

令和元年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：2015～2018

課題番号：15K15642

研究課題名(和文)臍帯間葉系幹細胞シートによる先天性横隔膜ヘルニア低形成肺の再生

研究課題名(英文) Regeneration of hypoplastic lung with congenital diaphragmatic hernia using by umbilical cord mesenchymal stem cell sheet

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) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：観察に適したラット胎児肺を用いて、臍帯由来間葉系幹細胞(UC-WJSCs)との共培養による胎児肺の分化誘導を確認した。UC-WJSCsの有用性をLung bud増加率と肺成長に関するmRNAの発現の差で比較検討した。結果はUC-WJSCsとの共培養群でLung budの増加率が有意に高値であった。また、肺血管新生とlung branching morphogenesisに関与する因子であるVEGF、BMP-4、TTF-1の発現がUC-WJSCsとの共培養群に有意に高値であった。しかし、Shhの発現には両群間に有意差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は小児の難治性疾患に対する再生医療の可能性を示す基礎実験となったと考えられる。また、出産後に廃棄される臍帯を再生医療の原資に用いる可能性を示せたことも本研究の学術的、社会的な意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We observed the differentiation induction of fetal rat lung by co-culture with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-WJSCs) and fetal rat lung which suitable for observation. We compared the usefulness of UC-WJSCs by the difference between Lung bud increase rate and expression of mRNA involved in fetal lung growth. The lung bud increment was significantly high in the co-culture group with UC-WJSCs. In addition, the mRNA expressions of VEGF, BMP-4 and TTF-1, which are factors of lung angiogenesis and lung branching morphogenesis, were significantly higher in the co-culture group with UC-WJSCs. However, there was no significant difference between the two groups in the expression of Shh.

研究分野：小児外科

キーワード：再生医療 臍帯由来間葉系幹細胞 横隔膜ヘルニア 肺低形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

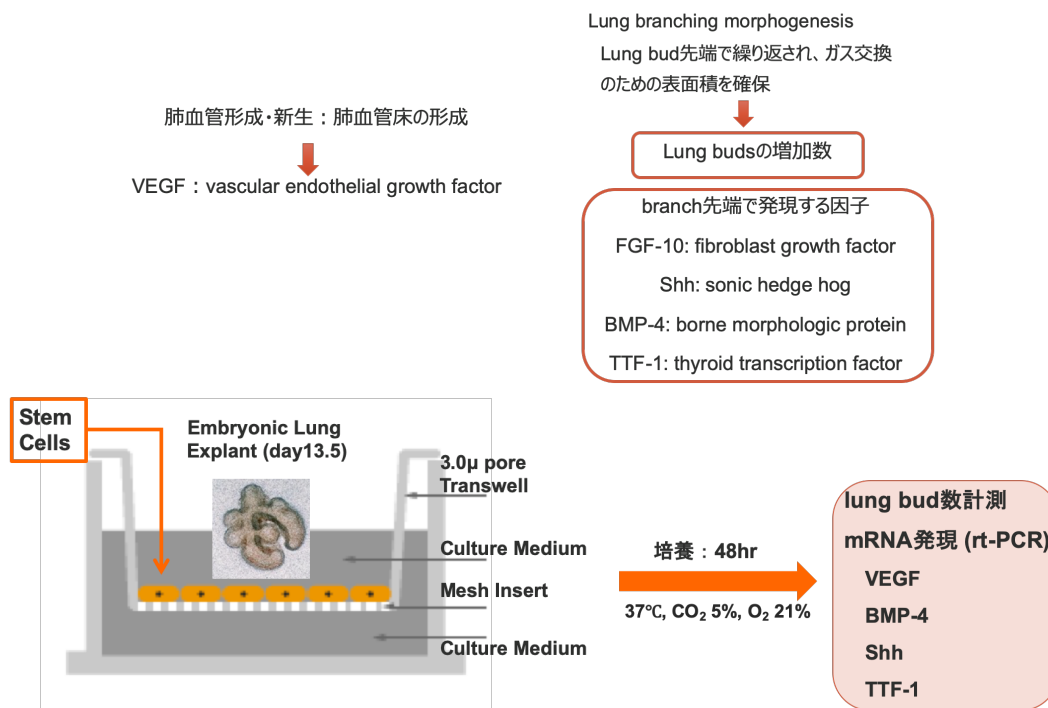
先天性横隔膜ヘルニアの重症例では近年の胎児診断、出生後の管理、術後管理の発展においても、合併する肺低形成や遷延性肺高血圧により予後不良である。肺低形成に伴う合併症の改善が予後改善に繋がるものと考え、臍帯間葉系幹細胞（Umbilical Cord Wharton's Jelly Stem Cells：UC-WJSCs）を用いた再生医療の可能性を探ることが、本研究の背景である。

2. 研究の目的

我々は、UC-WJSCs をシート状に培養し、このシートを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。UC-WJSCs は比較的多量に存在し、採取に際しての倫理的問題が無く、拒絶反応の少ない細胞として注目されている。CDHの肺低形成に対する、UC-WJSCs を用いた再生医療への基礎研究が本研究の目的である。

3. 研究の方法

- ① 購入した UC-WJSCs をメッシュインサート上に培養したのち、妊娠 13.5 日で摘出したラット胎児肺をこのメッシュインサート上に置き、共培養する。48 時間培養し、胎児肺の発育を細胞のないコントロール群と比較する。比較項目は、lung buds の増加率と、肺成長因子の mRNA レベルでの発現の差を検討した。検討した mRNA は VEGF、BMP-4、TTF-1、Shh とした。
- ② 当院での臨床研究の承認を受け、ボランティアの妊婦から出産時の臍帯の提供を受け、臍帯のワルトンゼリーから UC-WJSCs を取り出して、継代培養を行う。
- ③ 継代培養した UC-WJSCs に色素を導入しシート上に培養しマウス肺へ移植し、UC-WJSCs の宿主内での動態を観察する。



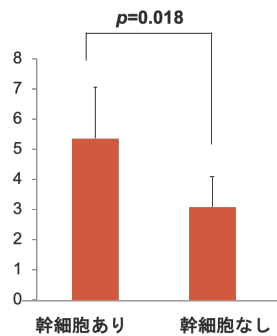
Stem cell : Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Matrix (PromoCell)
10x10⁴cell播種後24hrで共培養開始

Culture Media : DMEM (Sigma, serum free)

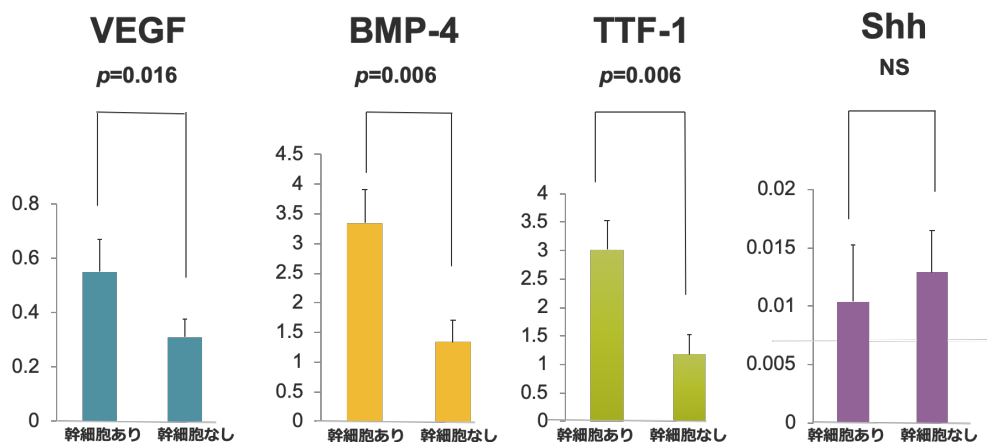
4. 研究成果

- ① : Lung bud の増加率

培養開始時と 48 時間後では、UC-WJSCs と共培養を行なった胎児肺の方が lung bud の増加率が有意に高かった。



② : mRNA の発現



血管形成・新生の指標である VEGF、branching morphogenesis の指標である BMP-4 と TTF-1 は幹細胞ありで有意に発現が高値であった。

Shh で両者に有意差を認めなかった。これは、Shh が lung branching morphogenesis の抑制に関わるものであるため、分枝の盛んな幹細胞ありではなしよりやや発現が少なく有意差が見られなかった。

③ : 臍帯からの UC-WJSCs の取り出しと継代培養は順調に行われた。2-3mm 大に細切したワルトンゼリーから、UC-WJSCs を抽出するには 2-4 週間必要であった。

④ : ③で取り出した UC-WJSCs をコラーゲン製の足場に培養し、マウス肺に移植する実験は、マウスの全身麻酔による開胸手術の維持が困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

- (1) 新開統子、増本幸二、川見明央、田中 尚、相吉 翼、佐々木理人、石川未来、千葉史子、小野健太郎、川上 肇、五藤 周、瓜田泰久、高安 肇
臍帯由来間葉系幹細胞を用いたラット胎児肺の分化誘導に関する展望と課題
第 55 回日本小児外科学会総会 2018 年

〔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：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。