

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16417

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた肺再生～肺胞上皮細胞への分化と細胞移植治療の開発～

研究課題名(英文) Lung regeneration using adipose tissue-derived stem cells-Differentiation into alveolar epithelial cells and development of stem cells therapy-

研究代表者

福井 絵里子 (Fukui, Eriko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90814591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)は非可逆性の慢性進行性の肺疾患で、根治的な治療がなく、新たな再生医療の開発が望まれている。今回、脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)から肺胞上皮細胞への分化誘導、COPDに対するADSCs補充療法による再生医療の研究を行った。

まず、ADSCsから2型肺胞上皮細胞への分化誘導が可能であることを示した。また、エラスターゼを用いた肺気腫モデルマウスに、ADSCsを投与し効果を検討し、ADSCsが呼吸機能を改善させることを明らかにした。さらに気腫肺に集積したADSCsの一部が2型肺胞上皮細胞へ分化することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患(COPD)などの難治性呼吸器疾患は年々著しく増加している。肺移植以外の根治的な治療は確立されておらず、予後不良であり、新たな治療法の開発が喫緊の課題である。現在の幹細胞治療ではパラクライン効果が主な作用であり、このような非可逆的な肺胞破壊を伴う難治性呼吸器疾患に対しては治療効果に限界がある。本研究では幹細胞自身が肺胞細胞へ分化する可能性を示し、COPDに対する根治的な肺胞再生治療の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Chronic obstructive pulmonary disease is a leading cause of mortality globally, with no effective therapy yet established. Whether adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) differentiate into functional cells remains uncertain, and no study has reported on the mechanism by which ADSCs improve lung functionality. Thus, in this study, we examined whether ADSCs differentiate into lung alveolar cells and are able to ameliorate lung injury caused by elastase-induced emphysema in model mice. Here, we induced ADSCs to differentiate into type 2 alveolar epithelial cells in vitro. We demonstrated that ADSCs can differentiate into type 2 alveolar epithelial cells in an elastase-induced emphysematous lung and that ADSCs improve pulmonary function of emphysema model mice, as determined with spirometry and 129Xe MRI. These data revealed a novel function for ADSCs in promoting repair of the damaged lung by direct differentiation into alveolar epithelial cells.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 慢性閉塞性肺疾患 細胞移植治療 肺胞上皮細胞 肺再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を用いた再生医療の研究は世界中で盛んに行われており、様々な分野で臨床応用が実現化してきている。肺に関しても研究が発展してきているとは言え、他臓器と比較してまだまだ再生は困難であると考えられている。一方、肺気腫を中心とする慢性閉塞性肺疾患 (**chronic obstructive pulmonary disease ; COPD**) は年々増加しており、**2020** 年には全死因の第**3**位になると予測されている。現在根治的な治療法として肺移植が最も有効であるが、脳死ドナー数は限られており新たな治療法の開発が期待されている。近年、各臓器・組織から採取される間葉系幹細胞は、**iPS** 細胞などの多能性幹細胞と比べ臨床応用に適した特長を有しており注目されている。脂肪組織由来幹細胞 (**adipose-derived stem cell : ADSCs**) は脂肪組織から採取される間葉系幹細胞で、骨髄由来幹細胞と比較して、**(1)**採取細胞中の多分化能を持つ細胞の割合が高い、**(2)**細胞増殖が速い、**(3)**再生促成因子を多く分泌する、**(4)**免疫抑制能が高い、などと報告されており、脂肪は骨髄に替わる幹細胞の供給源として注目されている。

2. 研究の目的

本研究では **ADSCs** を用いた肺再生を目指し、**ADSCs** から肺胞上皮細胞への分化誘導、**COPD** に対する **ADSCs** 補充療法による肺再生医療の確立とそのメカニズムの解明を目的とする。

(1)ADSCs から肺胞上皮細胞への分化誘導法の確立

肺上皮には数種類あるが、末梢肺胞であれば **II** 型肺胞上皮細胞が重要であり、まずは **ADSCs** から **II** 型肺胞上皮細胞への分化誘導法を検討する。またその分化確認に関しても適切な方法を検討する。

(2)ADSCs による肺再生のメカニズムの解明

肺気腫モデルマウスを用いて **ADSCs** の生体投与による変化を解析する。**ADSCs** が生着し肺胞上皮細胞へ分化する様子を解析する。

3. 研究の方法

(1)GFP マウス皮下脂肪由来幹細胞の採取：**GFP** マウスを過剰麻酔により安楽死させ、皮下白色脂肪組織を採取する。採取した組織をコラゲナーゼ溶液で酵素処理し、遠心分離により浮遊した脂肪細胞を除去し、脂肪組織由来幹細胞を採取する。

(2)ADSCs から肺胞上皮細胞への分化誘導法の確立：抹消気道成長培地での培養や、**ES** 細胞や **iPS** 細胞の **II** 型肺胞上皮への分化誘導法を組み合わせることで誘導法を確立する。我々はこれまでに **iPS** 由来細胞の各種内胚葉マーカー、肺胞前駆細胞、末梢肺胞細胞マーカーの発現を解析してきた。分化の確認は免疫組織化学染色、**RT-PCR**、**Western blotting**、電子顕微鏡検査などを用いて行う。

(3)COPD マウスモデルにおける細胞移植治療法の確立：エラストーゼ吸入マウスモデルを用いて気腫変化を誘導する。**ADSCs** を投与し肺気腫改善効果・肺胞再生効果を検証する。動物モデルでの肺気腫改善効果・肺胞再生の評価は、採取した肺組織、小動物呼吸機能、小動物 **CT**、超偏極 **¹²⁹Xe-MRI** を用いて行う。

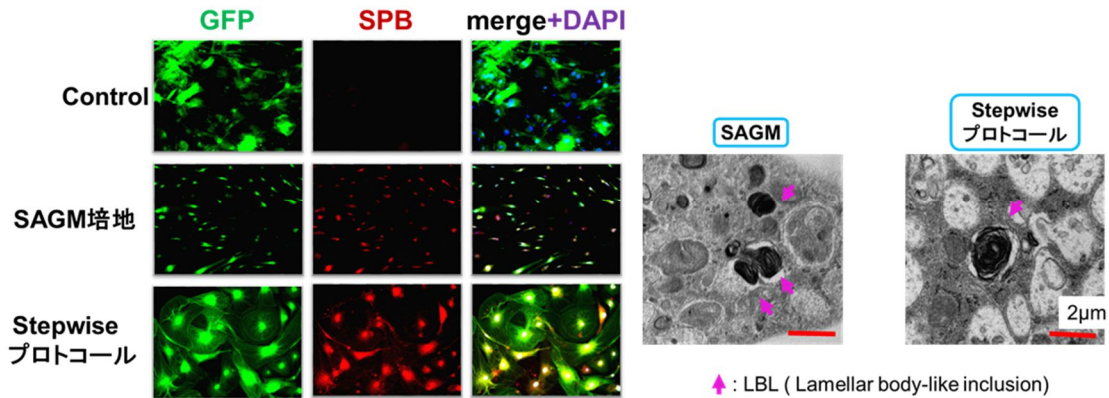
(4)ADSCs による肺再生のメカニズムの解明

肺気腫モデルマウスへ **GFP** で標識した **ADSCs** を投与し、生着しその後の変化を観察する。7日、14日、21日にマウスを安楽死させ、摘出した肺を免疫組織化学染色、**RT-PCR**、**Western blotting**、**FACS** などで肺胞上皮細胞への分化を解析する。

4. 研究成果

(1)ADSC から肺胞上皮細胞への分化誘導法の確立

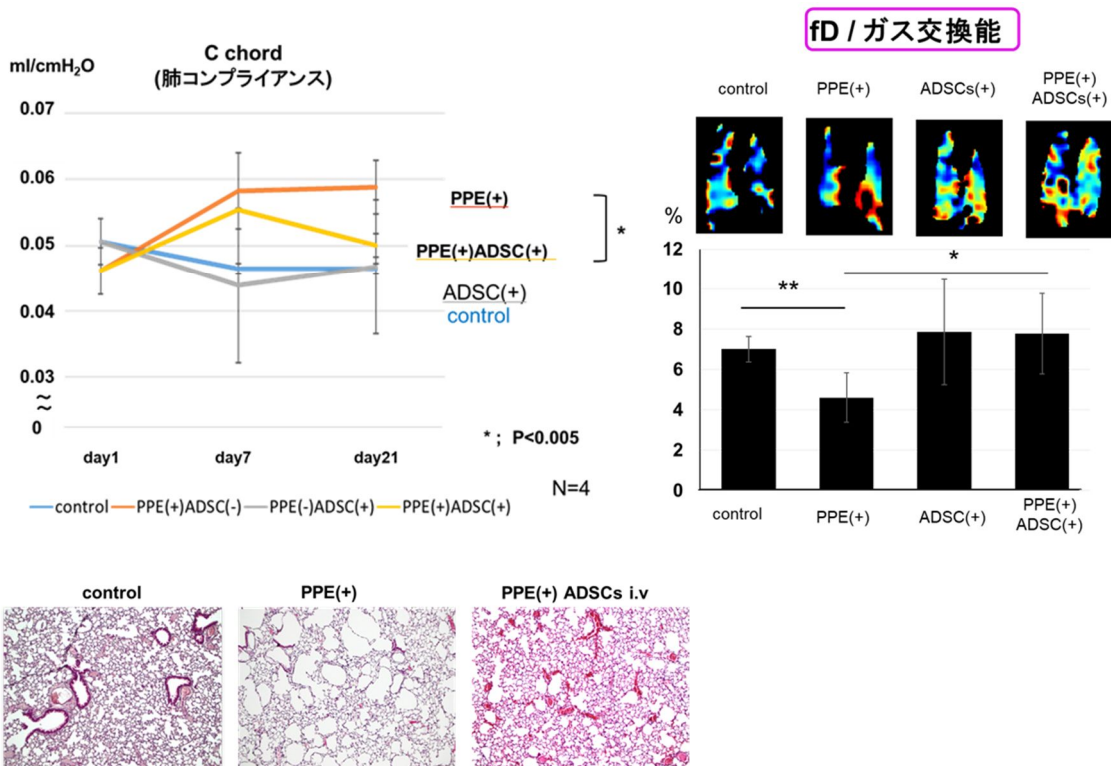
ADSCs から **II** 型肺胞上皮細胞への分化が可能かを検討するため、2種類の培地で分化誘導を行った。1つは末梢気道成長培地である **SAGM** 培地、2つ目は、**iPS** 細胞から **II** 型肺胞上皮細胞への分化誘導法として報告されているプロトコールで、肺の発生過程に沿った分化誘導を行った。分化誘導した **ADSCs** を **II** 型肺胞上皮マーカーである **SPB**、**SPC** で蛍光免疫染色すると、分化誘導前には見られなかった **SPCPB**、**SPC** の発現を認めた。また、分化誘導した **ADSCs** を電子顕微鏡で観察すると、**II** 型肺胞上皮細胞に特異的な構造物である **lamellar body** 様の構造物を認め、**II** 型肺胞上皮細胞への分化が示唆された。



(2) COPD マウスモデルにおける ADSCs の効果

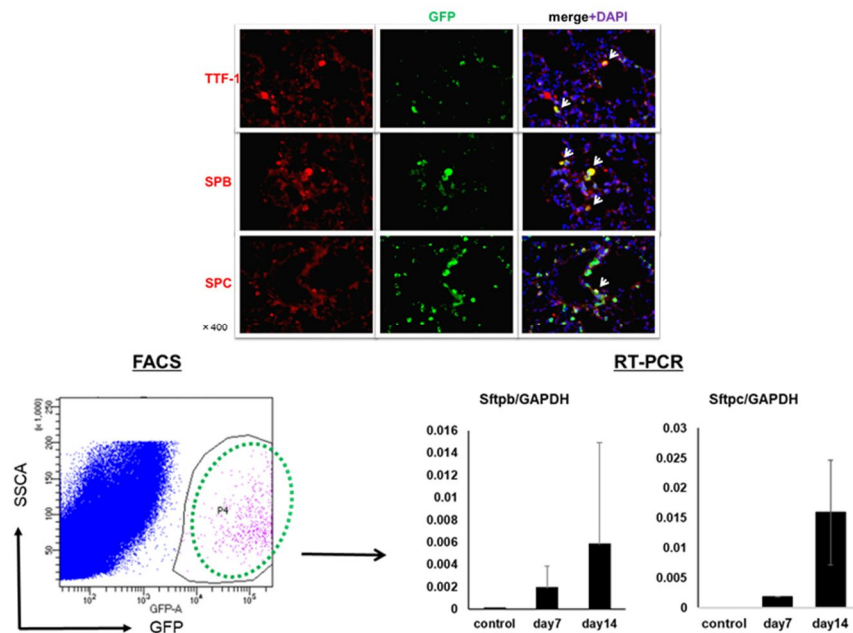
エラスターゼをマウスの気管に投与し、**COPD** モデルを作成、**ADSC** を尾静脈から投与し呼吸機能測定と組織学的評価を行った。

呼吸機能検査の結果。**COPD** では弾性収縮力の喪失が起こっており気道コンプライアンスが上昇し過伸展を起こす。**COPD** モデルであるエラスターゼ投与群は **control** に比べて気道コンプライアンスを示す **C chord** が、有意に高値となったが、エラスターゼと **ADSCs** を投与した群では改善を認めた。次に超偏極キセノン磁気共鳴イメージングによる肺機能評価を行った。この **MRI** は吸入させたキセノンガスを励起させ約 **10** 万倍に信号強度を高め、それを磁気共鳴イメージングとしてとらえることができる。**COPD** ではガス交換能の低下を認めたが、エラスターゼを投与した **COPD** モデルマウス群でもガス交換能において低下を認めた。**COPD** モデルマウスに **ADSC** を投与した群ではガス交換能の改善を認めた。



(3) 肺へ集積した ADSCs の解析

COPD モデルマウスに **GFP** で標識した **ADSCs** を投与し、肺に集積した **ADSCs** を解析した。集積した **ADSC** が分化しているかを調べるために、蛍光免疫染色を行った。**TTF-1** や 型肺胞上皮マーカー である **SPB** と **SPC** を赤で染色し、**GFP** で標識している投与した **ADSCs** の緑と **Merge** するか検討したところ、肺へ集積した **GFP** 陽性の **ADSCs** の一部に、赤と **Merge** する細胞を認め、投与した **ADSCs** が肺胞上皮へ分化する可能性が示唆された。さらに **ADSCs** を投与した **COPD** モデルマウスの肺を摘出し、**GFP** で細胞をソーティングし **GFP** 陽性細胞を分取、集めた **GFP** 陽性細胞は **PCR** で **SPB**, **SPC** の発現を認めた。



以上より、**ADSCs** は多分化能を有し、型肺胞上皮細胞へ分化する可能性が示唆された。また、**COPD** モデルマウスにおいて **ADSCs** は呼吸機能を改善し、組織的に気腫性変化を改善した。さらに **ADSCs** は **COPD** モデルマウスの気腫肺に集積し、肺内でも型肺胞上皮細胞へ分化する可能性が示唆された。本研究では **ADSC** 自身が分化して型肺胞上皮細胞を補充するという作用も、気腫肺の改善に関与している可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukui E, Funaki S, Kimura K, Momozane T, Kimura A, Chijimatsu R, Kanzaki R, Kanou T, Ose N, Minami M, Miyagawa S, Sawa Y, Okumura M, Shintani Y	4. 巻 eCollection 2019.
2. 論文標題 Adipose Tissue-Derived Stem Cells Have the Ability to Differentiate into Alveolar Epithelial Cells and Ameliorate Lung Injury Caused by Elastase-Induced Emphysema in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/5179172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福井絵里子、新谷康、桃實徹、神崎隆、大瀬尚子、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進
2. 発表標題 肺気腫モデルマウスに対する脂肪組織由来幹細胞による細胞治療
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井絵里子、新谷康、桃實徹、神崎隆、川村知裕、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進
2. 発表標題 肺傷害治癒過程における脂肪組織由来幹細胞の役割
3. 学会等名 日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井絵里子、新谷康、桃實徹、神崎隆、狩野孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進
2. 発表標題 Therapeutic effect and role on adipose tissue-derived stem cells for emphysema model mouse
3. 学会等名 日本胸部外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eriko Fukui, Yasushi Shintani, Kenji Kimura, Toru Momozane, Ryu Kanzaki, Takashi Kano, Naoko Ose, Soichiro Funaki, Masato Minami, Meinoshin Okumura
2. 発表標題 ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS HAVE AN ABILITY TO DIFFERENTIATE INTO ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS AND AMELIORATE LUNG CAUSED BY ELASTASE-INDUCED EMPHYSEMA IN MODEL MICE.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----