

## 様式(8)

## 論 文 内 容 要 旨

題目 Effects of Transplanted Human Cord Blood- Mononuclear Cells on Pulmonary Hypertension in Immunodeficient Mice and Their Distribution

(免疫欠損肺高血圧モデルマウスに対するヒト臍帯血由来単核球細胞移植の効果)

著者 Mikio Sugano, MD, Homare Yoshida, MD, PhD, Hirotugu Kurobe, MD, PhD, Hiroki Arase, MD, Hajime Kinoshita, MD, PhD, Takashi Kitaichi, MD, PhD, Noriko Sugawara, PhD, Soichiro Nakayama, MD, PhD, Kazuhisa Maeda, MD, PhD, Minoru Irahara MD, PhD, Tetsuya Kitagawa, MD, PhD

Journal of Medical Investigation 2017, 64:43-49

## 内容要旨

## 【背景】

先天性心疾患に起因する肺高血圧は臨床的に問題となることが多い。これまでに、我々は monocrotaline (MCT) 誘発肺高血圧モデルマウスにおいて、経静脈的な骨髄単核球細胞移植が肺高血圧を改善することを見出した。そこで、移植細胞採取の点で、より低侵襲であると考えられる臍帯血細胞移植が骨髄幹細胞移植と同程度に肺高血圧を改善するか検討した。

## 【方法】

肺高血圧モデルマウスは MCT 80mg/kg を 8 週齢免疫欠損マウス(BALB/c Slc-nu/nu)に腹腔内投与して作製した。臍帯血は本研究に対し同意を得られた産婦の分娩時に採取し、単核球細胞濃度を  $1 \times 10^7/0.25\text{ml}$  に調整して、肺高血圧マウスに経静脈的に移植しその効果を経時的に検討した。実験群としてコントロール群 (control)、肺高血圧モデル群(PH model)、臍帯血細胞移植群(CB-cell)、臍帯血血漿移植群(CB-plasma)の 4 群で比較検討した。評価はマウス肺組織中の小肺動脈 (100 $\mu\text{m}$  以下) の中膜/外径比、右室/心筋重量比及び心エコー法を用いた肺動脈血流波形 (acceleration time/ejection time: AT/ET) の解析で行った。また移植細胞の肺や他の組織への分布については、蛍光色素 (CMTMR) でラベ

## 様式(8)

ルした単核球細胞を経時的に組織中で同定した。更に *in vivo* 発光・蛍光イメージングシステム (IVIS) を用いて移植細胞の動態を追跡した。

### 【結果】

- 1) 肺動脈中膜/外径比は細胞投与 4 週後で CB-cell は PH model と比較して有意に低下した( $11.5\% \pm 4.7\%$  vs  $15.8 \pm 4.3\%$ ;  $p < 0.01$ )が、CB-plasma では改善しなかった( $15.1\% \pm 5.4\%$ )。
- 2) 右室心筋重量比は細胞投与 4 週後で、同様に CB-cell が PH model より有意に低かった( $0.27 \pm 0.04$  vs  $0.35 \pm 0.06$ ;  $p < 0.05$ )。
- 3) AT/ET は、臍帯血細胞移植 4 週後に CB-cell( $0.35 \pm 0.01$ )で PH model( $0.24 \pm 0.02$ )、CB-plasma( $0.27 \pm 0.02$ )と比較して有意に改善した(CB-cell vs PH model;  $p < 0.01$ , CB-cell vs CB-plasma;  $< 0.01$ )。
- 4) 蛍光色素でラベルした移植細胞は移植後 10 分から 3 時間の間肺組織中に発現していた。IVIS imaging を用いた観察では同様に蛍光標識した単核球は移植後 10 分から 24 時間の間肺組織内に捕捉されていたが、一旦留まった後に徐々に減少した。一方、肝臓・脾臓では蛍光が徐々に増大し、心臓や小腸などには認められなかった。肺組織中の蛍光を CB-cell と PH model で比較すると、前者では 10 分後から 3 時間後まで減少するが、その後も後者と比較して有意に高いレベルを維持し続けた。

### 【考察】

以上の結果より、免疫欠損マウスの MCT 誘発肺高血圧モデルにヒト臍帯血由来の単核球細胞を移植すると、肺高血圧が改善するが、その効果発現には血清成分ではなく臍帯血細胞自体が必要であることを示した。また、移植細胞が一定時間肺組織に留まることが、肺血管床の改善効果に寄与している可能性があると考えられるが、今後の作用機序解明が必要である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	乙医第 <b>1757</b> 号	氏名	菅野幹雄
審査委員	主査 佐田政隆 副査 西岡安彦 副査 常山幸一		

題目 Effects of Transplanted Human Cord Blood-Mononuclear Cells on Pulmonary Hypertension in Immunodeficient Mice and Their Distribution  
 (免疫欠損肺高血圧モデルマウスに対するヒト臍帯血由来単核球細胞移植の効果)

著者 Mikio Sugano, Homare Yoshida, Hirotsugu Kurobe, Hiroki Arase, Hajime Kinoshita, Takashi Kitaichi, Noriko Sugasawa, Soichiro Nakayama, Kazuhisa Maeda, Minoru Irahara, and Tetsuya Kitagawa  
 2017年発刊 Journal of Medical Investigation 64巻43ページから49ページに発表済  
 (指導教授 丹黒 章)

要旨 申請者らはこれまで monocrotaline (MCT) 誘発肺高血圧モデルマウスにおいて骨髄単核球細胞移植が肺高血圧を改善することを見出した。今回、臍帯血細胞移植に骨髄幹細胞移植と同様の効果があるか検討する目的で以下の実験を行った。

肺高血圧モデルマウスは 8 週齢免疫欠損マウス(BALB/c Slc-nu/nu)に MCT 80mg/kg を腹腔内投与し作製した。臍帯血(cord blood, CB)は本研究に同意を得られた産婦の分娩時に採取し、単核球細胞濃度を  $1 \times 10^7 / 0.25\text{ml}$  に調整して経静脈的に移植した。肺高血圧モデル群(pulmonary hypertension model, PH model)、臍帯血細胞移植群(CB-cell)、臍帯血血漿移植群(CB-plasma)とコント

ロール群 (control) の 4 群を作成、評価は細胞投与 4 週後のマウス肺組織中の小肺動脈 (100 $\mu$ m 以下) の中膜/外径比、右室/心筋重量比及び心エコーによる肺動脈血流波形 (acceleration time/ejection time: AT/ET) で行った。移植細胞の組織への分布は蛍光色素でラベルした単核球細胞を経時的に同定した。更に *in vivo* 発光・蛍光イメージングシステム (In Vivo Imaging System, IVIS) を用いて移植細胞の動態を追跡した。

得られた結果は以下の如くである。

- 1) 肺動脈中膜/外径比は CB-cell は PH model と比較し有意に低下したが、CB-plasma では改善しなかった。
- 2) 右室心筋重量比は CB-cell が PH model より有意に低かった。
- 3) AT/ET は CB-cell で PH model、CB-plasma と比較して有意に改善した。
- 4) 蛍光色素でラベルした移植細胞は移植後 10 分から 3 時間、肺組織中に確認された。肺組織中の蛍光は CB-cell で 10 分後から 3 時間後まで減少するが、その後も PH model と比較して有意に高いレベルを維持し続けた。
- 5) IVIS imaging を用いた観察でも単核球は移植後 10 分から 24 時間肺内に捕捉され、一旦留まった後に徐々に減少した。

以上の結果から MCT 誘発肺高血圧モデルに臍帯血由来の単核球細胞を移植すると肺高血圧が改善し、効果発現には血漿成分ではなく臍帯血細胞自体が必要であること、移植細胞が一定時間肺組織に留まることが肺血管床の改善効果に寄与している可能性が示唆された。本知見は肺高血圧症における臍帯血の作用機序解明に大きく寄与するもので学位授与に値すると判定した。