦, 新井幸男, 渡邊貴明, 三宅美由, 松村峻, 田村正徳, 難波文彦. 新生児慢性肺疾患マウスモデルにおける細胞内抗酸化物質チオレドキシンの重要性. 第53回日本周産期・新生児医学会, 2017. 7: 横浜, 一般口演
- 7) 難波文彦, 伊藤誠人, 小川亮, 新井幸男, 渡邊貴明, 他. 新生仔および成獣マウス肺に対する高濃度酸素暴露の影響—キャピラリー電気泳動—質量分析法を用いたメタボローム解析—. 第52回日本周産期・新生児医学会, 2016. 7: 富山, 一般口演
- 8) 郷勇人, 難波文彦, 前田創, 佐藤真紀, 桃井伸緒. 重症気管支肺異形成症モデルマウス肺におけるマイクロRNAプロファイリング. 第52回日本周産期・新生児医学会, 2016. 7: 富山, 一般口演