

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22659

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞積層シートを用いた慢性閉塞性肺疾患に対する新たな再生医療の開発

研究課題名(英文) Regenerating medicine using multilayered tissues with adipose derived stem cell for COPD

研究代表者

新谷 康 (Shintani, Yasushi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90572983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)は増殖が速く組織再生因子の産生が高いことから、慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対する肺再生医療において有望な細胞ソースと考えられている。我々は、フィブロネクチンとゼラチンを交互に積層したLayer by Layer法により細胞同士の接着を誘起し、ADSCで構成される3次元組織体(3D-ADSC)を作成した。3D-ADSCは、HGF、SDF-1などの組織再生因子分泌能が高く、エラスターゼ誘導COPDモデルマウスの肺表面への移植により肺胞再生能の亢進を認めた。以上より、3D-ADSCはCOPDに対する有用な治療手段になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器領域では慢性閉塞性肺疾患(COPD)など非可逆性の慢性進行性の肺疾患が急増しており、臓器移植に代わる根治的治療法の開発が望まれている。脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)は組織再生因子分泌能を有しており、COPDに対する新たな治療法として注目されている。本研究は、「ADSC積層シートを外科的に投与する手法を開発し、COPDに対する再生医療にむけ新たな細胞移植法を確立する」ことを目的として実施した。組織修復因子を多く分泌するADSCを用いて、積層シート状にして病変部に貼付することで、大量の細胞を局所に投与できる利点があり、呼吸不全に対する新たな外科治療法の開発につなげることができる。

研究成果の概要(英文)：Stem cell based therapy offers a promising therapeutic approach that has shown potential in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). As adipose-derived stem cells (ADSCs) rapidly proliferate and secrete high amounts of regeneration promoting factors, they have been investigated for their utility in respiratory diseases. We have developed a novel cell coating technique using ADSCs based on the concept of layer-by-layer (LbL) to create 3D tissue (3D-ADSCs) scaffolded only by nanofilms that were composed of two fundamental ECM proteins, such as fibronectin and gelatin. 3D-ADSCs expressed significantly higher levels of HGF and SDF-1 that participate in lung regeneration and transplantation of 3D-ADSCs onto the surface of the lung of elastase-treated emphysema mice models enhanced alveolar regeneration as compared to 2D ADSCs. These findings suggest that cellular therapy using 3D-ADSCs is a therapeutic potential for treating patients with end-stage COPD.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺再生医療 脂肪組織由来間葉系幹細胞 慢性閉塞性肺疾患 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

呼吸器領域では慢性閉塞性肺疾患 (COPD) など非可逆性の慢性進行性の肺疾患が急増しており、臓器移植に代わる根治的な治療法の開発が望まれている 1)。一方、間葉系幹細胞 (MSC) は多分化能を有し免疫抑制作用も併せ持つことから、再生医療に対する臨床応用が期待されており、COPD に対する新たな治療法として注目されている。我々は、慢性呼吸不全に対する治療手段の可能性の一つとして、hepatocyte growth factor (HGF) に注目し、動物モデルを用いて HGF の外的補充による肺気腫の病態改善の可能性について検討した 2)。肺気腫の病態進展に伴う内因性 HGF 産生の低下が肺気腫の病態進展に関与しており、HGF が枯渇する時期に合わせて HGF を経静脈的に遺伝子導入すると、肺血管床・肺胞上皮細胞の増加を認め、組織学的変化に一致してガス交換能及び運動耐容能が改善した。また、肺切除による代償性肺再生動物モデルにおいて、HGF 投与が残存肺の代償性再生を誘導することを示した 3)。同様に、肺再生を促す因子として、fibroblast growth factor (FGF)、insulin like growth factor (IGF)、keratinocyte growth factor (KGF)、granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) などが報告されている。肺障害モデルを用いた解析から、骨髄由来幹細胞が炎症刺激により損傷部位に動員されることが報告されている 4)。骨髄由来幹細胞は HGF を含む多くの増殖因子を介して、免疫調節、抗炎症作用、組織修復を促し、さらに肺を構成する肺胞上皮、血管内皮、線維芽細胞などに分化するとされる 5)。一方で、脂肪組織は大量の MSC を含み、脂肪組織より得られる脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) は増殖が速く細胞活性も高いため再生医療において有望な細胞ソースと考えられている。小動物肺気腫モデルに対するの投与の効果を検討したところ、経静脈的に ADSC を投与することにより、肺における内因性 HGF の持続的な増加が得られた。また投与した ADSC 自身が肺胞細胞へ分化することによって肺実質細胞を補充する可能性を報告した 6)。しかし、MSC を COPD 患者へ全身投与することによる臨床試験では、抗炎症効果は期待できるが、肺機能の改善を示すまでに至っておらず臨床使用までに克服すべき課題は多い 5)。とくに、MSC の全身投与による肺機能改善効果や合併症は十分に解明されておらず、病変部位への大量細胞投与など最適な投与法の検討が必要であると考えられる。したがって、今後は、投与量、投与レジメ、対象になる肺疾患の選別が必要とされている 7)。我々は、小動物肺気腫モデルを用いて肺切除時に ADSC をシート状に投与することで、残肺の肺胞が再生することを報告した 8)。今回、さらに多量の ADSC を肺表面に貼付するために、明石らが開発した Layer by Layer (LBL) 法 9) を用いて ADSC 積層シートを作成し、外科的に障害部位に直接貼付する手法を開発した。COPD モデルマウスに対する本手法の治療効果を検証することを目的に、本研究を計画した。

1) Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, et al. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182: 693-718.

2) Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, et al. Amelioration of pulmonary emphysema by in vivo gene transfection with hepatocyte growth factor in rats. *Circulation.* 2005;111: 1407-1414.

3) Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, et al. Induction of compensatory lung growth in pulmonary emphysema improves surgical outcomes in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171: 1237-1245.

4) Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol.* 2004;172: 1266-1272.

5) Broekman W, Khedoe P, Schepers K, Roelofs H, Stolk J, Hiemstra PS. Mesenchymal stromal cells: a novel therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax.* 2018;73: 565-574.

6) Fukui E, Funaki S, Kimura K, et al. 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. *Stem Cells Int.* 2019;2019: 5179172.

7) Harrell CR, Sadikot R, Pascual J, et al. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy of Inflammatory Lung Diseases: Current Understanding and Future Perspectives. *Stem Cells Int.* 2019;2019: 4236973.

8) Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, et al. Lung tissue engineering technique with adipose stromal cells improves surgical outcome for pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174: 1199-1205.

9) Sasaki K, Akagi T, Asaoka T, et al. Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique. *Biomaterials.* 2017;133: 263-274.

2. 研究の目的

「ADSC 積層シートを外科的に投与する手法を開発し、COPD に対する再生医療にむけ新たな細胞移植法を確立する」ことを目的として、本研究を計画した。

3. 研究の方法

ADSC 採取法: 移植実験に用いる ADSC を得るために、緑色蛍光 (GFP) トランスジェニックマウスを過剰麻酔により安楽死させ、鼠径部より皮下白色脂肪組織を採取した。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、ADSC を採取し、専用培地で細胞培養を行った (図 1)。ADSC が多分化能をもつことを確認し、以下の実験に使用した。

また、研究期間 2 年目より、動物実験施設の改修工事のため、マウスの飼育数に制限が設けられたため、ADSC 細胞株 (マウス由来 GFP-ADSC、CYAGEN®) を購入して同様に用いた。

細胞シートの作成: フィブロネクチンとゼラチンを交互に積層した Layer by Layer 法 (LBL 法) による薄膜を人工細胞間物質として、細胞同士の接着を誘起し ADSC 積層シートを作成した (図 2)。

細胞シートの機能解析: 三次元積層組織の培養上清中の組織修復因子 (HFG、SDF-1) を ELISA で測定した。

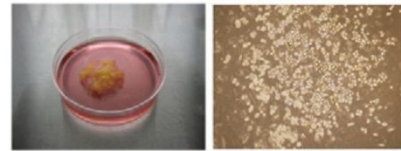
小動物における COPD モデルの作成と呼吸機能評価: エラスターゼ吸入や肺切除モデルを用いて気腫変化を誘導した。吸入後 1 週間後に全身麻酔下に左開胸を加え ADSC シート (2 次元培養シートと 3 次元組織体) を左肺表面に貼付 (図 3) し、貼付 1、2 週間後に小動物呼吸機能測定を行い、さらに犠牲死させた後に組織学的評価を行った。

4. 研究成果

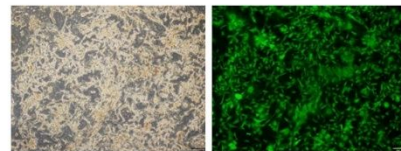
マウスより採取した ADSC 細胞または市販された ADSC 細胞の多分化能を確認した (図 4): 1. に示した文献 6) より引用。

LBL 法を用いて互いに相互作用する 2 種の高分子溶液 (フィブロネクチンとゼラチン) に交互に浸漬するだけで、組織厚を有する三次元積層組織が構築可能で、厚みをもった細胞シートを作成することができた (図 5: ADSC 積層シートの切片像)。

図 1

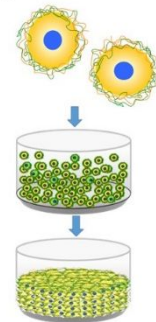


マウス鼠径部より脂肪細胞を採取しADSCを分離した。



ADSC細胞株 (マウス由来GFP-ADSC)

図 2



採取したADSCs

細胞をフィブロネクチンとゼラチンを交互に積層

3次元組織体の構築

図 3

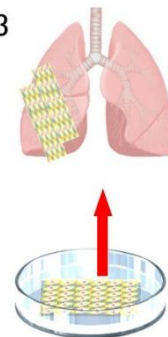
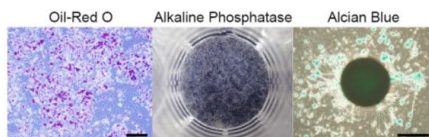


図 4



脂肪細胞 骨細胞 軟骨細胞

多分化能をもつことを示し、ADSCの品質を確認した。

図 5



重層化した細胞シート (弱拡大)



重層化した細胞シート (強拡大)

ADSC 三次元培養組織培養上清中には、HGF、SDF-1 などの組織再生に關与する組織修復因子が含有されており、二次元一層培養上清中と比して、成長因子の濃度が高い傾向にあることを ELISA にて確認した (図 6)。

さらに、エラスターゼ吸入により気腫変化を誘導した COPD モデルマウスへ開胸下に ADSC の 3 次元組織体の移植を行い、2 週間後に犠牲死させ胸腔内を確認したところ、3 次元組織体の委縮を認めたが移植細胞は残存していた (図 7)。

図6 細胞培養上清中の濃度

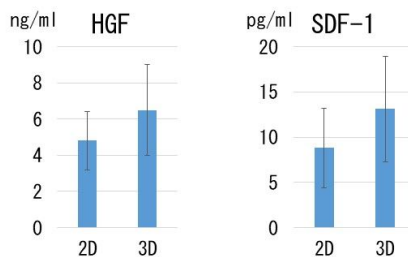
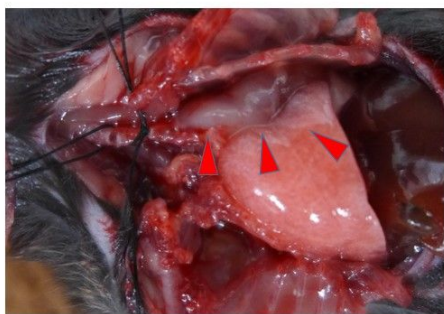
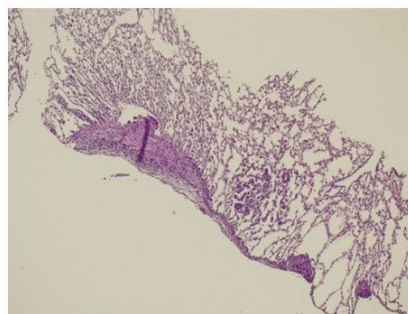


図7



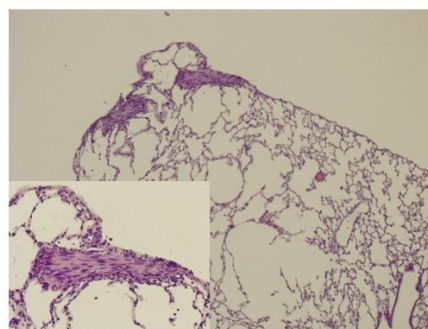
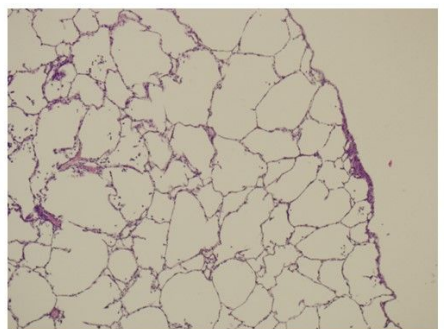
重層化した細胞シートが胸腔内に残存していた。



重層化した細胞シートと臓側胸膜の境界面に接着していた。

さらに生存細胞数は、2 次元培養による細胞シートを重層して移植した場合より細胞生存率が高かった。組織学的評価では、シート移植部位に沿って、気腫性変化の軽減を示唆する所見を得た (図 8)。

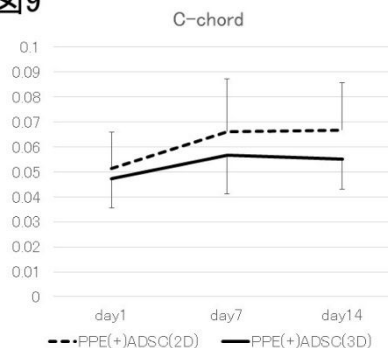
図8



単層の細胞シートを貼付した肺標本。重層化した細胞シートを貼付した肺標本。

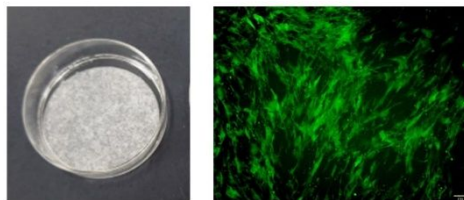
ADSC シート (2 次元 (2D) 培養シートと 3 次元 (3D) 組織体) を貼付し、貼付 2 週間後に小動物呼吸機能測定を行い、呼吸機能コンプライアンス (C chord) を測定した (各群 5 匹) 。結果、2D-ADSC シートに比して 3D-ADSC シート貼付群では有意差はないものの C chord を低下させ、気腫性変化を改善させている可能性が示唆された (図 9)。

図9



3次元組織体は脆弱であり、現状では移植手技が COPD モデルマウスなどの小動物に限られていること、気腫性変化の軽減がシート貼付肺全体には及ばないことから、大動物用の LBL 法による 3次元組織体構築法の工夫・改善が必要である。温度感受性皿 (Upcell®) を用いて 3次元組織体採取を試みたが、皿上で良好な 3次元組織体構築を得られず(図 10) 今後一定の体積を有する 3次元組織体の作成を行う手法を新たに確立する必要があると考えられた。

図10



Upcell®上でADSCを LBL法にて培養 細胞シート(強拡大)が脆弱であり、採取が困難であった。

以上より、組織修復因子を多く分泌する ADSC を用いて、積層シート状にして病変部に貼付することで、大量の細胞を局所に投与できる利点がある可能性が示唆された。肺切除後など局所修復が必要な病態には有用な手段になると考えられ、また局所投与による肺全体にわたる効果については、今後さらなる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 新谷 康	4. 巻 3
2. 論文標題 幹細胞を用いた慢性閉塞性肺疾患に対する新たな再生医療の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 46-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 新谷 康	4. 巻 5
2. 論文標題 間葉系幹細胞を用いた慢性閉塞性肺疾患に対する新たな再生医療の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 60-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuno Hidenori, Akagi Takami, Fukui Eriko, Yamato Hiroyuki, Akashi Mitsuru, Shintani Yasushi	4. 巻 27
2. 論文標題 Three-dimensional idiopathic pulmonary fibrosis model using a layer-by-layer cell coating technique	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part C: Methods	6. 最初と最後の頁 378-390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.tec.2020.0365	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福井絵里子、宮下裕大、木村賢二、狩野 孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、南 正人、宮川 繁、澤 芳樹、新谷 康
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞を用いた難治性呼吸器疾患に対する肺再生治療法の研究
3. 学会等名 日本胸部外科学会定期学術集会(73)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久能英法、赤木隆美、舟木壮一郎、新谷 康、明石 満
2. 発表標題 LbL法を用いた生体外肺三次元特発性肺線維症モデルの作成
3. 学会等名 日本再生医療学会総会 (19)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新谷 康、舟木壮一郎、桃實 徹、福井絵里子、久能英法、大瀬尚子、狩野 孝、神崎 隆、南 正人、宮川 繁、澤 芳樹、奥村 明之進
2. 発表標題 難治性肺疾患に対する 肺再生治療
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新谷 康、舟木壮一郎、桃實 徹、福井絵里子、久能英法、大瀬尚子、狩野 孝、神崎 隆、南 正人、宮川 繁、澤 芳樹、奥村 明之進
2. 発表標題 慢性閉塞性肺疾患に対する肺再生治療
3. 学会等名 第55回日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久能英法、新谷 康、赤木隆美、福井絵里子、狩野 孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、南 正人、明石 満
2. 発表標題 交互積層細胞コーティングを用いたinVitro三次元肺間質モデル
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久能英法、新谷 康、赤木隆美、福井絵里子、狩野 孝、大瀬尚子、舟木壮一郎、南 正人、明石 満
2. 発表標題 交互積層細胞による生体外三次元肺微小血管モデルの構築
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	南 正人 (Minami Masato) (10240847)	大阪大学・医学部附属病院・特任教授(常勤) (14401)	
研究分担者	大瀬 尚子 (Ose Naoko) (10570559)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	舟木 壮一郎 (Funaki Soichiro) (50464251)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	狩野 孝 (Kanou Takashi) (70528455)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------