

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20389

研究課題名(和文) クラッシュ症候群に対する骨髄間葉系細胞移植法の確立とメカニズム解明

研究課題名(英文) Therapeutic effectiveness of human bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of crush injury

研究代表者

松本 寿健 (Hisatake, Matsumoto)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70644003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、クラッシュ症候群ラットモデルに対しヒト骨髄由来間葉系幹細胞移植の有効性を評価し、臓器障害進行のメカニズムを解析することである。本研究において、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を移植によるクラッシュ症候群ラットモデルに対する抗炎症作用、組織修復作用は認められなかった。今後、更なる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study is to evaluate therapeutic effects of human bone marrow mesenchymal stem cells (hMCS) in systemic acute inflammation after crush injury. In this study, administration of hMCS did not show therapeutic effects such as anti-inflammation and tissue repair.

研究分野：医歯学

キーワード：クラッシュ症候群 骨髄由来間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### クラッシュ症候群に対する骨髄間葉系細胞移植法の確立とメカニズム解明

クラッシュ症候群に対する治療法は、受傷早期に生じる高度脱水による急性腎不全や高カリウム血症に伴う致死的不整脈を予防するために、大量輸液療法や腎代替療法が有効とされてきた。しかしながら、これらは対症療法の域を出ず、根本的な治療法は見出されていない。

我々はこれまで、クラッシュ症候群の病態解明のため、クラッシュ症候群ラットモデルを開発し、クラッシュ症候群が局所の組織損傷のみならず、肺をはじめとする遠隔臓器障害を来すことを明らかにした(Akimau, J. Trauma 2005)。その主病態として、血管内皮細胞障害を起因とする全身性炎症反応症候群(以下 SIRS)が、クラッシュ症候群における遠隔臓器傷害に関与していることを明らかにしてきた(Sonoi, Shock 2009)。また我々は、代表的な組織損傷関連分子パターン(DAMPs)の High mobility group box 1 protein (HMGB1) が、炎症誘導因子として関連していることを明らかにしてきた(Shimazaki, Shock 2012)。しかしながら、現在でもクラッシュ症候群の病態は十分に解明されたとはいえず、新たな視点からの病態解明、新規治療法の開発が必要と考えらる。

現在、膠原病などの慢性炎症疾患において、骨髄由来間葉系幹細胞の経静脈投与による細胞移植治療が注目されている。既に一部の慢性炎症疾患においては臨床試験が行われており、今後有望な再生療法として位置づけられている。近年、骨髄由来間葉系幹細胞移植は、急性炎症疾患である敗血症モデル(感染性 SIRS)の血管内皮障害・全身性炎症を軽減し、生存率を改善すると報告されている(Lombardo, World J Stem Cells 2015)。しかしながら急性炎症疾患における骨髄由来間葉系幹細胞移植療法の有効性の報告は少なく今後の課題である

## 2. 研究の目的

今回我々は、クラッシュ症候群(非感染性 SIRS)における組織虚血再灌流により誘導される、血管内皮障害、全身性炎症を基礎とした多臓器不全に対しても、骨髄由来間葉系幹細胞移植療法の抗炎症効果、損傷組織再生効果が認められると想定し、本研究を立案した。

## 3. 研究の方法

### (クラッシュ症候群モデル)

確立したラットを用いたクラッシュ損傷モデルを用いて実験を行った。モデル作成には、成体ラット(12週、270-300g)を用いた。全身麻酔下に、外科的に外頸静脈にポリ

エチレンチューブを挿入し、輸液ルートを確認した。その後、仰臥位で固定した専用器具を用いて、両後脚を各 1.5kg の重りで圧迫し、6 時間後に解除した。圧迫開始から 5 時間目までは 1mL/kg/hr の速度で輸液し、圧迫解除前 1 時間から解除後 3 時間まで、生食を 10mL/kg/hr の速度で投与し脱水、高カリウム血症で誘導される致死性不整脈を避けつつ多臓器不全を誘導した。

### (骨髄間葉系幹細胞移植)

使用する骨髄由来間葉系幹細胞は、これまで炎症モデルにおいて、生存率改善が有効と報告されたヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC; human mesenchymal stem cells, Lonza PT2501)を用いた。hMSC を専用培地(Lonza PT3001 MSCGM BulletKit)を用いた。細胞を 37 の water bath で溶解し、保温した Medium に加えた。その後、これらの細胞を遠心分離し、3 種類の添加因子を加えた Medium に入れ 37 CO<sup>2</sup> インキュベーターにて培養を開始した。Confluency が 85~90% になった段階で、Trypsin/EDTA(Lonza cc-3232)にて細胞をデッシュから剥離した。剥離した細胞を回収し、遠心分離後に PBS を加え細胞数をカウントした。Cell viability はトリパンブルーにて確認した。hMSC 5×10<sup>5</sup> 個を 0.6ml の PBS (phosphate buffered saline) に懸濁し、頭静脈に留置した静脈ルートから、クラッシュ損傷を受けたドナーに対し、単回投与した。対照群に対しては、hMSC を含有しない同量の PBS 単回投与した。

### (評価方法)

実験終了後は、ルート抜去後にラットをケージに戻した。評価は、クラッシュ症候群ラットモデルを対象として、シャム群、非治療群、治療群の 3 群に割り付けして行った(シャム群 n=4、非治療群 n=4、治療群 n=4)。治療介入は、クラッシュ損傷現場における投与を想定して、クラッシュ損傷発症直前に行った。シャム群は、上記手技のうち下肢圧迫を行わなかった。評価は、クラッシュ損傷後 6 時間後に採取した血清検体を用いて、炎症性サイトカイン(IL6 値、TNF 値)血管内皮障害マーカー(可用性 ICAM)をそれぞれ ELISA 法で測定した。

### (統計)

群間の比較は Student の t-test で検定した。P 値は 0.05 未満を有意とした。

## 4. 研究成果

クラッシュ症候群では、局所における圧挫が全身性の炎症反応や遠隔臓器損傷を引き起こすことは良く知られているが、その詳細な機序は依然として分かっていない。クラッシュ症候群のメカニズム解明と新規治療法開発は、地震をはじめとした災害大国日本の急務といえる。

近年、骨髄由来間葉系幹細胞移植が炎症作用や損傷組織再生作用を持つとされている (Yagi, Cell Transplant. 2010)。骨髄由来間葉系幹細胞は、敗血症などの急性全身性炎症を示す疾患において臨床応用が期待されている。骨髄由来間葉系幹細胞移植の詳細な機序は不明であるが、主として2つのメカニズムが想定されている。1つはTrophic 効果で、骨髄由来間葉系幹細胞が産生する多様な成長因子やサイトカインにより炎症を抑えるものである。もう一つはHoming 効果で、損傷部位に生着後に再生応答遺伝子や細胞死抑制遺伝子の発現を促進するものである。

本研究において、炎症性サイトカインのTNF 値は、シャム群、非治療群、治療群の間に有意差を認めなかった。IL6 値は非治療群と治療群において、シャム群より有意に上昇していた。一方、非治療群と治療群の間で有意差は認められなかった。これから本研究において、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞移植は、十分な抗炎症効果を発揮していない可能性が示唆された。

また、血管内皮障害マーカーである可溶性 ICAM 値は、非治療群と治療群において、シャム群より有意に上昇していた。一方、非治療群と治療群の間で有意な差異は認められなかった。これから本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞移植による血管内皮修復作用は、有効ではない可能性が考えられた。

本研究では、これまで炎症モデルにおいて治療効果があるとされたヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いた。また臨床での実用化を見据えて、ヒト骨髄由来の細胞を用いた。抗炎症作用、血管組織修復作用が認められなかった理由として、異種間骨髄移植に伴う治療効果減少の可能性が考えられた。

今後、ラット骨髄由来間葉系幹細胞の使用、投与方法の変更など、更なる検討が必要と考えられた。

## 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6件)

Matsumoto H, Matsumoto N, Shimazaki J, Nakagawa J, Imamura Y, Yamakawa K, Yamada T, Ikeda M, Hiraike H, Ogura H, Shimazu T: Therapeutic Effectiveness of Anti-RAGE Antibody Administration in a Rat Model of Crush Injury. Sci Rep 2017, 7.

Matsuura H, Matsumoto H, Osuka A, Ogura H, Shimizu K, Kang S, Tanaka T, Ueyama M, Shimazu T: Clinical Importance of a Cytokine Network in Major Burns. SHOCK

2018:1.

Ikeda M, Matsumoto H, Ogura H, Hirose T, Shimizu K, Yamamoto K, Maruyama I, Shimazu T: Circulating syndecan-1 predicts the development of disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis. J Crit Care 2018, 43:48-53.

Matsumoto H, Yamakawa K, Ogura H, Koh T, Matsumoto N, Shimazu T: Clinical Significance of Tissue Factor and CD13 Double-Positive Microparticles in Sepsis Patients with Trauma and Severe Sepsis. Shock 2017, 47:409-415.

Nakagawa J, Matsumoto N, Nakane Y, Yamakawa K, Yamada T, Matsumoto H, Shimazaki J, Imamura Y, Ogura H, Jin T, Shimazu T: The beneficial effects of ETS-GS, a novel Vitamin E derivative, on a rat model of crush injury. Shock 2016, 46.

Imamura Y, Yoshikawa N, Murkami Y, Mitani S, Matsumoto N, Matsumoto H, Yamada T, Yamakawa K, Nakagawa J, Ogura H, Shimazu T, Jin T: Effect of Histone Acetylation on N-Methyl-D-Aspartate 2B Receptor Subunits and Interleukin-1 Receptors in Association with Nociception-Related Somatosensory Cortex Dysfunction in a Mouse Model of Sepsis. SHOCK 2016, 45:660-667.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本寿健 (Hisatake Matsumoto)  
大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：70644003

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者( )