

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4月15日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590980

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞由来肺組織保護因子の網羅的同定と治療応用

研究課題名（英文） Identification of paracrine factors from mesenchymal stem cell for protection and treatment against lung injury

研究代表者

大河内 真也 (Shinya Ohkouchi)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40375035

研究成果の概要（和文）：

動物モデルにおいて間葉系幹細胞（MSC）投与は肺障害を軽減する。機序として障害局所のMSC生着分化が重視されてきたが、局所でのMSC外分泌能がより重要との報告が増加している。著者はMSCsのSTC1分泌が紫外線が誘導する線維芽細胞障害を軽減させることを報告している（Stem cell 23, 2009, 670-81）。今回の研究ではMSCs由来STC1がミトコンドリア膜タンパクUncoupling Protein 2（UCP2）を介して肺胞上皮細胞のWarburg効果（好気性代謝および嫌気性代謝双方を用いることにより細胞のエネルギー代謝が改善する効果）、過酸化物質（ROS）減少を誘導することにより障害を軽減する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Previous studies have demonstrated that mesenchymal stromal cells (MSCs) enhance cell survival through upregulation and secretion of stanniocalcin-1 (STC1). This study shows that MSC-derived STC1 promotes survival of lung cancer cells by uncoupling oxidative phosphorylation, reducing intracellular reactive oxygen species (ROS), and shifting metabolism towards a more glycolytic metabolic profile. MSC-derived STC1 upregulated uncoupling protein 2 (UCP2) in injured A549 cells in an STC1-dependent manner. Knockdown of UCP2 reduced the ability of MSCs and recombinant STC1 (rSTC1) to reduce cell death in the A549 population. rSTC1-treated A549 cells displayed decreased levels of ROS, mitochondrial membrane potential (MMP), and increased lactate production, all of which were dependent on the upregulation of UCP2. Our data suggest that MSCs can promote cell survival by regulating mitochondrial respiration via STC1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：(1) 間葉系幹細胞 (2) Stanniocalcin1 (3) アポトーシス (4) 過酸化ストレス (5) Uncoupling Protein 2 (6) 嫌気性代謝 (7) Warburg効果 (8) 肺胞細胞

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞（MSC）は肺障害を軽減する

ことが知られている。機序として障害局所のMSC生着分化が重視されてきたが、局所で

の MSC 外分泌能がより重要との報告が増加している。

研究代表者は2006年から2008年にかけてアメリカ合衆国ニューオリンズ市にあるチューレン大学遺伝子治療研究センター Tulane University Center for Gene Therapy) の Darwin Prockop 教授のもとで、MSCs が分泌する液性因子である Stanniocalcin-1 (STC1) が紫外線が誘導する線維芽細胞障害を軽減させること、肺胞上皮細胞の虚血環境下 (低酸素アシドーシス) における細胞死を抑制することを見出していた (Stem cell 23,2009,670-681)。

MSCs は更に、多彩な免疫抑制作用を有することが知られており、骨髄移植による移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) や閉塞性細気管支炎 (bronchiolitis obliterans; BO)、グラム陰性桿菌由来のリポ多糖類 (Lipopolysaccharide; LPS) による敗血症 (sepsis) における過剰な自己免疫反応を抑制することにより、各種疾患に役立つことが期待されているが、これらの機序に MSCs 由来の液性因子、すなわち MSCs の外分泌能が関わるということが明らかになりつつあり、すでに臨床応用段階に入りつつある (J Cell Biochem 113,2012,1460-1469)。

上記所見より、研究代表者は MSCs が分泌する多彩な個々の液性因子、あるいはその組み合わせに、間質性肺疾患や肺癌等の難治性呼吸器疾患に対する新規治療法開発の可能性を考え「間葉系幹細胞由来肺組織保護因子の網羅的同定と治療応用」として本研究を申請し受理された。

2. 研究の目的

当初は MSC が分泌する肺保護因子を網羅的に同定する予定であったが、研究を通して、

前述の Stanniocalcin-1 (STC1) がミトコンドリア膜電位を調整する蛋白 Uncoupling Protein 2 (UCP2) を直接誘導すること、そのことを通して細胞の好気性代謝・嫌気性代謝 (無酸素下で解糖を使って ATP 産生を行う代謝、結果として乳酸代謝が亢進する)、ワルブルグ効果 (好気環境下でも解糖が亢進する状況で、低酸素低栄養環境での癌の生存に密接な関係を持つ) が分かった。

これは肺癌や間質性肺炎のみならず、糖尿病や神経疾患などあらゆる疾患の病態に関わる重要な現象と考えられたため、MSCs 由来の Stanniocalcin-1 (STC1) に関する研究を優先して深めることとした。

3. 研究の方法

細胞非透過性、液性因子透過性の Transwell プレートを用いて MSC と肺癌、肺胞上皮を非接触下に共培養、もしくは単独で培養した。このさいに recombinant STC1 を加えたり、STC1 特異的抗体を加えたり、siRNA により MSCs の STC1 分泌能を奪ったりして実験を行った。また低酸素状態や過酸化水素下、乳酸存在下に研究を行った。

ミトコンドリアに対する作用は、過酸化物の生成や乳酸代謝を、蛍光色素による染色や比色法による定量により行った。

Uncoupling Respiration (非共役呼吸、Warburg 効果) は細胞の酸素消費量、乳酸生成量を Seahorse 社の細胞外フレックスアナライザーで評価した。

4. 研究成果

MSC 由来 STC1 が、H₂O₂、虚血、抗癌剤 (Paclitaxel) (いずれも過剰な ROS を誘導) 暴露下の肺癌、肺胞上皮細胞に対して、UCP2 産生亢進を介する以下の作用、①ミトコンドリア膜電位過剰作用に基づく ROS 減少、②

非共役呼吸誘導によるエネルギー代謝改善により障害を軽減することを示した。これは STC1 が Warburg 効果に関与することと、肺癌が抗癌剤に耐性獲得する機序に STC1 が役割を果たし得ることを示唆した。

また、STC1 気管内投与はブレオマイシンの気管内投与を受けたマウスの肺の線維化、過酸化ストレスを抑制することを示した。

また、STC1 はコレステロールや中性脂肪、ケトン体の代謝を促進させることをしました。

また、MSCs 由来液性因子 (Secretaly Lung Proteinase Inhibitor; SLPI) がマウスのエラストラーゼ誘導肺気腫モデルに於いて気腫形成を抑制する可能性を大学院生の Katsha AM 氏と明らかにした。

これら知見の一部は、下記にあげた論文で報告済みであり、未発表の知見も随時学術誌で報告する予定である。

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 4 件)

- ① Kanehira M, Kikuchi T, Ohkouchi S, Shibahara T, Tode N, Santoso A, Daito H, Ohta H, Tamada T, Nukiwa T. Targeting lysophosphatidic Acid signaling retards culture-associated senescence of human marrow stromal cells. 査読有 PLoS One. 2012;7(2):e32185. Epub 2012 Feb 16.

- ② Ohkouchi S, Block GJ, Katsha AM, Kanehira M, Ebina M, Kikuchi

T, Saijo Y, Nukiwa T, Prockop DJ. Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1. 査読有 Mol Ther. 2012 Feb;20(2):417-23. doi: 10.1038/mt.2011.259. Epub 2011 Dec 6.

- ③ Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, Kanehira M, Sun R, Nukiwa T, Saijo Y. Paracrine Factors of Multipotent Stromal Cells Ameliorate Lung Injury in an Elastase-induced Emphysema Model. 査読有 Molecular Therapy (2011) 19 1, 196–203. doi:10.1038/mt.2010.192. (大河内は Corresponding Author)。

- ④ Ebina M, Ohkouchi S, Nukiwa T et al. Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Pulm Med.2011:916486.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 日本癌学会 (2011.10.5 名古屋国際会議場) 大河内真也、菊地利明、海老名雅仁、貫和敏博 STC1 は UCP2 誘導を介した過酸化ストレス軽減と非共役呼吸誘導をとおして、肺がん細胞の生存を誘導する。
- ② 欧州呼吸器学会年次集会 (2011.9.25 オランダ、アムステルダム REI) Shinya Ohkouchi, Toshiaki Kikuchi,

Masahito Ebina, Toshihiro Nukiwa
Poster presentation; Novel functions of
stanniocalcin-1(STC1) through
Uncoupling Protein 2 (UCP2)
up-regulation; Promoting Survival of
Cancer Cells under Oxidative Stress and
Inducing the Uncoupling Respiration
(Warburg effect)

- ③日本呼吸器学会学術総会(2010.4.21 京都
国際会議場)
大河内眞也, Ahmed Katcha, 兼平雅彦,
菊地利明, 海老名雅仁, 貫和敏博
間葉系幹細胞(MSCs)分泌 Stanniocalcin1
(STC1) が誘導する UncouplingProtein2
(UCP2) 依存性 ReactiveOxygenSpecies
(ROS) 抑制作用と Warburg 効果

[図書] (計 7 件)

- ① 大河内眞也、海老名雅仁 「自己免疫性
肺胞蛋白症の症例」 厚労省難治疾患克
服事業、肺胞蛋白症の難治化要因の解明
と診断、治療、管理の標準化と指針の確
立に関する研究、平成 23 年度報告書、
P.84-96、2011.3.31
- ② 大河内眞也 「肺気腫モデル」 完全版
マウスラット疾患モデル活用ハンドブッ
ク、P.490-498、羊土社、2011.1.1
- ③ 大河内眞也、貫和敏博 「特発性肺線維
症臨床試験のエビデンス形成」 治療学
2010 年 5 月号 P.100-104 ライフサイエ
ンス出版 2010.5.10
- ④ 大河内眞也、貫和敏博 「典型的自己免
疫性肺胞蛋白症症例の明確化に関する研
究」 厚労省難治疾患克服事業「肺胞蛋

白症の難治化要因の解明と診断、治療、
管理の標準化と指針の確立に関する研究
平成 21 年度報告書」P.115-121、2010.3.31

- ⑤ 大河内眞也 「特発性間質性肺炎」呼吸
器疾患ガイドライン最新の診療指針
P96-99, 総合医学社 2009.6

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ①名称: ケトーシス又はケトアシドーシス予
防又は治療剤
発明者: 大河内眞也
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 2011-086926
出願年月日: 2011.1.12
国内外の別: 国内
- ②名称: 線維症予防又は治療用医薬組成物
発明者: 大河内眞也
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 2011-152392
出願年月日: 2011.2.10
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大河内 眞也 (Shinya Ohkouchi)
東北大学・病院・助教
研究者番号: 40375035

(2)研究分担者

貫和 敏博 (Toshihiro Nukiwa)

東北大学・大学院医学系研究科・

名誉教授

研究者番号：40129036

(3)連携研究者

西條 康夫 (Yasuo Saijo)

新潟大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号：10270828