

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08907

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞による肺胞バリア機能強化とALI/ARDSへの新たな細胞治療の基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on improvement of alveolar barrier function using adipose stem cells and novel cell therapy for ALI/ARDS

研究代表者

石井 光寿 (Ishii, Mitsutoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：60783066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間において呼吸器基礎疾患の一つである慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対する間葉系幹細胞(MSC)投与による治療効果を検討した。MSCをCOPDモデルマウスで静脈内投与すると、通常の培養細胞よりも長い期間、肺に生着し、抗炎症、免疫抑制作用により組織障害を抑えるという知見が得られた。さらに生着した肺組織で肺毛細血管内皮細胞と筋線維芽細胞への高効率な分化誘導を示し、顕著な有効性が確認された。細胞投与後の肺組織のフローサイトメトリー解析からは細胞投与群のマクロファージにおいて、M2マクロファージへの極性変化が見られ、組織修復への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALI/ARDSへの細胞治療としてADSCによる細胞治療の有効性の基礎的データを得るための開始の研究として重要であり、特にADSCによる肺のバリア機能の強化を目的とした、未だ行われていない研究である。今後、ブタ肺虚血再灌流モデルでALI/ARDSを誘発し、ADSC静脈投与の有効性、安全性を証明することによって、ALI/ARDSの新たな治療選択肢としてADSCの細胞治療を確立できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the therapeutic effect of mesenchymal stem cell (MSC) administration on chronic obstructive pulmonary disease (COPD), one of the basic respiratory diseases, and found that MSCs administered intravenously in a COPD mouse model grew in the lungs for a longer period than normal cultured cells and suppressed tissue damage through anti-inflammatory and immunosuppressive actions. The results showed that intravenous administration of MSCs in COPD model mice suppressed tissue damage through anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Furthermore, MSCs showed highly efficient induction of differentiation into pulmonary capillary endothelial cells and myofibroblasts in the lung tissue, confirming their remarkable efficacy. Flow cytometric analysis of lung tissue after cell administration showed that macrophages in the cell administration group showed a change in polarity to M2 macrophages, suggesting their involvement in tissue repair.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：呼吸器再生 幹細胞治療 肺胞バリア機能 急性肺障害 慢性閉塞性肺疾患

## 1. 研究開始当初の背景

全世界で COVID-19 感染症が猛威をふるい、全世界での死亡数は 100 万人を超えた。多くのワクチンや治療薬が開発中であるが、終末期には急性肺損傷 (ALI) / 急性呼吸促進症候群 (ARDS) の状態となり、その治療が命運を握っている。ALI/ARDS の治療法は、抗炎症作用のある副腎ステロイドや抗菌剤で行われてきたが、近年、間葉系幹細胞投与が脚光を浴びている。

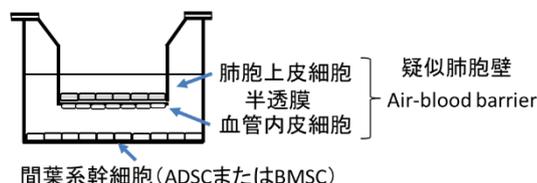
間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪、臍帯、羊膜、歯牙などから採取される多能性幹細胞で、多くのサイトカインを産生することで抗炎症作用や抗免疫作用を持つため、小児骨髄移植後 GVHD の治療薬(テムセル®)として市販が開始されている。この間葉系幹細胞による細胞治療は、細胞間のバリア機構を維持・回復することから、ALI/ARDS の収束や損傷肺の修復につながることを期待され、COVID-19 重症肺炎を含む末期肺障害への臨床試験が進んでいる。一方で、使用されているのは骨髄由来の間葉系幹細胞(BMSC)であり、脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)などの他の組織由来 MSC による有効性は未解明のままである。

## 2. 研究の目的

MSC の ALI/ARDS への治療効果を多方面から検証する。本研究では、肺障害への細胞治療として MSC の治療効果について *in vitro*、*ex vivo*、*in vivo* の多方面から証明することを最終的な目標として、臨床試験の基礎データを構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 経上皮電気抵抗 transepithelial electrical resistance; TEER) 値測定：肺細胞間のタイトジャンクションの強度を評価するため、以下の条件で TEER 測定を行った。



- ① ADMSC と骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow derived MSC; BM MSC) の非接触共培養による全肺細胞の TEER 値の比較
- ② 非接触 ADMSC の有無による全肺細胞および肺胞上皮細胞の TEER 値の比較
- ③ 接触 ADMSC の有無による全肺細胞および肺胞上皮細胞の TEER 値の比較
- ④ 血液空気関門モデルにおける非接触 ADMSC の有無による TEER 値の比較
- (2) 透過性試験非接触 AD MSC の有無による、全肺細胞および肺胞上皮細胞に対するフルオレセインナトリウムの透過係数の変化を評価した。
- (3) 蛍光免疫染色非接触 ADMSC の有無による、全肺細胞および肺胞上皮細胞のタイトジャンクション関連蛋白 ZO-1 の発現の変化を評価した。
- (4) 電子顕微鏡観察 非接触 ADMSC の有無による肺胞上皮細胞の細胞接合部の形態学的な変化を透過型電子顕微鏡で評価した。
- (5) 細胞接合部関連遺伝子発現の評価：肺胞上皮細胞より mRNA を抽出し、PCR array を用いて細胞接合部関連の遺伝子発現を解析し、非接触 ADMSC の共培養による肺胞上皮細胞の遺伝子発現を検討した。
- (6) 呼吸器基礎疾患の一つである慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に対する MSC 投与による治療効果を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) TEER 値測定

- ①ADMSC と BMMSC の非接触共培養では、ADMSC 共培養群の方が有意に全肺細胞の TEER 値の上昇を認めた。
- ②接触、非接触に関わらず、ADMSC 共培養群において、非共培養群と比較して全肺細胞および肺胞上皮細胞の TEER 値の有意な上昇を認めた。
- ③血液空気関門モデルにおいても、ADMSC 共培養群において有意な TEER 値の上昇を認めた。

(2) 透過性試験全肺細胞、肺胞上皮細胞いずれにおいても ADMSC 共培養群で非共培養群と比較して、透過係数の低下を認めた。

(3) 蛍光免疫染色全肺細胞、肺胞上皮細胞いずれにおいても、ADMSC 共培養群で非共培養群と比較して、細胞接合部において ZO1 の発現増加を認めた。

(4) 電子顕微鏡観察 ADMSC 非共培養群では、ADMSC 共培養群と比較して肺胞上皮細胞間の間隙が広く観察され、細胞接合部の形成不良が示唆された。

(5) 細胞接合部関連遺伝子発現の評価 ADMSC 共培養群において、非共培養群と比較して、タイトジャンクションの主要な蛋白である claudin family のうち、claudin4 を含む複数の claudin の遺伝子発現増加を認めた。

(6) MSC を COPD モデルマウスに投与すると生着した肺組織で肺毛細血管内皮細胞と筋線維芽細胞への高効率な分化誘導を示し、通常培養の臍帯 MSC を投与するよりも顕著な有効性が確認された。細胞投与後の肺組織のフローサイトメトリー解析からは細胞投与群のマクロファージにおいて、M2 マクロファージへの極性変化が見られ、組織修復への関与が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimoyama Koichiro, Tsuchiya Tomoshi, Watanabe Hironosuke, Ergalad Abdelmotagaly, Iwatake Mayumi, Miyazaki Takuro, Hashimoto Yasumasa, Hsu Yu-l., Hatachi Go, Matsumoto Keitaro, Ishii Mitsutoshi, Mizoguchi Satoshi, Doi Ryoichiro, Tomoshige Koichi, Yamaoka Tetsuji, Nagayasu Takeshi	4. 巻 54
2. 論文標題 Donor and Recipient Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy for Rat Lung Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 1998 ~ 2007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transproceed.2022.05.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Mitsutoshi, Tsuchiya Tomoshi, Doi Ryoichiro, Morofuji Yoichi, Fujimoto Takashi, Muto Hideki, Suematsu Takashi, Mori Ryoichi, Matsumoto Keitaro, Miyazaki Takuro, Tomoshige Koichi, Watanabe Hironosuke, Iwatake Mayumi, Nagayasu Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased In Vitro Intercellular Barrier Function of Lung Epithelial Cells Using Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081264	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	宮崎 拓郎 (Miyazaki Takuro) (00584749)	長崎大学・病院(医学系)・講師  (17301)	
研究分担者	土谷 智史 (Tsuchiya Tomoshi) (30437884)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員教授  (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永安 武  (Nagayasu Takeshi)  (80284686)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授   (17301)	
研究 分 担 者	佐原 寿史  (Sahara Hisashi)  (90452333)	鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授   (17701)	

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