

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17752

研究課題名（和文）ブタ胎仔肺間葉系幹細胞の気道内投与による肺障害修復の可能性

研究課題名（英文）Possibility of lung injury repair by intratracheal administration of porcine fetal lung mesenchymal stem cells

研究代表者

高嶋 美佳（TAKASHIMA, Mika）

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：70596254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ブタ胎仔肺由来の間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells：MSCs）を抽出するために、54日齢のブタ胎仔肺組織を摘出し、培養処理後に遠心分離し、単離した単核細胞を培養した。これらの細胞がMSCsであることを証明するために、フローサイトメトリーで間葉系マーカー（D29, CD44, CD90, CD105）陽性、造血マーカー（CD34, CD45）陰性の細胞群を抽出し、抽出した細胞がMSCsであることを証明した。さらにLPS誘導急性肺障害モデルブタにこのMSCsを気道内投与し、投与されたMSCsの生着を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブタ胎仔肺組織から旺盛な増殖能と多能性を持つとされる胎仔肺由来の間葉系幹細胞を抽出する手技を確立することができた。またこれらの細胞をLPS誘導急性肺障害モデルブタに投与する手技を確立することができた。本細胞を用いることで、今後の肺再生の基礎的知見を得ることが期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：To extract mesenchymal stem cells (MSCs) derived from porcine fetal lung, 54-day-old fetal porcine lung tissue was excised. After the culture treatment, the cells were centrifuged, and the isolated mononuclear cells were cultured. In order to prove that these cells are MSCs, a group of cells positive for mesenchymal markers (D29, CD44, CD90, CD105) and negative for hematopoietic markers (CD34, CD45) was extracted by flow cytometry. It proved that the cells were MSCs. In addition, we intratracheally administered these MSCs to LPS-induced acute lung injury model pigs, and confirmed engraftment of the administered MSCs.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺再生 ブタ胎仔肺 間葉系幹細胞 LPS誘導急性肺障害 気道内投与

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、研究代表者は肺胞領域の再生に関して胎仔肺組織移植を中心に基礎研究に取り組み、様々な知見を得てきた。今回、これらをさらに発展させ、肺再生における、より効率的な細胞ソースとして胎児肺(Fetal Lung: FL)由来の間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)に着目した。本研究では、旺盛な増殖能と多能性を持つとされる胎仔肺由来の間葉系幹細胞 (FL-MSCs) の特性を評価し、さらにヒトに近いブタにおける急性肺障害モデルに気道内投与することで、大動物の障害肺の修復過程において FL-MSCs がどのように寄与するかを検証することによって、今後の肺の再生医療のさらなる発展の一助とすることを考えた。

2. 研究の目的

発展途上にある肺再生の分野において、これまで胎仔肺組織移植を中心とした基礎研究を行ってきた。今回、これらで得た知見を踏まえ、旺盛な増殖能と多能性をもつ FL-MSCs が肺再生の細胞ソースとして適しているのではないかと考えた。本研究では、(1) ブタ胎仔肺 MSCs を単離し、骨髄由来の MSCs (BM-MSCs) や気管支洗浄液由来の MSCs (BAL-MSCs) などと比較してその細胞ソースとしての特徴・優位性について検証し、(2) LPS 誘導急性肺障害モデルに気道内投与することで、その修復に寄与できるかどうかについて明らかにし、ヒトに近い大動物であるブタにおいて、肺への分化が約束された FL-MSCs を用いた本研究が、肺再生における新たな知見を得て、今後の再生医療の更なる発展の一助となることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、ブタ胎仔肺(Fetal lung: FL)より MSCs を単離し脂肪細胞などへの分化を確認し、その特徴について BM-MSCs・BAL-MSCs・成体肺(Adult lung: AL)MSCs と比較検討する。次に、ブタ LPS 誘導急性肺障害モデルを作成し、FL-MSCs の気管内投与が、肺障害を修復させるかどうか検証する。以下はその詳細である。

- (1) 54 日齢のブタ胎仔肺組織を摘出する。肺組織の小片を DMEM 培地で 0.5mg/ml コラゲナーゼ type2 で 37 °C・1 時間の処理後、cell strainer を通して回収し、Ficoll-Hypaque (GE Health Care) での遠心分離により単核細胞を単離する。細胞を播種し、3 回継代後に bFGF (10ng/ml) を加えた細胞群を使用する。FCM で間葉系マーカー陽性(CD29, CD44, CD90, CD105)・造血マーカー陰性(CD34, CD45)の細胞群を FL-MSCs とする。

- (2) 4~6 週齢ブタの肺組織、大腿骨の骨髄、成体肺からの BAL から各々 MSCs を単離し以下の項目を(1)の FL-MSCs と比較する。

効率性：組織量 1g あたりから獲得できる MSCs の細胞割合

自己複製能：colony forming unit-fibroblast(CFU-F) assay

増殖能：MTT assay, growth kinetic study

分化能：脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞への分化について各キット(STEMPRO)を使用

それぞれの MSCs の未分化マーカーを real time RT-PCR で評価

- (3) 8 週齢の SPF ブタにおいて鎮静下に経口挿管を行い、全身麻酔下に気管支鏡を用いて撒布チューブで選択的に右前葉に LPS(O55:B5, 1mg/kg)を投与する。また左前葉には同様に選択的に PBS を 10ml 投与しコントロールとする。LPS 投与後より経時的(0、2、6、48 時間後)に CT を撮像し、同時に血清・BAL(10ml x 2 回)をそれぞれ採取する。途中、6 時間経過時に一旦覚醒させ、48 時間経過時に再度全身麻酔下に各検査を行う。最終的(LPS 投与 48h 後)に犠牲死させ両肺を摘出し、以下の項目を比較し、ブタにおいて LPS 誘導急性肺障害モデルが作製できたことを確認する。

BAL 中の細胞数、上清の MPO 活性、好中球アポトーシス(Annexin-V/PI)

肺障害の程度：CT 所見、W/D 比、肺障害スコア(H-E 染色)

- (4) 投与前に FL-MSCs に PKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kit を用いて色素でラベリングする。LPS を右前葉に、PBS を左前葉に投与し、その後経過観察する LPS 群(右前葉) / コントロール群(左前葉)、LPS 投与 12 時間後、右前葉に DMEM を投与する LPS+DMEM 群、右前葉に DMEM 内で調整した FL-MSCs(2×10^6 cells/kg)を投与する LPS + FL-MSCs 群を作成する。LPS 投与後より経時的(0、2、6、48 時間後)に CT を撮像し、同時に血清・BAL(10ml x 2 回)を採取し、最終的(LPS 投与 48h 後)に犠牲死させ両肺を摘出し以下の項目を比較・検討する。

BAL 中の細胞数、上清の MPO 活性、サイトカインの測定、好中球アポトーシス(Annexin-V/PI)

肺障害の程度：CT 所見、W/D 比、肺障害スコア(H-E 染色)

細胞増殖 (Ki67)、アポトーシス (TUNEL)

4. 研究成果

ブタ胎仔肺由来の MSCs を抽出するために、54 日齢のブタ胎仔肺組織を摘出し、培養処理後に遠心分離し、単離した単核細胞を培養した。これらの細胞が MSCs であることを証明するために、フローサイトメトリーで間葉系マーカー(D29, CD44, CD90, CD105)陽性、造血マーカー(CD34, CD45)陰性の細胞群を抽出し、抽出した細胞が MSCs であることを証明した。MSCs の機能評価はできなかったが、胎仔肺組織から MSCs と考えられる細胞を抽出する手技を確立することができた。

また、8週齢ブタにおいて全身麻酔下に気管支鏡を行い撒布チューブを用いて右前葉に選択的にLPS(055:B5、1mg/kg)を気道内投与した。同様に左前葉には選択的にPBSを投与しコントロールとした。LPS投与後より経時的(0、2、6、48時間後)にCTを撮像し、右前葉に限局した急性肺障害を確認した。また48時間後に摘出した肺組織のHE染色では、LPSを投与した右前葉は左前葉と比較し肺泡隔壁の肥厚と多数の細胞浸潤を認め、ブタにおけるLPS誘導急性肺障害モデル作成の手技を確立することができた。

この急性肺障害モデルに、MSCsを投与することとし、事前にFL-MSCsにPKH-26 Red Fluorescent Cell Linker Kitを用いて色素でラベリングした。LPS投与12時間後、右前葉にDMEMを投与するLPS+DMEM群、右前葉にDMEM内で調整したFL-MSCs(2×10^6 cells/kg)を投与するLPS+FL-MSCs群を作成し、それぞれ経時的(0、2、6、48時間後)にCTを撮像した。同時に血清・BAL(10ml \times 2回)を採取し、最終的(LPS投与48h後)に犠牲死させ両肺を摘出した。摘出肺の組織学的検討で、MSCsの生着を確認したものの、適切に型肺泡上皮細胞・型肺泡上皮細胞への分化を確認するには至らなかった。しかし、MSCsを用いることで、今後の肺再生の基礎的知見を得ることが期待できると考える。

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------