

令和元年9月3日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05430

研究課題名(和文) 肺移植後移植片慢性機能不全に対する新規細胞治療の基礎的研究

研究課題名(英文) The effect of a novel cell therapy for chronic lung allograft dysfunction in animal models

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス慢性拒絶反応モデルを用いて、抗炎症作用ならびに組織修復作用をもつ多能性幹細胞であるMultilineage-differentiating Stress Enduring (Muse)細胞の投与が、肺移植後の閉塞性気道病変の形成を抑制するかどうかについて検討した。BALB/cマウスをドナー、C57BL/6マウスをレシピエントとするマウス肺内気管移植モデルを作成し、移植後3日にMuse細胞、間葉系幹細胞(MSC)、PBSを投与した。移植後28日でグラフトを採取し気管内腔の閉塞率を検索したところ、MuseとMSC群では、PBS群に比較して有意に閉塞率が低下していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺移植は終末期呼吸器疾患に対する有効な治療法として確立しているが、術後5年生存率は50～60%と未だ十分に満足できるものではない。肺移植後慢性期の死因で最も頻度は高いものは、慢性拒絶反応によって生ずる閉塞性細気管支炎症候群である。本研究における細胞治療の効果に関わる成果は、難治性合併症である肺移植閉塞性細気管支炎症候群に対する新たな治療法の開発につながる可能性がある。今後は、細胞治療の効果のメカニズムの検討、大動物を用いた細胞治療の効果の検討へ研究を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：We examined whether administration of Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells, pluripotent stem cells with anti-inflammatory and tissue-repairing effects, suppresses formation of obliterative bronchiolitis after lung transplantation in a mouse chronic rejection model. Intra-pulmonary tracheal transplantations were performed between a major histocompatibility antigen mismatched model (BALB / c C57BL / 6). Muse cells, mesenchymal stem cells (MSCs) and PBS were administered on day 3 after transplantation. The graft was harvested on day 28 and the occlusion rate in the tracheal lumen was examined. It was revealed that the occlusion rate was significantly reduced in the Muse and MSC groups compared to the PBS group.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺移植 閉塞性細気管支炎 間葉系幹細胞 Muse細胞 肺内気管移植モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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、これまで欧米先進国を中心に累計約5万例の患者が移植手術を受けている。本邦においても肺移植施行例数は年々増加傾向にあり、2014年末までに脳死肺移植238例、生体肺移植165例が施行され、これまで国際登録を上回る成績が報告されている。しかし一方で、国際登録におけるレシピエントの5年生存率は約50%にとどまっており、未だ満足できるものではない。慢性拒絶反応を主たる原因とする肺移植後移植片慢性機能不全(chronic lung allograft dysfunction: CLAD)は、移植後1年以上経過したレシピエントの死因の約50%を占め、肺移植レシピエントの長期予後を規定する因子である。CLADには様々な病態が混在するが、その中の約60%の症例は閉塞性細気管支(bronchiolitis obliterans: BO)の病態で発症する。

BOは、同種免疫反応すなわち主にリンパ球による細気管支上皮細胞傷害とこれに引き続き生ずる細気管支内腔への反応性線維性肉芽組織増生がその本態であると考えられている。理論的には全身性の免疫抑制療法強化が予防・治療に有効と考えられるが、他方で免疫抑制プロトコルの強化は感染症や薬剤性臓器障害の頻度を上昇させるため、実際にはレシピエントの予後をむしろ悪化させるというジレンマがある。BOに対する有効な予防法・治療法は未だ確立されていないのが現状であり、新しい概念に基づく新規治療法の開発が求められている。

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell; MSC)は骨髄などに存在し、筋肉、骨、血管など様々な細胞への分化能を持つ幹細胞である。近年の研究により、MSCはこのような幹細胞としての能力を持つ一方で、サイトカイン、ホルモン等のパラクリン作用を介して間葉の微少環境を調節していることが明らかになった。申請者らは、MSCが分泌する液性因子の多くが免疫・炎症抑制作用を持つ点に着目し、MSCを用いて肺移植後の新しい免疫抑制法を開発できないかと考え、ラット肺移植モデルを用いて研究してきた。その結果、肺移植後にMSCを投与する事により、移植肺急性拒絶反応に伴う炎症反応すなわち移植片への単核球浸潤、浮腫ならびに肺胞内出血などの所見がコントロール群と比べ軽減されることが明らかになった。臨床肺移植において、急性拒絶反応のエピソードはBO発症の最も重要な危険因子であることから、肺移植レシピエントに対するMSCの断続的な長期投与は、BOの発症を抑制する可能性がある。一方、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MSCの中の約1%を占め、幹細胞としての能力ならびに抗炎症・組織修復に関わる因子の分泌能力がきわだって高い細胞であることがこれまでの研究で明らかになっている。申請者らは、マウス虚血・再灌流性肺傷害モデルを用いて、Muse細胞の投与が虚血・再灌流傷害を顕著に抑制することを報告している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、間葉系幹細胞(MSC)ならびにMuse細胞を肺移植レシピエントに投与することで、肺移植レシピエントにおける閉塞性細気管支炎(BO)の発症が抑制されるか否かを、マウス肺移植後BOモデル(肺内気管移植モデル)を用いて検討することである。MSC投与群、Muse細胞投与群、PBS投与群(コントロール群)を設定し、グラフト内腔の線維性肉芽組織による閉塞率を比較検討する。また、細胞治療の作用機序を明らかにするために、グラフトにおける炎症性サイトカインの発現、制御性T細胞の割合などにつき検索する。

### 3. 研究の方法

閉塞性細気管支炎(BO)の動物モデルとして広く認知されているマウス肺内気管移植モデルを用いる。BALB/cマウスをドナー、C57BL/6マウスをレシピエントとする組織適合性抗原完全不一致の組み合わせで肺内気管移植を行う。移植直後にヒト間葉系幹細胞、Muse細胞、PBS(コントロール)を静脈内投与する。移植後28日目にグラフトを採取して、気管グラフト内の線維性肉芽組織による閉塞性気道病変の形成の程度を形態学的に評価するとともに、線維化の指標として組織中のヒドロキシプロリンの定量を行う。組織中の炎症性、抗炎症性サイトカインの発現を定量RT-PCR法で測定するとともに、抹消血中の制御性T細胞の多寡をフローサイトメトリーで検索する。

### 4. 研究成果

BALB/cマウスをドナー、C57BL/6マウスをレシピエントとするマウス肺内気管移植モデルを作成した。マウス肺内気管移植モデルは肺移植後の慢性拒絶反応モデルとして確立しており、移植した気管支内腔に線維性肉芽組織による閉塞性気道病変を形成、その病理像はヒト肺移植後の閉塞性細気管支炎に類似していた。移植直後にMuse細胞、MSC、PBSを投与する3群を作成し、移植後28日目でグラフトを採取し気管内腔の閉塞率を検索したところ、MSC群ならびにMuse群では、PBS群に比較して有意に気管グラフト内腔の閉塞率が低下していた。また、これら細胞治療の閉塞性気道病変形成抑制効果は、投与する細胞数が多いほど大きくなる傾向にあった。MSCならびにMuse細胞は、抗炎症、抗アポトーシス、組織修復などに関与する様々な因子を分泌することが先行研究により明らかになっているが、本研究における細胞治療の効果にどのような因子が関与するのかについては現在検討中である。本研究の成果は、肺移植後の難治性合併症である閉塞性細気管支炎症候群に対する新たな治療法の開発につながる可能性

がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：野田雅史

ローマ字氏名：Noda Masafumi

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：70400356

研究分担者氏名：松田安史

ローマ字氏名：Matsuda Yasushi

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：00455833

研究分担者氏名：渡邊龍秋

ローマ字氏名：Watanabe Tatsuaki

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：70636034

研究分担者氏名：大河内眞也

ローマ字氏名：Okouchi Shinya

所属研究機関名：東北大学

部局名：環境安全推進センター

職名：講師

研究者番号（8桁）：40375035

研究分担者氏名：後藤昌史

ローマ字氏名：Goto Masafumi

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：50400453

(2)研究協力者

研究協力者氏名：出澤真理

ローマ字氏名：Dezawa Mari

研究協力者氏名：矢吹 皓

ローマ字氏名：Yabuki Hiroshi

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。