

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590589

研究課題名（和文） 全身炎症モデルにおける多能性前駆細胞の同定および急性・慢性炎症性疾患への応用研究

研究課題名（英文） Elucidation of the source of pluripotent progenitor cells in systemic inflammatory mouse model.

研究代表者

山本誠士（YAMAMOTO SEIJI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：10456361

研究成果の概要（和文）：敗血症病態において、骨髄から動員される幼若球が、骨髄由来多能性前駆細胞である可能性を検討した。本研究の結果、細胞表面抗原（CD34）の違いにより少なくとも 2 種類の前駆細胞の存在が考えられた。CD34 陰性前駆細胞は早期に肺に動員されるが、CD34 陽性前駆細胞の動員は遅いことが確認された。また、これら 2 種類では貪食能などに違いがあり、CD34 陽性前駆細胞は貪食能が強く、CD34 陰性前駆細胞は肺組織に対して保護的に働くと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In systemic inflammatory response syndrome, myeloblasts are observed in injured lung. To elucidate, whether pluripotent progenitor cells (myeloblasts) differentiate to alveolar type II cells or support to survive of the alveolar cells in sepsis. We demonstrated that pluripotent progenitors were classified 2 subsets by CD34 expression. Although CD34⁺ subset showed strong phagocytic activity, CD34⁻ subset may have alveo-protective effect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物治療学・組織再生

1. 研究開始当初の背景

敗血症などの全身性炎症反応症候群（systemic inflammatory response syndrome: SIRS）では、その増悪期には主要臓器不全や血管内皮細胞傷害を合併し、救急・集中治療管理を必要とすることが多い。その中でも急性肺傷害は SIRS に合併す

る代表的な臓器傷害であり、SIRS や敗血症の治療の遷延により不可逆的機能障害を残しやすい。これまで、肺でガス交換を行う 1 型肺胞上皮細胞は、2 型肺胞上皮細胞からのみ分化すると考えられてきた。このため、急性肺傷害では 2 型肺胞上皮細胞を保護することが、肺胞の維持のために重要と現在

も考えられている。しかし、私たちは本申請に際しての事前研究で、敗血症肺に動員され上皮細胞の分化マーカーを発現する、骨髄由来多能性前駆細胞 (bone marrow derived pluripotent progenitor cells; BMDPPCs) の特殊免疫染色法を確立し、さらに、敗血症肺の再構築に BMDPPCs が重要な役割を果たしている可能性を確認した。

2. 研究の目的

このような背景から、SIRS や敗血症時の肺傷害に対して、BMDPPCs が保護的な働きを有するのか、さらには BMDPPCs が SIRS や敗血症で傷害を受ける 2 型肺胞上皮細胞や血管内皮細胞などに直接分化するのかを検証することを目的としている。また、近年、マウス心筋梗塞モデルにおいて、傷害心筋に動員されてくる単球の由来が脾臓であることが証明されるとともに、単球の役割が心筋保護である可能性が示唆された。そのようなことから、BMDPPCs を用いた肺傷害の治療を考える上で BMDPPCs の由来を明らかにすることが重要であると考えられる。我々の研究対象である BMDPPCs の由来が脾臓であるのか、または骨髄であるかを証明することも研究目的とした。

3. 研究の方法

①肺傷害モデル動物の作成

研究動物には、雄性 C57BL/6 マウス (8-12 週) を用いることとした。敗血症は、大腸菌エンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与して作成することとした。

②BMDPPCs の誘導形式の観察

敗血症病態で誘導される BMDPPCs は、上皮性分化を特徴とする抗サイトケラチン抗体陽性細胞として特徴付けられた。しかし、これに加えて、BMDPPCs は血管内皮細胞を含むさまざまな細胞へ分化する可能性をもつため、その分化能力の多様性を、CD45, CD11b, F4/80, Gr-1, Sca-1, c-kit, CD31, α SMA などの他の組織抗体を用いて、多重免疫組織染色を行い、敗血症の時系列に沿って評価する。

③BMDPPCs の細胞培養

敗血症病態の末梢血、骨髄、脾臓、または肺から flow cytometry 法により BMDPPCs の単離を試みる。BMDPPCs が単離できているかは cytokeratin 陽性であるかで判断する。これらの BMDPPCs は基本細胞培養液にて細胞培養される。この細胞培養過程での細胞形態変化を詳細に観察するとともに、BMDPPCs の増殖率、生存率、分化率を評価する。

④BMDPPCs の肺傷害モデル動物への移入

GFP マウスを用い、flow cytometry 法により、BMDPPCs を敗血症病態の末梢血、骨髄、脾臓、または肺から単離し、敗血症野生型マウスに移入し、肺などの傷害臓器に対してどのように作用するか、または 2 型肺胞上皮細胞や血管内皮細胞などに直接分化するかを確認する。

⑤BMDPPCs の骨髄由来性の確認

正常マウスと敗血症マウスの骨髄および脾臓を採取し、BMDPPCs のマーカーであるサイトケラチンの発現を確認する。さらに、脾臓摘出モデルなどを作成し、敗血症状態で BMDPPCs の肺への動員に差があるかを確認する。

4. 研究成果

LPS 誘導敗血症モデル肺において、細胞表面抗原の違いにより少なくとも 2 種類の BMDPPCs の存在が考えられた。flow cytometry を用いた解析の結果、サイトケラチン陽性 BMDPPCs は、CD34 陰性 BMDPPCs と CD34 陽性の BMDPPCs の 2 種類に大別された。CD34 陰性 BMDPPCs は敗血症惹起後に非常に迅速に (1 時間以内) 肺実質へ動員されることが明らかとなった。一方、CD34 陽性の BMDPPCs は、CD34 陰性 BMDPPCs よりも動員が遅いことが確認された。

2 種類の BMDPPCs を培養した結果、CD34 陽性 BMDPPCs のみ培養が可能で、強い食食能を有することも観察された。免疫細胞化学による表面抗原の解析結果から、CD34 陽性細胞はマクロファージ系抗原を示さず、増殖能および分化能を有する可能性が示唆された。

同定された 2 種類の BMDPPCs を GFP マウスから flow cytometry によって単離し、敗血症を惹起した野生型マウスに投与したが、炎症状態の肺にはほとんどリクルートされず、他の網内系組織等でトラップされていることが示唆された。

現在までに、急性心筋梗塞モデルなどで傷害部位にリクルートされる単球/マクロファージは脾臓がリザーバーとなっていることが示唆されているので、本研究で同定した BMDPPCs は脾臓を一時的な待機場所としているのかも検討した。脾摘モデル等の検討結果から、BMDPPCs は脾臓を経由せず、骨髄から直接リクルートされることが強く示唆された。

今後は骨髄から直接 BMDPPCs を単離し、炎症肺にダイレクトに投与する方法や ex vivo 系による経時的な可視化の系を構築することによって BMDPPCs の敗血症治療に対する有用性を検討するとともに、分化能についてもさらに検討することとする。

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 10 件)

- ① Kageyama S, Yokoo H, Tomita K, Kageyama-Yahara N, Uchimido R, Matsuda N, Yamamoto S, Hattori Y: High glucose-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells involves up-regulation of death receptors. *Cardiovasc Diabetol*, 査読有, 10, 73, 2011.
- ② Matsui-Hirai H, Hayashi T, Yamamoto S, Ina K, Maeda M, Kotani H, Iguchi A, Ignarro LJ, Hattori Y: Dose-dependent modulatory effects of insulin on glucose-induced endothelial senescence in vitro and in vivo: a relationship between telomeres and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, 査読有, 337, 591-599, 2011.
- ③ Takano K, Yamamoto S, Tomita K, Takashina M, Yokoo H, Matsuda N, Takano Y, Hattori Y: Successful treatment of acute lung injury with pitavastatin in septic mice: potential role of glucocorticoid receptor expression in alveolar macrophages. *J Pharmacol Exp Ther*, 査読有, 336, 381-390, 2011.
- ④ Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, Shibuya M: VEGFR-1 signaling promotes mobilization of macrophage-lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth. *Cancer Res*, 査読有, 70, 8211-8221, 2010.
- ⑤ Hattori Y, Takano K, Teramae H, Yamamoto S, Yokoo H, Matsuda N: Insights into sepsis therapeutic design based on the apoptotic death pathway. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 114, 354-365, 2010.
- ⑥ Matsuda N, Teramae H, Futatsugi M, Takano K, Yamamoto S, Tomita K, Suzuki T, Yokoo H, Koike K, Hattori Y: Up-regulation of histamine H4 receptors contributes to splenic apoptosis in septic mice: counteraction of the antiapoptotic action of nuclear factor-kappaB. *J Pharmacol Exp Ther*, 査読有, 332, 730-737, 2010.
- ⑦ Matsuda N, Teramae H, Yamamoto S, Takano K, Takano Y, Hattori Y: Increased death receptor pathway of apoptotic signaling in septic mouse aorta: effect of systemic delivery of FADD siRNA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 査読有, 298, H92-H101, 2010.
- ⑧ Miyamoto S, Cooper L, Watanabe K, Yamamoto S, Inoue H, Mishima K, Saito I: Role of retinoic acid-related orphan receptor-alpha in differentiation of human mesenchymal stem cells along with osteoblastic lineage. *Pathobiology*, 査読有, 77, 28-37, 2010.
- ⑨ Matsuda N, Yamamoto S, Yokoo H, Tobe K, Hattori Y: Nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorate impaired glucose tolerance and insulin resistance in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care Med*, 査読有, 37, 2791-2799, 2009.
- ⑩ Matsuda N, Yamamoto S, Takano K, Kageyama S, Kurobe Y, Yoshihara Y, Takano Y, Hattori Y: Silencing of fas-associated death domain protects mice from septic lung inflammation and apoptosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 査読有, 179, 806-815, 2009.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Yamamoto S, Azuma E, Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Miyazaki K, Dohmoto M, Muramatsu M, Niida S, Hattori Y: Endothelial microparticles behave as a bioactive carrier in the cellular interaction. The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization/The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, December 8-10, 2011, Tokyo, Japan: P-012.
- ② Yamamoto S, Azuma E, Muramatsu M, Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Miyazaki K, Dohmoto M, Matsuda N, Niida S, Hattori Y: EMPs behave as the bioactive carrier in inflammatory condition. The Second Pacific Symposium on Vascular Biology, October 30-November 2, 2011, Jeju, Korea: 33.
- ③ Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Dohmoto M, Kita S, Iwamoto T, Komuro I, Takano KI, Niida S, Shibuya M, Matsuda N, Hattori Y: CNS pericytes originate from the circulating hematopoietic progenitors. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, July 17-23, 2010, Copenhagen, Denmark: Thu 286.
- ④ Takano KI, Yamamoto S, Tomita K, Yamazaki H, Yokoo H, Takano Y, Hattori Y: Pitavastatin improves lung inflammation and survival in septic mice: prevention of reduced lung

glucocorticoid receptors. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, July 17-23, 2010, Copenhagen, Denmark: FC09.1.6.

- ⑤ Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Dohmoto M, Koo BN, Mukouyama Y, Osawa T, Takahashi H, Takano KI, Watanabe Y, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Usui I, Tobe K, Niida S, Shibuya M, Matsuda N, Hattori Y: NG2 positive cerebral microvascular pericytes are potentially derived from circulating myeloid progenitors. The 16th International Vascular Biology Meeting, June 20-24, 2010, UCLA, Los Angeles, California: #838 (W99).
- ⑥ Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, Shibuya M: Involvement of Flt-1 signal in solid tumor growth and tumor angiogenesis via recruitment of macrophage-lineage cells. The American Association for Cancer Research 101st Annual Meeting, April, 2010, Washington D. C. USA: P-1301.
- ⑦ Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Dohmoto M, Osawa T, Takahashi H, Takano KI, Ikutani M, Nagai Y, Takatsu K, Usui I, Tobe K, Niida S, Shibuya M, Matsuda N, Hattori Y: Cerebrovascular pericytes are potentially derived from the circulating myeloid progenitors. Keystone Symposia, Angiogenesis in Health and Disease, Feb 28-Mar 5, 2010, Keystone, Colorado: 321.
- ⑧ Matsuda N, Hattori Y, Yamamoto S, Teramae H, Koike K: Inhaled TAK1 siRNA improves lung inflammation and apoptosis by reducing transcriptional activity of NF- κ B and AP-1 in septic mice. Society of Critical Care Medicine 39th Critical Care Congress, Jan 9-13, 2010, Miami, Florida.
- ⑨ Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, Shibuya M: Macrophage-lineage cell derived from bone marrow promotes solid tumor growth and tumor angiogenesis via Flt-1 signaling. The 7th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology, August 20-21, 2009, Korea: P-7.
- ⑩ Matsuda N, Hattori Y, Yamamoto S, Yamazaki H, Koike K: Impact of transcription factor decoy to AP-1 on the Lung apoptosis of septic mice. Society of critical Care Medicine 38th Critical Care Congress, Jan 31-Feb 4, 2009, Nashville.
- ⑪ Hatakeyama N, Matsuda N, Yamamoto S,

Aoki Y, Hattori Y, Yamazaki M: Involvement of Ca²⁺ and Na⁺ Channels in the mechanism of tachyarrhythmia in septic guinea pig atrium. Society of critical Care Medicine 38th Critical Care Congress, Jan 31-Feb 4, 2009, Nashville.

- ⑫ Yamamoto S: Vascular mural cells are potentially derived from the circulating myeloid progenitors. The 1st Toyama University-Chungnam National University Joint International Symposium, February 5-7, 2009, Chungnam National University, Daejeon, Korea.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/pharma/members/yamamoto.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 誠士 (YAMAMOTO SEIJI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号: 10456361

(2) 研究分担者

服部 裕一 (HATTORI YUICHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号: 50156361

(3) 連携研究者

長井 良憲 (NAGAI YOSHINORI)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号: 30431761