

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15514

研究課題名(和文) 体性多能性幹細胞(Muse細胞)による虚血・再灌流性肺傷害の治療

研究課題名(英文) Treatment of Lung Ischemia-reperfusion injury by Muse cells

研究代表者

岡田 克典 (OKADA, Yoshinori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90323104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：虚血再灌流性肺傷害は肺移植後の重大な合併症である。Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell (Muse細胞)の投与が虚血再灌流性肺傷害を改善するかどうかをラット左肺虚血・再灌流モデルを用いて検討した。Muse細胞、Mesenchymal stem cell (MSC)、PBSをそれぞれ2時間の虚血・再灌流直後に肺動脈から投与した。Muse細胞投与により再灌流後3日目および5日目にMSCを上回る動脈血酸素分圧、肺コンプライアンスならびに病理学的スコアの改善がみられ、Muse細胞が虚血再灌流性肺傷害の改善に寄与する事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Lung ischemia-reperfusion injury is a signify complication after lung transplantation. We examined the effect of Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell (Muse cells) on ameliorating lung ischemia-reperfusion injury in a rat model. Human Muse cells (Muse group), human mesenchymal stem cells (MSC group) or PBS (Vehicle group) were infused into the left pulmonary artery after 2-hour ischemia and subsequent reperfusion. On days 3 and 5 after reperfusion, the Muse group showed the most favorable arterial blood gas, left lung compliance and histological scores for IR injury among 3 groups. The present study indicated that administration of Muse cells ameliorate lung ischemia-reperfusion injury in a rat model.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 虚血・再灌流傷害 間葉系幹細胞 Muse細胞

1. 研究開始当初の背景

肺移植は終末期肺疾患患者に対する有効な治療法として確立しており、今日までに4万例を越す手術が欧米先進国を中心に行われている。しかし、国際登録報告による術後3ヶ月以内の死亡は今日なお12%と高率であり、早急な改善が求められている。肺移植後急性期の死因の中で最も高頻度なものは移植肺機能不全であり、臨床的には肺水腫、低酸素血症および肺血管抵抗上昇を特徴とする。この原因は、ドナーにおける脳死、肺保存中および移植術中の虚血さらにはレシピエントにおける再灌流という一連の過程において移植肺に加わる様々なストレスであるとされており、この肺傷害は一般に虚血・再灌流傷害と総称されている。申請者らは、肺移植後の虚血・再灌流傷害の予防・治療戦略においては、炎症抑制や肺循環改善のみならず、肺血管内皮細胞/肺胞上皮細胞の再生という概念が必要であり、臓器移植の分野においても再生医療の応用をいち早く検討すべきではないかと考えた。Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse)細胞は、成体の間葉系組織である皮膚、骨髄、脂肪組織などに存在し、腫瘍性を示さない新たなタイプの多能性幹細胞である。Muse細胞は、自己複製能と同時に1細胞から3胚葉性の細胞への分化能を有し、生体に投与すると損傷組織に遊走・生着し、組織に応じて自発的に分化をし、修復に寄与することが劇症肝炎、脊髄損傷、皮膚損傷、筋変性モデル等で確認されている。さらに、Muse細胞は、間葉系幹細胞同様に抗炎症ならびに細胞増殖に関わる物質を分泌して組織の修復を促すいわゆる trophic 作用も有する事が報告されている。しかし、Muse細胞投与の効果が肺傷害モデルにおいて検討されたことは未だなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Muse細胞が、ラット虚血・再灌流性肺傷害モデルにおいて、肺の細胞の修復と機能改善に寄与するか否かを検討することである。虚血・再灌流後急性期にラット肺は肺水腫を呈し、その程度が高度な場合には慢性期においても機能不全が残存する。これは病理学的には、肺組織の線維化、無気肺、あるいは気腫性変化として表れ、生理学的にはコンプライアンスとガス交換能の低下および肺血管抵抗の上昇として表現される。虚血・再灌流後に Muse 細胞を投与することにより、これらの病理学的、生理学的変化が改善されるか否か、もしそうだとした場合、Muse細胞が、どのような機序によってその効果をもたらすかを検討する。

3. 研究の方法

【Muse細胞ならびに間葉系幹細胞の準備】

ヒト間葉系幹細胞を培養、継代し、4-6 継代目の細胞を用いる。抗 Stage-Specific Embryonic Antigen-3 (SSEA-3) rat IgM 抗体を一次抗体、抗 rat IgM conjugated FITC (fluorescein isothiocyanate) 抗体を二次抗体として用いて、FACS (fluorescence activated cell sorting) で SSEA-3 陽性細胞を Muse 細胞として分離する。細胞は 3.0×10^6 細胞/1ml PBS となるように調整し、投与細胞数は予備実験を行って決定する。ヒト間葉系幹細胞を培養、継代し4-6 継代目の細胞を用いる。 3.0×10^6 細胞/1ml PBS となるように調整し、予備実験により決定された Muse 細胞投与数と同数の細胞を投与する。

【実験群】

手術操作を行わない Normal 群、肺門クランプを行わず開胸および左肺門剥離操作のみ行う Sham operation 群、虚血・再灌流後に生理食塩水を投与する No treatment 群、虚血・再灌流後に間葉系幹細胞を投与する MSC 群、虚血・再灌流後に Muse 細胞を投与する Muse 群の計5群を設ける。各群 n = 5 で評価する。

【虚血・再灌流性肺傷害モデルの作成と Muse 細胞の投与】

生後 7-8 週、体重 200-250 g の雄性 Sprague-Dawley ラットを用いる。三種混合麻酔薬の腹腔内投与で麻酔し、14G 血管カテーテルを気管内挿管し、小動物用人工呼吸器に接続する。吸入麻酔薬イソフルランを用いて麻酔を維持する。ラットを右側臥位とし、左第5肋間後側方切開で開胸する。左肺門を十分に剥離した後、50単位のヘパリンを左奇静脈より投与する。吸気終末で左肺動脈、左肺静脈および左主気管支を micro-surgery 用血管クリップで遮断する。虚血・再灌流傷害を惹起するための肺門遮断時間は急性実験の報告では2時間としているものが多いが (Kaaji NP et al. Eur J Cardiothorac Surg 27: 774-782, 2005)、本研究では虚血・再灌流後28日までの慢性期の肺傷害の程度を評価することを目的とするため、これまでの予備実験の結果を踏まえて虚血時間を3時間に設定する。遮断を解除した直後に、生理食塩水、MSC、Muse細胞をそれぞれ左肺動脈より投与し、閉創する。再灌流3日、7日、14日、28日後にラットに全身麻酔を導入して気管切開口から14G血管カテーテルを挿入して気管に結紮固定する。正中切開で開胸し、以下のような評価を行って虚血・再灌流性肺傷害の程度を各群間で比較するとともに、Muse細胞の肺組織構成細胞への分化を検索する。

【血液ガス分析】

正中切開で開胸後、右肺動脈を3-0絹糸で結紮し、FiO₂ 1.0、一回換気量1ml/体重100g、呼吸数80/分、呼気終末陽圧2cmH₂Oで5分間換気させた後、上行大動脈から採血を行って血液ガス分析を行う。

【肺コンプライアンスの評価】

右主気管支を遮断し、換気回数を30回/分に設定し、分時換気量を40mlから段階的に200mlまで上げ、各換気量における換気圧を計測する。一回換気量を個体重量で除して調整し、換気量/換気圧(ml/kg/cmH₂O)を求め、肺コンプライアンスとして各群間で比較する。

【虚血・再灌流性肺傷害の病理学的評価】
管から4%パラホルムアルデヒドを10cmH₂Oで注入し、左肺を固定しパラフィン切片を作成する。ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、虚血・再灌流に伴う急性肺傷害の程度(Okada Y, et al. *Transplantation* 66: 1132-1163, 1998)ならびに慢性期の変化である肺組織の線維化、無気肺、気腫性変化について過去の報告(Kaaji NP et al. *Eur J Cardiothorac Surg* 35: 304-312, 2009)を参考にグレーディングし、各群間で比較する。

【摘出肺の免疫組織学的検索】

摘出肺組織の一部を4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結標本を作成する。ヒト Muse 細胞を抗 human golgi 抗体で染色し、障害肺組織における Muse 細胞の分布を検討する。また肺組織標本を型肺胞上皮細胞のマーカーである抗 podoplanin 抗体、抗 caveolin-1 抗体、型肺胞上皮細胞のマーカーである抗 pro-surfactant protein C 抗体、抗 surfactant protein A 抗体、血管内皮マーカーである抗 CD31 抗体、抗 von Willebrand factor 抗体で免疫組織化学染色し、抗 human golgi 抗体との二重染色で、それぞれ Muse 細胞がヒト型肺胞上皮細胞、ヒト型肺胞上皮細胞、ヒト肺血管内皮へ分化しているか否かを検討する。

4. 研究成果

本研究は、新規多能性幹細胞である Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell (Muse 細胞)のもつ抗炎症作用や組織修復作用といった trophic 効果に着目し、Muse 細胞の投与が肺虚血・再灌流傷害の改善に寄与するのかどうか、またそれはどのような機序によってもたらされるのかについてラット肺虚血・再灌流傷害モデルを用いて検討したものである。

研究の結果から、Muse 細胞を投与することによって間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC)を上回る肺の機能的、組織学的な改善が得られることが明らかとなった。生理学的な効果については、Muse 群において、vehicle 群、MSC 群に比べて、右肺動脈クランプ後に測定した動脈血分析の結果から計算される PaO₂/FiO₂ ならびに A-aDO₂ が改善していること、左肺のコンプライアンスが改善していることによって示された。これらの効果は、虚血・再灌流後3日目に顕著にみられ、5日目でも維持されていた。また、組織学的には、虚血・再灌流後3日目で、Muse 群において、vehicle 群、MSC 群に比べて、肺胞内浮腫、肺胞内出血、肺毛細管うっ血、好

中球浸潤の全てのスコアが軽減している結果が得られた。その機序に関して、Muse 細胞投与群における II 型肺胞上皮細胞の増殖能の上昇、アポトーシス細胞の減少、IL-6、keratinocyte growth factor、B-cell lymphoma-2 ならびに phospho-protein kinase B などの細胞増殖・抗アポトーシスに関連する蛋白の発現が関与している可能性が示された。また、Muse 細胞は、MSC に比べより多く傷害組織に遊走する事が免疫組織学的検索で明らかになるとともに、in vitro の遊走実験によって、Muse 細胞が MSC に比べて、虚血・再灌流傷害モデルラットから採取した血清に対するより高い遊走能を有している事が示された。これまで MSC 投与による肺虚血・再灌流傷害モデルの改善効果は報告されているが、Muse 細胞を肺虚血・再灌流傷害モデルに投与し、有効性を示したのは本研究が初めてである。さらに、本研究は Muse 細胞を投与することにより従来報告されてきた MSC を上回る改善効果が得られることを示した。本研究により、臨床現場でしばしば経験する肺虚血・再灌流傷害の軽減に Muse 細胞の投与が有効であることが明らかになり、今後の展望として肺虚血・再灌流傷害に対する Muse 細胞による細胞治療の臨床応用およびそれによる肺移植成績の向上の可能性が示唆された。

なお、虚血・再灌流後慢性期、すなわち 14 日、28 日後の結果について、現在検討中であり、今後も引き続き研究を継続していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yabuki H, Wakao S, Kushida Y, Dezawa M, Okada Y. Beneficial pleiotropic effects of multi-lineage differentiating Stress Enduring cell on acute lung ischemia-reperfusion injury. ISHLT 2017 37th Annual Meeting and Scientific Session San Diego (USA), April 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 克典 (OKADA Yoshinori)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：90323104

(2) 研究分担者

星川 康 (HOSHIKAWA Yasushi)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：90333814

渡邊 龍秋 (EATANABE Tatsuaki)
東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師
研究者番号：70636034

(3) 連携研究者

出澤 真理 (DEZAWA Mari)
東北大学・医学部・教授
研究者番号：50272323

(4) 研究協力者

矢吹 皓 (YABUKI Hiroshi)
東北大学・医学系研究科・大学院生