

## 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31日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659295

研究課題名（和文） 放射線肺臓炎に対する幹細胞移植療法の開発

研究課題名（英文） Cell transplantation therapy in radiation pneumonia

研究代表者

玉井 好史（TAMAI YOSHIFUMI）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：90207225

研究成果の概要（和文）：放射線肺臓炎は放射線治療を受けている患者にとって重要な合併症となっている。本研究において放射線肺臓炎に対する細胞移植治療の有効性を検討した。本研究では肺への分化能を有する間葉系幹細胞を用いて移植療法の有効性を検討した。その結果、幹細胞の肺への分化率は低かったが、放射線肺臓炎の急性炎症及び慢性炎症の抑制には一定の治療効果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Radiation pneumonia is an important complications in the patients who receive radiotherapy. We examined an efficacy of the cell transplantation therapy for the radiation pneumonia in this study. Transplantation therapy using mesenchymal stem cells provided the low degree of differentiation to the lung, but the effect of treatment was obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	0	1,200,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療学

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療において生じる放射線肺臓炎は、放射線治療における重大な副作用のひとつであり、放射線肺臓炎が発生すると治療部位に十分な線量をかけることができず、局所再発し予後不良となることが多い。そのため諸家において放射線肺臓炎を抑制するため、現在行われている副腎皮質ステロイドによる治療の他検討されているが未だ満足させる治療法

はない。

我々は、これまで世界に先駆け、活性酸素や、再生医療の観点から放射線肺臓炎の発生メカニズムと治療法を検討してきた。なかでも、放射線の照射後の急性期に生じる炎症機転に活性酸素が強く関与し、最終的に肺が線維化することや、活性酸素抑制剤の投与が、急性炎症を抑制し、放射線肺臓炎の発症を遅らせることを報告した。しかし、放射線肺臓

炎の発症を完全に予防、または治療させることはできなかった。

世界中でも新たな治療法の検討が行われた。なかでも、線維化を発症する中心的なサイトカインであるTGF- $\beta$ の制御に関わる研究は期待されたが、TGF- $\beta$ を抑制しても、その作用が特異的ではなく、また、放射線照射によって障害を受けた肺組織が再生することはなく、治癒させることはできなかった。

一方で、骨髄幹細胞や肺性幹細胞が肺障害時の治癒機転に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、ラット放射線肺臓炎モデルを利用し、肺組織保護作用を有するFGF、VEGFやHGF遺伝子を導入した骨髄幹細胞の投与が、肺組織の再生を促進、さらに、放射線肺臓炎の治癒を促進し、延命効果を誘導することを明らかにしたが、問題点として骨髄幹細胞の生着率が低いことを示したが、いまだ、この問題は解決されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラット放射線肺臓炎モデルを利用して、肺に分化する可能性のある幹細胞移植治療の有効性を急性炎症及び慢性炎症に分け明らかにし、さらに、その有効性のメカニズムを解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 平成21年度：間葉系幹細胞の分離同定 (in vitro)

間葉系幹細胞は、フィッシャーラットから採取した。ラットを全身麻酔下で鼠径部を切開し、脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織はコラーゲン処理を行った後、ストレーナーを用いて濾過し、濾過液を培養した。これまでの我々の研究で、3回継代培養した細胞がCD29、CD90陽性であり、CD34、CD45、 $\alpha$ SMA陰性の多分化能を持つ間葉系幹細胞であることがわかっており、FACS装置を用いて間葉系幹細胞を分離した。

### (2) 幹細胞の肺組織への分化や生着の検討 (in vivo)

幹細胞の肺組織への生着や分化の検討に関しては、幹細胞を分離同定するときに、DiIを取り込ませておくことにより、肺組織において、DiI陽性細胞を病理組織学的に確認することにより検討した。

### (3) 細胞シートの作成

細胞シートの作製は、上述した方法で分離同定した幹細胞をトリプシン処理にて分離し、セルシード社の温度応答性培養皿を用い再培養することにより行う。温度応答性培養皿は、培養皿に温度処理を行うことにより温度を20℃まで低下し、細胞シートを作成する。

### (4) 放射線肺臓炎モデルの作製

ラット放射線肺臓炎モデルは、フィッシャーラットにリニアック20Gの線量を7分間右肺に照射するモデルを使用する。このモデルは、従来我々が放射線肺臓炎モデルとして長年使用しているモデルであり放射線照射後2週間後までに片肺に急性障害が生じ、6カ月後には慢性障害が生じるモデルである。このモデルを用いてすでに我々は、急性期放射線肺障害の評価をCT検査及び肺胞洗浄液と組織学的変化で、また、慢性期放射線障害の変化をCT検査及び組織学的に評価する方法をすでに確立している。

### (5) 治療効果の検討

このモデルではすでに、放射線照射2週後に照射肺の毛細血管の透過性が亢進していることが明らかになっているので、放射線照射2週後に胸部CT写真を撮影し肺の浸潤影の有無を比較検討しまた、気管支肺胞洗浄および組織学的検討を行うことにより、治療効果を評価した。

また、このモデルではすでに、放射線照射24週後に肺の線維化が生じてくる事が明らかである。そこで、放射線照射24週後に胸部CT写真を撮り線維化を評価し、またアザン染色を用いた組織学的検討とヒアルロン酸の定量を行い、治療効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 間葉系幹細胞の分離同定 (in vitro)

実験計画通りに幹細胞は、フィッシャーラットから採取した。ラットを全身麻酔下で鼠径部を切開し、脂肪組織を採取し予定通りにコラーゲン処理を行った後、ストレーナーを用いて濾過し、濾過液を培養した。

3回継代培養を行い培養した細胞がCD29、CD90陽性であり、CD34、CD45、 $\alpha$ SMA陰性の多分化能を持つ間葉系幹細胞であることをFACS装置を用いて確認し、以下の治療効果やメカニズムを検討する実験に使用した。

(2) 細胞の生着に関して幹細胞に取り込んだDiI は炎症の生じている肺組織において検出することができた。しかしながら、ほとんどの細胞は、局在しているだけであり明らかに肺細胞に分化している細胞は投与した細胞の2%前後であった。さらに、長期的な生着はほとんどなく、分化に及ぼす影響はわずかであると考えられた。

(3) 細胞シートの作製は至適条件の設定が難しいことが知られているが、様々な条件を検討し、初代培養および継代培養を10cmのディッシュで行い、継代培養は細胞がコンプレントになったらすぐに3回行い、 $1 \times 10^6$ 個の細胞数を温度応答性培養皿に播種し2-3日後に細胞シートを取り出すことにより、良質な細胞シートが得られたため治療効果の検討に利用した。

(4) 放射線肺臓炎モデルラットを予定通りに作成し、放射線照射後2週間に片肺に急性障害が生じ、6カ月後には慢性障害が生じる事を確認し、治療効果やメカニズムの検討に用いた。

(5) このモデルではすでに、放射線照射2週後に照射肺の毛細血管の透過性が亢進していることが明らかになっているので、放射線照射2週後に胸部CT写真を撮影し肺の浸潤影の有無を比較検討した。前述したように、肺の分化に関しては、認められなかったが、肺の浸潤影は細胞移植を行うことにより、軽減していた。さらに、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数は減少しタンパクの値も低下しており一定の治療効果が認められた。また、肺の線維化に関しては、放射線照射24週後の胸部CT写真でわずかに肺の線維化は、軽減しており、病理組織学的にアザン染色を用いた検討においてもアザン染色陽性領域は減少しており治療効果が確認できた。さらに、ヒアルロン酸の定量においても細胞移植治療を行った群では、値が低下しており、治療効果が確認できた。しかしながら、治療を行った群において長期間飼育し、肺線維症を完全に抑制することができるかどうか検討したが、最終的には肺線維症が発症し、肺組織への分化の問題も含め、更なる検討が必要であることが明らかとな

った。

## 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6件)

- ① Komatsu T, Oizumi Y, Kunieda E, Tamai Y, Akiba T, Kogawa A. Definitive chemoradiotherapy of limited-disease small cell lung cancer: Retrospective analysis of new predictive factors affecting treatment results. *Oncology Letters*. 2011;2(5):855-860. 査読有
- ② Shizuma T, Tanaka C, Mori H, Fukuyama N. Investigation of Bacteremia due to *Aeromonas* Species and Comparison with That due to Enterobacteria in Patients with Liver Cirrhosis. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;930826. 査読有
- ③ Shizuma T, Nagano M, Fujii A, Mori H, Fukuyama N. Therapeutic effects of four molecular-weight fractions of Kurozu against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Turk J Gastroenterol*. 2011 ;22(4):376-81. 査読有
- ④ Shizuma T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N. Protective effects of Kurozu and Kurozu Moromimatsu on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci*. 2011;56(5):1387-92. 査読有
- ⑤ Shizuma T, Ishiwata K, Nagano M, Mori H, Fukuyama N. Protective effects of fermented rice vinegar sediment (Kurozu moromimatsu) in a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma animal model. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;49(1):31-5. 査読有
- ⑥ Ishii M, Tanaka E, Imaizumi T, Sugio Y, Sekka T, Tanaka M, Yasuda M, Fukuyama N, Shinozaki Y, Hyodo K, Tanioka K, Mochizuki R, Kawai T, Mori H, Makuuchi H. Local VEGF administration enhances healing of colonic anastomoses in a rabbit model. *Eur Surg Res*. 2009;42(4):249-57. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ① 静間徹, 石渡一夫, 福山直人. 機能性食品の発展性 肝虚血後再灌流動物モデルにおけるケルセチンの効果. 第27回日本静脈経腸栄養学会、2012年2月23日、神戸国際会議場(兵庫県)
- ② 塚本祐子, 瀧澤俊也, 福山直人, 小原さおり, 清水美沙, 高張洋子, 永田栄一郎, 高木繁治. 2型糖尿病モデルラットにおける頭蓋内微小動脈の血管反応性についての検討、2011年11月5日、第23回日本脳循環代謝学会総会、都市センターホテル(東京都)
- ③ 静間徹, 吉野肇一, 福山直人. 消化器疾患におけるprobioticsと機能性食品の有用性 DEN誘発性肝細胞癌動物モデルを用いた、黒酢もろみ末の抗腫瘍効果と機序の解明. 第53回日本消化器病学会大会、2011年10月21日、福岡国際会議場(福岡県)
- ④ 福山直人, 静間徹, 石渡一夫, 長野正信, 盛英三. 黒酢もろみ末における抗腫瘍効果 VEGFタンパク発現の抑制. 第48回日本外科代謝栄養学会、2011年7月8日、名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑤ 静間徹, 石渡一夫, 福山直人. DSS誘発性大腸炎動物モデルを用いた、黒酢の抗大腸炎効果. 第48回日本外科代謝栄養学会、2011年7月7日、名古屋国際会議場(愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玉井 好史 (TAMAI YOSHIFUMI)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：21659295

### (2) 研究分担者

福山 直人 (FUKUYAMA NAOTO)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：50349338