

令和元年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05498

研究課題名(和文) 侵襲時再生治療の新たな展開：幹細胞移植と新規若返り因子・長寿ホルモン補充の有効性

研究課題名(英文) A novel development of regenerative therapy following acute systemic inflammatory response syndrome: the effects of transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells and new rejuvenation factor

研究代表者

小倉 裕司 (Ogura, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70301265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、全身性炎症反応に対する新たな制御法として、(1)新規若返り因子GDF(growth differentiation factor)11の有効性を評価すること、(2)骨髄由来各種幹細胞移植のメカニズムをさらに検討することであった。(1)敗血症モデルに対して、GDF11の投与を行ったが、生存率の有意な改善は得られなかった。(2)外傷(クラッシュ症候群)と熱中症の2つの急性期全身炎症モデルにおいて、骨髄由来単核球細胞(BMMNCs)移植の有効性を検討した結果、BMMNCs移植は、過剰な炎症反応を有意に抑制し、血管内皮傷害・臓器障害や生命予後を著明に改善する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性炎症反応は、種々の過大侵襲により引き起こされ、しばしば制御困難となる。本研究では、急性期全身炎症反応に対する新規若返り因子GDF11および骨髄単核球細胞移植の効果を評価した。本研究結果をもとに将来的には侵襲に伴う様々な全身性炎症反応患者への有効な細胞移植治療が確立でき、さらなる臨床応用につながれば、急性期重症病態患者、およびその家族の病苦を劇的に軽減し、医療経済の面でも社会に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) following major insults often leads to multiple organ dysfunction syndrome. Bone marrow-derived mononuclear cells (BMMNCs) secrete anti-inflammatory proteins and have protective effects against acute inflammation. The objectives of this study were to evaluate the effects of GDF(growth differentiation factor) 11, a new rejuvenation factor, on SIRS following sepsis, and to clarify the mechanism how BMMNCs attenuate SIRS induced by severe heatstroke or crush injury.

In the results, GDF11 administration did not affect the survival in sepsis model. On the other hand, transplantation of BMMNCs significantly attenuated acute systemic inflammation and vascular endothelial injury, reduced organ dysfunction, and improved survival in heatstroke or crush injury model. Especially, transplantation of BMMNCs significantly suppressed the elevations in serum pro-inflammatory mediators. These findings may provide a possible therapeutic strategy against SIRS.

研究分野：救急医学、集中治療医学、外科学、侵襲学

キーワード：全身性炎症反応 臓器障害 若返り因子 GDF11 再生医療 幹細胞 細胞移植 骨髄単核球細胞

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

1. 研究開始当初の背景

重症外傷、敗血症、ショックなどの重度侵襲に伴い、全身性炎症反応が引き起こされ、重症例では多臓器障害に進行する。多臓器障害に陥ると治療に難渋するだけでなく救命が困難となり、また集中治療に莫大な治療費を要する。全身性炎症反応の主要な標的として血管内皮が注目されており、多臓器障害では血管内皮傷害の進行が顕著となることから、我々は、血管内皮の再生応答を効果的に制御する必要があると考えている。近年、全身性炎症反応の治癒機転には多くの修復・再生過程が関与することが明らかとなり、侵襲にともなう再生応答を効果的に制御して多臓器障害の進行を防ぐことが急務と考えられる。我々は、重度侵襲にともなう全身性炎症反応、多臓器障害の進行をいかに制御すべきかをテーマとして、世界に先駆けて再生応答、再生治療に注目した研究を進めてきた。その結果、(1)血管内皮の再生応答は、侵襲にともなう臓器障害の進行過程および修復過程で重要な役割を演じる可能性、(2)多臓器障害モデルにおいて、骨髄間葉系幹細胞や骨髄由来単核球細胞の血管内細胞移植が著明な抗炎症作用、血管内皮保護作用を発揮し、臓器障害及び生存率を有意に改善する可能性、(3)多臓器障害モデルにおいて、腸管上皮細胞の再生は抑制されており、腸管上皮幹細胞の制御が腸管機能不全の有効な治療になる可能性、などを報告してきた。

2014年、老齢マウスの再生能力が若年マウスの血液により劇的に回復することが明らかとなった(Sinhaら, Science誌)。このことは、若いマウスの血液中に“若返り因子”が含まれることを示唆する。中でも、GDF (growth differentiation factor) 11は、初めて証明された新規若返り因子としてミトコンドリア機能や再生能を保ち、老齢マウスの身体機能や脳機能を有意に改善した。近年、老化は“慢性炎症”(inflammaging)と考えられており、全身性炎症反応の進行過程では、ミトコンドリア機能障害、幹細胞機能不全、血管内皮細胞傷害、各種代謝異常など老化に特徴的な所見が急速に顕在化する。我々は、全身性炎症反応の進行過程を“急性老化”として捉え、その効果的な制御法として、新規若返り因子 GDF11 の補充療法に思い至った。特に、全身性炎症反応に伴うミトコンドリア機能障害、幹細胞機能不全を改善し、再生・修復応答を保つことで、臓器障害を劇的に改善する可能性があると考え、本研究を計画した。

今日まで全身性炎症反応に対する新規若返り因子 GDF11 投与の効果の評価した報告は皆無であり、有効性が本研究で明らかとなれば、全身性炎症反応に対する画期的なアプローチ法として新たな臨床応用の道が開ける。全身性炎症反応に対する有効な若返り因子補充療法が開発できれば、将来的には重症患者、家族の病苦を劇的に軽減し、医療経済上も社会に大きく貢献する。未だ有効なアプローチ法が存在しない全身性炎症反応に対する新たな治療戦略として、新規若返り因子 GDF11 補充療法の有効性を複数(投与回数、投与経路)の投与法により比較検討した国内外の報告はなく、本研究が初めてである。また、敗血症、熱傷、熱中症以外の重症救急病態においても、若返り因子 GDF11 補充療法が応用できる可能性が広がり、臨床的意義は大きい。多臓器障害に対する細胞移植の効果を詳細に検討し、さらに GDF11 補充の効果の評価することで、侵襲にともなう臓器障害の進行を防ぐ画期的なアプローチ法が開ける可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮および腸管上皮の修復・再生効果をもつ幹細胞移植療法のメカニズムを詳細に検討し、新規若返り因子の補充療法の有効性も評価するため、以下の2点に目標を絞り実施した。

(1) 外傷、熱中症、敗血症の異なる多臓器障害モデルにおいて、骨髄間葉系幹細胞、骨髄由来単核球細胞の細胞移植療法の有効性を評価し、さらに新規若返り因子 GDF11 補充療法の効果も評価した。

(2) 外傷、熱中症各モデルにおいて有効性を発揮した骨髄由来単核球細胞の細胞移植療法に注目し、特に血管内皮や主要臓器における効果を詳細に検討して明らかにした。

3. 研究の方法

(研究1) 敗血症モデルにおける GDF11 投与の有効性を評価するため、発症急性期に GDF11 の

投与を行い、異なる3種類の投与方法により臓器障害・生存率の改善が得られるかを比較検討した。

マウス敗血症モデルの作成は、14週齢のマウスを使用し、盲腸結紮穿刺(21ゲージ針)により行った。敗血症マウスに対して新規若返り因子GDF11投与を以下の3つの方法で施行した。

盲腸結紮穿刺モデルに対して盲腸結紮穿刺直後にGDF11(1mg/kg)を腹腔内に単回投与した。

盲腸結紮穿刺モデルに対してGDF11(1mg/kg)投与を盲腸結紮穿刺直後から腹腔内に連日7日間投与した。

盲腸結紮穿刺モデルに対して盲腸結紮穿刺直後にGDF11(1mg/kg)を尾静脈から経静脈的に単回投与した。

から どの投与方法においても、GDF11非投与群と投与群を比較検討し、両群の間に生存率の差があるかどうか生存曲線を用いて評価した。

(研究2)外傷(クラッシュ症候群)と熱中症の2つの急性期炎症モデルにおいて、骨髄由来単核球細胞(BMMNCs)移植の有効性をさらに検討した。健常ラットの大腿骨、脛骨より骨髄液を採取し、BMMNCsを単離した後、各モデルに静注投与した。

なお、ラットクラッシュ症候群モデルでは、ラットを仰臥位とし、両下肢の圧挫には専用器具を用い、両下肢にはそれぞれ2.5kgの重りと専用器具の板の計3.0kgで6時間圧迫した。圧迫中は左外頸静脈ルートより生理食塩水(1ml/kg/hr)を持続投与した。圧迫解除1時間前からは大量輸液(生理食塩水10ml/kg/h)を持続投与し、圧迫解除後3時間まで継続した。

一方、熱中症モデルの作成は、全身麻酔下に直腸温を連続測定しながら、小動物用保温機(BWT-100A; Bio Research Center)を用いて暑熱暴露を開始した。加温中の直腸温は5分間で1.0度上昇するように、また直腸温が41.8度に到達した時点から30分間は41.8度±0.2度を維持するように、保温機の温度を調整した。

4. 研究成果

(研究1)敗血症モデルにおけるGDF11投与の有効性を評価するため、発症急性期にGDF11の投与を行い、非投与群と生存率を比較・評価した結果を示す。

最初に、盲腸結紮穿刺モデルに対して、盲腸結紮穿刺直後にGDF11(1mg/kg)を腹腔内に単回投与の効果を確認した結果、GDF投与群の死亡率は4/12、非投与群の死亡率は2/12であり、生存率の有意な改善は得られなかった。

次に、GDF11の複数回投与を考慮し、盲腸結紮穿刺モデルに対してGDF11(1mg/kg)投与を盲腸結紮穿刺直後から腹腔内に連日7日間投与した結果、GDF11投与群の死亡率は9/18、非投与群の死亡率は5/18であり、生存率の有意な改善は得られなかった。

さらに、GDF11の静脈内投与を考慮し、盲腸結紮穿刺直後にGDF11(1mg/kg)を尾静脈内に単回投与して非投与群と比較検討した結果、GDF11投与群の死亡率は3/6、非投与群の死亡率は4/7であり、生存率の有意な改善は得られなかった。

以上より、盲腸結紮穿刺モデルにおける生存率に対するGDF11投与の有効性を示すことはできなかった。今後、より長期間にわたるGDF11投与や盲腸結紮穿刺前のGDF11投与の有効性などを評価する余地はあるが、臨床患者の実際の治療と乖離するため、実現性は乏しいと考えられる。本研究において、当初予想された有効性が証明できなかった理由は明らかでないが、GDF11を含む多数のメディエーターが全身性炎症には複雑にかかわっており、一因子の補充だけでは十分な効果が発揮されない可能性も考えられた。

(研究2)外傷(クラッシュ症候群)と熱中症の2つの急性期炎症モデルにおいても、BMMNCs移植群は7日間生存率が有意に高く、また移植後3、6、12時間後の血清IL-6、TNF- α 、Histone H3、ICAM-1、Syndecan-1の濃度は有意に低かった。またコントロール(非移植)群の肺組織に

は間質浮腫、血管内皮障害などの著明な炎症所見を認めたが、BMMNCs 移植群ではいずれも軽減されていた。また、熱中症モデルでは、コントロール群の暑熱暴露 6 時間後の肺組織において、血管内皮グリコカリックス層の主要成分である Syndecan-1 の発現は、sham 群と比較して著明に低下していたが、BMMNCs 移植群では、Syndecan-1 の発現が保たれていた。以上の結果より急性炎症病態に対する BMMNCs 移植は、過剰な炎症反応の抑制し、血管内皮傷害・臓器障害や生命予後を著明に改善する可能性が示された。

外傷モデルにおける移植群とコントロール群の血清サイトカイン値を示す。血清 IL-6、ヒストン H3 濃度は、移植後 3、6、12 時間後全ての測定時間において、コントロール群と比較して、BMMNCs 群で有意に低かった。血清 TNF- α 濃度、血清 IL-1 β 濃度に関しては、共に 3 時間後のみコントロール群と比較して、BMMNCs 群で有意に低かった。また 3、6、12 時間後の全てにおいて BMMNCs 群の Syndecan-1 濃度はコントロール群と比較して有意に低かった。

暑熱暴露 6 時間後の肺組織は、コントロール群では sham 群に比べて肺胞障害、間質の浮腫が増強されていた。これに対して BMMNCs 群ではこれらの所見が著明に抑制されていた。またコントロール群の暑熱暴露 6 時間後の肺組織において、血管内皮グリコカリックス層の主要成分である Syndecan-1 の発現は、sham 群と比較して著明に低下していたが、BMMNCs 移植群では、Syndecan-1 の発現が保たれていた。

急性炎症病態に対する新規若返り因子 GDF11 投与の有効性は十分に示すことができなかった。一方、BMMNCs 移植は、過剰な炎症反応の抑制を通して侵襲反応を制御し、臓器障害の進行を抑えることで予後を改善する可能性が示された。BMMNCs 移植療法は、急性炎症反応を引き起こす病態に対する新しい治療法となる可能性を持っているが、臨床応用に向けてはいくつかの課題が残されており、さらなる研究を行う必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Umemura Yutaka, Ogura Hiroshi , Matsuura Hiroshi , et al . Bone marrow-derived mononuclear cell therapy can attenuate systemic inflammation in rat heatstroke. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 26:97, 2018 査読有り
2. 梅村 稯、小倉 裕司、清水 健太郎、他 . 急性炎症病態に対する骨髄由来単核球細胞移植による侵襲反応制御 SHOCK 33(1): 52, 2018 査読無し

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Umemura Yutaka, Ogura Hiroshi , Matsuura Hiroshi , et al . Bone marrow-derived mononuclear cell therapy can attenuate systemic inflammation in rat heatstroke. 47th Critical Care Congress, 2018
2. 梅村 稯、小倉 裕司、清水 健太郎、他 . 急性炎症病態に対する骨髄由来単核球細胞移植による侵襲反応制御 第 33 回日本ショック学会、2018 年
3. 梅村 稯、小倉 裕司、清水 健太郎、他 . 熱中症モデルにおける骨髄由来単核球細胞移植の効果 第 45 回日本救急医学会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

吉矢 和久

(YOSHIYA, kazuhisa)

大阪大学・医学部附属病院

助教

研究者番号：40379201

嶋津 岳士

(SHIMAZU, takeshi)

大阪大学・医学系研究科

教授

研究者番号：50196474

清水 健太郎

(SHIMIZU, kentaro)

大阪大学・医学部附属病院

助教

研究者番号：60379203

入澤 太郎

(IRISAWA, taro)

大阪大学・医学部附属病院

助教

研究者番号：50379202

新谷 歩

(SHINTANI, ayumi)

大阪市立大学・大学院医学研究科

教授

研究者番号：00724395