

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08167

研究課題名(和文)肺高血圧症ラットモデルにおけるQQ細胞の移植効果

研究課題名(英文) Transplantation of Quality-quantity cultured Cells exerts cardioprotective effects by enhancing anti-inflammation and vasculogenic potential in pulmonary arterial hypertension model

研究代表者

関根 佳織 (Sekine, Kaori)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：70408011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性サイトカインの関与が示唆されている特発性肺動脈性肺高血圧症(IPAH)は、生命予後が悪く、治療が確立されていない。本研究で用いるQuality-Quantity Cultured Cells (QQ細胞)は、血管再生能・組織再生能・抗炎症効果を有する細胞群である。IPAHラットモデルを用い、QQ細胞の抗炎症作用による細胞移植治療効果を検討した。PAH未治療群と比較し、QQ細胞投与群の生存率は高く、肺組織のPCR解析では、抗炎症作用を示すM2マクロファージが増加し、炎症性サイトカインが減少していた。上記の結果より、QQ細胞移植による肺への抗炎症作用の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPAHは炎症性サイトカインによる細肺動脈の閉塞が原因のため、重症例は肺移植や肺動脈拡張剤の持続投与が必要であり、肺移植後はドナー不足・術後は免疫抑制を必要とする。それに対し、QQ細胞は抗炎症作用をもち、自己末梢血由来のため免疫抑制の必要がなく、短期間でQQ細胞培養が可能である。静脈投与により炎症部位に遊走し、到達困難な局所、臓器全体にも投与可能で治療部位を選ばない。肺移植までのブリッジ治療として、反復投与も可能である。このようなQQ細胞の優れた特徴は、細胞移植の臨床応用に向けての問題を解消する利点があり、限界のある難病の治療法として、社会的・医学的に多くの可能性が見込まれる。

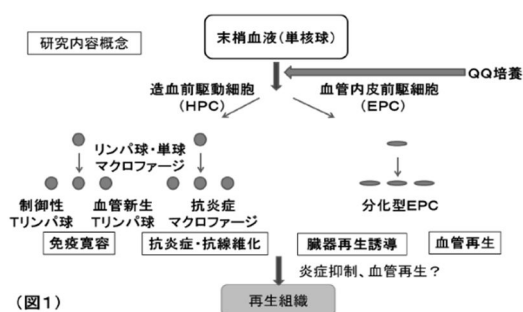
研究成果の概要(英文)： It has been suggested that inflammatory cytokines are associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) for which no treatment has been established and the prognosis to support life is poor. The Quality-Quantity Cultured Cells (QQMNCs) used in this study are a group of cells that have vasculogenic and anti-inflammatory effects that are able to regenerate vascular vessels and regenerate tissue. The use of the anti-inflammatory effects of the QQMNCs on the effectiveness of cell transplantation treatment on an IPAH rat model was investigated. Compared to the PAH-untreated group, the QQMNCs-treated group had a higher survival rate and in a PCR analysis of lung tissue, there was an increase in M2 macrophages which is an indication of anti-inflammatory effects, and there was a decrease in inflammatory cytokines. The above results suggest the effectiveness of transplantation of the QQMNC that resulted in the anti-inflammatory effect on the lungs.

研究分野：小児循環器

キーワード：肺高血圧症 抗炎症作用 QQ細胞 細胞移植治療

1. 研究開始当初の背景

血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells: EPC) は糖尿病・高血圧などの基礎疾患をもつ患者では健常人と比較し、有意に少ないことが治療応用における問題であった。EPC を効率的に培養するために、無血清生体外培養増幅法(Quality and Quantity Culture:QQ 培養)が開発された (Asahara, Stem Cells.2011)。自己末梢血の単核球を QQ 培養することで Quality-Quantity Cultured Cells (QQ 細胞) が獲得される。QQ 細胞は、自己末梢血の単核球分画を増殖因子の刺激のもとに短期間(約 3 日間マウス、5 日間ラット、7-10 日間ヒト)で培養される細胞群からなり、主成分は Macrophage II (CD206+, 65%)、regulatory T-cells (CD25+)、endothelial progenitor cell(以下 EPC, CD34+) などからなり (Masuda H, Stem Cell Transl Med. 2012)。血管再生能・組織再生能・抗炎症効果を有する細胞群(図 1)である (Asahara et al. Stem Cells.2011)。近年の研究により、QQ 細胞は、血管再生作用だけでなく、血管内を炎症部位に遊走し、炎症の強い臓器において抗炎症作用が働くことで炎症の波及を抑制・組織再生を促進することが示唆され、劇症型心筋炎、心筋虚血の研究や下肢脚虚血の治験がすでに行われ、その有効性が示されている。



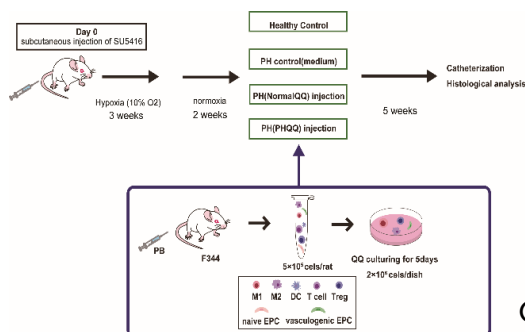
2. 研究の目的

1995 年に重症 PH で IL-1、IL-6 が上昇していることが報告されて以降、特に特発性肺動脈性肺高血圧症 (idiopathic pulmonary arterial hypertension: IPAH)の病態に炎症作用の関与が示唆されている (Rabinovitch, J Clin Invest 2012)。そこで、先行研究の結果から QQ 細胞の抗炎症作用に着目し、IPAH に極似する病態を示す新たな肺高血圧症 Sugen モデル (Abe K, Circulation 2010) を用い、QQ 細胞静脈投与による予後不良かつ治療困難な肺高血圧症 (Pulmonary Hypertension: 以下 PH) の治療効果を評価した。

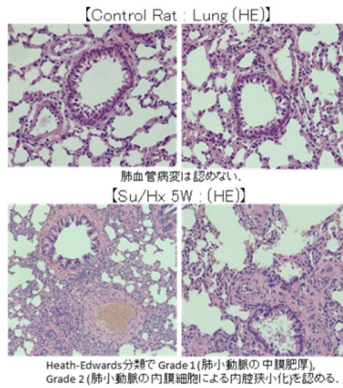
3. 研究の方法

【実験 A】

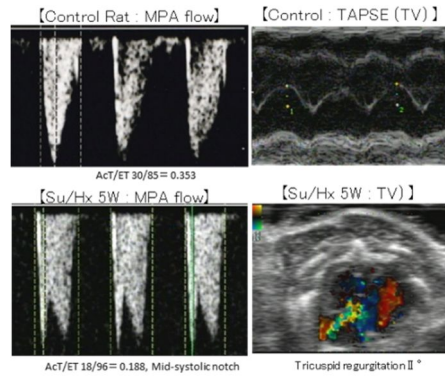
F344 ラットに Sugen5416 を皮下注後、低酸素暴露 (FiO₂ 0.10) を 3 週間実施し肺高血圧モデルを作製 (Sugen/Hypoxia Rat model : Su/Hx) した。HE による組織学的評価と心臓超音波検査で PH ラットに PBS のみ投与、正常ラットの QQ 細胞 (5 × 10⁵ cells/rat) 投与、PH ラットの QQ 細胞 (5 × 10⁵ cells/rat) 投与 群の 4 群間で検討を行った。Sugen 投与後 5 週目 (5W) で尾静脈から投与し、生存期間の有意差、カテーテル、組織学的検討を行った(図 2,3,4)。



(図 2)



(図3)



(図4)

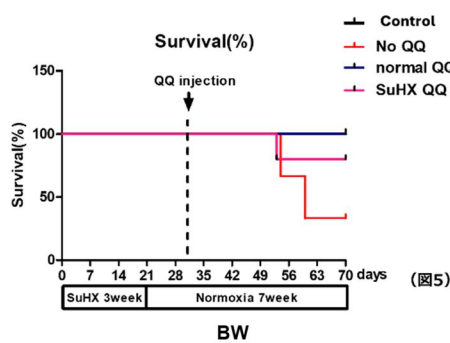
【実験 B】

Sugen/Hypoxia Rat model に QQ 投与後 9 週目 (9W), 14 週目 (14W) で心エコーを実施後, 肺組織での qPCR 測定 (SYBR green 法) を実施し, QQ 細胞を投与しなかった Sugen/Hypoxia Rat model と比較検討した。

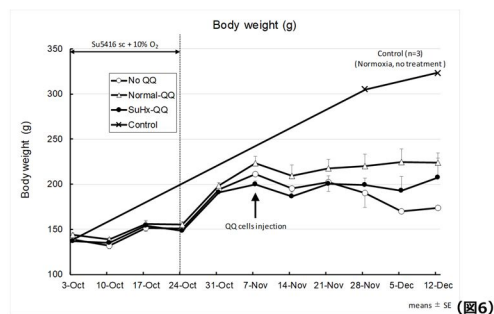
4 . 研究成果

【実験 A 結果】

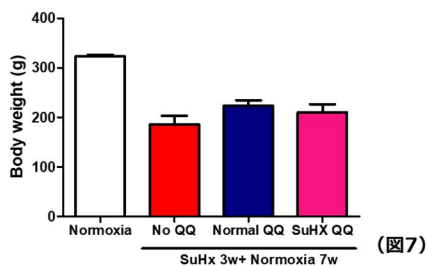
実験開始当初, PH ラットが重症 PH であることから, 処置で容易に死亡した。そのため, QQ 細胞投与方法を検討するまでに時間を有し, 十分な個体数の確保が困難であった。上記の理由により本研究期間において, 有意差を出す個体数の検討が困難であった。実験開始 70 日目の生存率と心臓カテーテル評価により比較検討した。生存率は, 正常コントロール群は 100% (n=3/3) PH コントロール群は 33% (n=1/3) 正常ラット QQ 細胞を PH ラットに投与した群は 60% (n=3/5) PH ラット QQ 細胞を PH に投与した群は 60% (n=3/5) であった (図 5)。心不全の指標となる体重減少は, QQ 細胞投与群と比較し, PH コントロール群 (PBS 投与) が低下していた (図 6, 7)。心臓カテーテルで測定した右室圧は, QQ 細胞投与群が PH コントロール群 (QQ 細胞投与なし) と比較して低い傾向を認めた (図 8)。



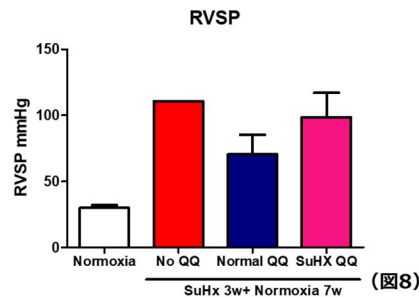
(図5)



(図6)



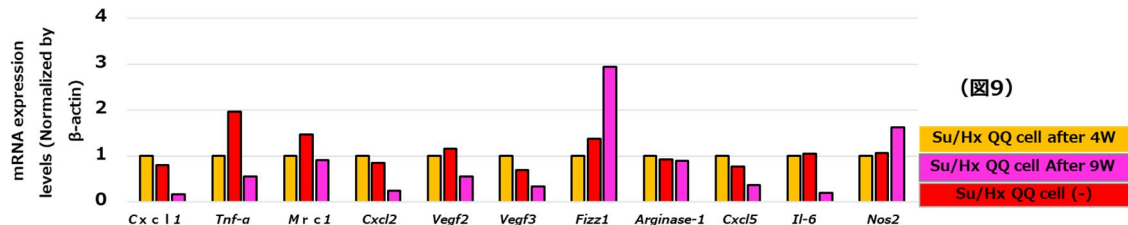
(図7)



(図8)

【実験 B 結果】

PH コントロール (QQ 細胞投与なし) の肺組織と PH モデルに QQ 細胞投与 4 週後と 9 週後の肺組織のリアルタイム PCR で解析を行った。PH コントロール (赤) と比較し、QQ 細胞投与 9 週後 (ピンク) では抗炎症作用を示す M2 マクロファージである Fizz1 が増加し、炎症作用を示す IL-6, TNF が減少していた。以上の結果から QQ 細胞を投与により炎症を低減している可能性が示唆された (図 9)。



特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) は持続的な血管収縮と炎症細胞の浸潤を伴う血管のリモデリングが病態の主要因と考えられている (Orriols, CMLS 2017)。低酸素モデルラットでは、IL-6 が Th17 細胞に作用し、IL-21 を分泌誘導することで M2 マクロファージの極性化を来し、マクロファージ由来の CXCL12 のより肺動脈の平滑筋細胞増殖をきたし、肺高血圧症を形成する。またナイーブ T 細胞から Th17 細胞への分化誘導には AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) の存在が重要である。AHR には Sugen5416, 青薫, TCDD (ダイオキシン), FICZ, ベンゾピレン (タバコ) などの報告がある。我々が本研究に用いた Sugen5416 と慢性低酸素暴露により肺動脈性肺高血圧症を示す Su/Hx ラットモデルは、経時的に病勢が進行し、叢状病変を形成するなどヒトの IPAH と病理学的に類似していると報告されている (Craig K, Molecular Therapy 2020)。炎症が病態として重要と推察される IPAH に対する QQ 細胞移植治療の利点として、(1) 短期間で準備可能、(2) 炎症部位へ遊走・集簇し効果を得ることが可能であること、(3) 静脈注射にて投与可能であることからアクセス困難部位 (脳, 肺, 間質, 全身) のびまん性病変にも適応できる。加えて、(4) 自己末梢血由来細胞で免疫抑制の必要がないなどの利点が多い。従って慢性炎症の制御と組織修復効果が発揮され、全身状態の悪化が著しい肺動脈性肺高血圧の病状緩和が期待され、また肺移植までの安全なブリッジ治療となり得ると考えた。

Su/Hx ラットモデルに対し QQ 細胞移植治療を検討した結果、QQ 細胞投与を投与したラットの生存期間が延長し、QQ 細胞を 1 回投与より 2 回投与したものはさらに生存期間が延長した。機序として肺組織 qPCR において、QQ 細胞非投与群に比して炎症性マーカーが低下しており、先行研究で示されている QQ 細胞による抗炎症効果が推測された。心筋組織でも同様の傾向が認められた。今後は検討数を増やし、サイトカイン測定、組織染色評価を用い、肺組織だけではなく、心臓において右室心筋のリモデリング抑制効果、心不全マーカー (ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド等) についても検討を行い、研究結果を発表予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawaguchi Akira, Salybekov Amankeldi, Yamano Mariko, Sumiyoshi Hideaki, Kawaguchi Gen, Matsuda Shinichi, Sekine Kaori, Shibata Mayuko, Yamada Yoshiyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 De novo Biological Coronary Artery Bypass in a Rat Model: Case Report and the Concept of Hybrid Cardiovascular Regeneration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18103/mra.v12i2.4992	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 該当する

1. 著者名 Kaori Sekine , Akira T Kawaguchi , Masaki Miyazawa , Haruo Hanawa , Shinichi Matsuda , Tetsuro Tamaki , Takayuki Asahara , Haruchika Masuda	4. 巻 11
2. 論文標題 Transplantation of Fibroblast Sheets with Blood Mononuclear Cell Culture Exerts Cardioprotective Effects by Enhancing Anti-Inflammation and Vasculogenic Potential in Rat Experimental Autoimmune Myocarditis Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11010106.	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
研究 分 担 者	松田 晋一 (Matsuda Shinichi) (00328147)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	

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