

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 26 年 2 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22249060

研究課題名（和文） 侵襲時再生治療に関する研究：血管内細胞移植の確立

研究課題名（英文） Regenerative therapy following severe insults: Establishment of cell transplantation in the blood

研究代表者

小倉 裕司（OGURA HIROSHI）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70301265

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、各侵襲モデルに対する血管内細胞移植法の効果を明らかにすること、また血管内細胞移植の生体反応性を制御するメカニズムを検討すること、である。多臓器不全モデルに対して骨髄間質細胞を経静脈的に投与することにより、各臓器障害の軽減や生存率の有意な改善が認められた。また、骨髄間質細胞と血管内皮の共培養系を確立し、骨髄間質細胞の分泌性因子が血管内皮細胞傷害を直接的に抑制する経路があることを明らかにした。さらに、クラッシュ症候群モデルに対する骨髄由来単核球細胞移植が、抗炎症効果を発揮し、生存率を改善することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The objectives of this study were to evaluate the pathophysiology and regenerative response of endothelium after various severe insults and to examine the effects of intravascular transplantation of various stem cells in rats. Transplantation of mesenchymal stem cells protect against endothelial damage and improve survival in a rat model with multiple organ dysfunction syndrome. Our established co-culture system clarified that some regenerative factors produced by mesenchymal stem cells directly inhibit the endothelial damage. We also clarified that transplantation of bone marrow derived mononuclear cells exerted anti-inflammatory effects and improved the survival in a rat model of crush injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	14,000,000	4,200,000	18,200,000
2011 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2012 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
年度			
年度			
総計	35,000,000	10,500,000	45,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：侵襲、再生、血管内皮、骨髄間質細胞、移植、前駆細胞、治療、多臓器障害

1. 研究開始当初の背景

重症外傷、広範囲熱傷、敗血症、ショックなどの重度侵襲にともない、全身性炎症反応が引き起こされ、重症例では多臓器障害に進展する。

多臓器障害に陥ると治療に難渋するだけでなく救命が困難となり、また集中治療に莫大な治療費を要する。全身性炎症反応の主要な標的は血管内皮であり、多臓器障害で

は血管内皮傷害の進行が顕著となることから、我々は、血管内皮の再生を担う細胞の増殖、分化が、侵襲にともなう再生応答を主に制御すると考えている。近年、全身性炎症反応の治癒機転には多くの修復・再生過程が関与することが明らかとなり、侵襲にともなう再生応答を効果的に制御して多臓器障害の進行を防ぐことが急務と考えられる。我々は、多臓器障害に移行しやすい重度侵襲にともなう全身性炎症反応をいかに制御すべきかをテーマとして炎症反応、免疫応答に注目して臨床研究および動物実験を進めてきた (J Trauma 59:308-315,2005、J Trauma 61:616-623,2006)。しかしながら、侵襲後にみられる多臓器障害の進行は、炎症反応、免疫応答の制御だけでは十分にコントロールできず、臓器障害の修復過程で重要な鍵を握る再生応答の解明と制御が不可欠と考えるに至った。近年の研究において、全身性炎症反応の主要な標的は血管内皮であり、多臓器障害では血管内皮傷害の進行が顕著となることから、我々は、血管内皮の再生を担う細胞の増殖、分化が、侵襲にともなう再生応答を主に制御すると考えている。1997年、成人末梢血中に内皮細胞に分化しうる血管内皮前駆細胞が存在することが報告され、その後の研究により血管内皮前駆細胞は炎症や創傷の治癒過程で中心的役割を果たしていることが明らかとなった。血管内皮前駆細胞の組織への取り込みは血管新生を起こすことから、血中の血管内皮前駆細胞をとらえることにより再生能を評価できる可能性が出現した。血管内皮前駆細胞を利用して血管のみならず臓器の再生能を制御できる可能性もある。実際、重症虚血部位への血管再生を期待して慢性血管病に対する血管内皮前駆細胞の臨床応用が現在進められており、下肢虚血や虚血性心疾患において効果が期待されている (N Eng J Med 353:999-1007, 2005)。しかしながら、侵襲に伴う全身性炎症反応時の再生応答能を血中血管内皮前駆細胞としてとらえた報告はなく、血管内皮傷害—再生バランスを臨床例で評価する方法も確立されていない。また、重度侵襲時に多臓器で進行する血管内皮傷害に対する血管内皮前駆細胞の移植効果は現在まで全く検討されていない。そこで、我々は多臓器障害に移行しやすい重度侵襲にともなう全身性炎症反応をいかに制御すべきかをテーマとして、世界に先駆けて再生応答に注目した研究を進めてきた (基盤研究 (A) : 侵襲時再生応答に関する研究)。その結果、(1) 血管内皮の再生応答は、臓器障害の進行過程および修復過程で重要な役割を演じていること (Shock 誌 2007)、(2) 多臓器障害モデルにおいて、骨髄間質細胞の血管内細胞移植が著明な抗炎症作用を発揮し、臓器障害および生存率を有意に改善すること (論文投稿

中)、を明らかにした。本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、種類の異なる代表的な重度侵襲 (重症外傷、熱傷、敗血症、出血性ショック) モデルにおいて最も適切な血管内皮修復・再生治療を明らかにすることを目指し、血管内皮前駆細胞、骨髄間質細胞、骨髄由来単核球細胞の3種類の異なる血管内移植を行い、各細胞移植法の有効性を比較検討した。

2. 研究の目的

(1) 侵襲の種類によって、移植細胞の種類によって、血管内細胞移植の効果にどのような差が見られるか、(2) 血管内細胞移植の生体反応性を制御するメカニズムは何か、に関して、血管内皮における再生応答遺伝子の発現解析などから詳細に検討した。本研究から、侵襲の種類に応じた適切な血管内細胞移植が提案できれば、血管内皮修復・再生療法として臨床応用への道が開ける。

3. 研究の方法

(1) 重症外傷、熱傷、敗血症、出血性ショックの各侵襲モデルにおける再生応答に関する研究

すでに確立した重症外傷 (クラッシュ症候群、両下肢) モデル、熱傷 (Ⅲ度熱傷、体表面積40%) モデル、敗血症 (盲腸結索穿刺による腹膜炎) モデル、出血性ショック (脱血) による多臓器障害モデルにおいて、再生応答の指標として血中に存在する血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、および血管内皮マイクロパーティクルをフローサイトメトリー法で定量評価する。同時に、炎症反応指標の変動と病理組織診断による各臓器障害を経時的に評価する。病理組織診断では、各臓器障害の形態、白血球浸潤など炎症所見の程度を捉えると共に、各臓器における血管内皮細胞を von Willebrand factor 染色で定量評価する。また、各臓器における細胞死 (アポトーシス) を TUNEL 染色で定量評価する。血管内皮の再生因子として、アポトーシスを抑制する angiopoietin-1、survivin の発現、およびアポトーシス関連因子である Fas 抗原の発現を同時に染色法で定量評価する。骨髄機能として、血中に存在する造血系前駆細胞 (CD34陽性) をフローサイトメトリー法で定量評価し、骨髄間質幹細胞の成長促進因子である stromal-derived factor-1 (SDF-1) の血中濃度を測定する。また、骨髄において SDF-1 のレセプターである CXCR4 発現を染色法で定量評価する。各臓器において定量評価した血管内皮細胞量および細胞死量が、血管内皮傷害—再生バランスや骨髄機能、多臓器障害の進行過程と相関するか否か経時的に評価する。また、血管内皮再生因子の発現バランスと多臓器障害の進行過程との関連を評価した。

(2) 各侵襲モデルに対する再生治療に関する研究—血管内皮再生療法確立

上記各侵襲モデルにおいて、有効性が期待できる経血管内細胞移植による各種再生治療が血管内皮の修復・再生を促進して臓器障害を軽減するか、生存率を改善するか、比較検討する。経血管内細胞移植には、健常ラットの脛骨、腓骨から採取する 1. 血管内皮前駆細胞、2. 骨髄間質細胞、3. 骨髄由来単核球細胞の 3 種類を使用する。この際、血管内皮前駆細胞は、採取した骨髄細胞を膜抗原 CD34 でマーキングし、フローサイトメトリーでソーティングをかけて回収する。骨髄間質細胞は、採取した骨髄細胞を特殊培地に接触させ、培養増殖させて回収する。骨髄由来単核球細胞は、採取した骨髄細胞をフィコール法で遠心分離し、単核球成分を分離して回収する。血管内皮前駆細胞、骨髄間質細胞、および骨髄由来単核球細胞はそれぞれ 5×10^6 個を 1 単位とし、それぞれの細胞 1 単位を各侵襲モデルの侵襲前、侵襲直後、侵襲 3 時間後のタイミングで血管内移植する 3 つの群に分けて各群の経過を比較検討する。(1) で得られた結果をコントロールとし、それぞれの血管内移植にともなう血中血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、および血管内皮マイクロパーティクルの推移、炎症反応指標の変動、ケミカルメジエーターの動き、病理組織診断による各臓器障害、および生存曲線が改善するか否かを評価した。

特に、各侵襲モデルにおいて、血管内皮前駆細胞、骨髄間質細胞、および骨髄由来単核球細胞の各血管内細胞移植により腸管上皮の修復、再生効果が得られるか、腸管免疫能の改善が見られるか、を病理組織診断および腸管組織の各種免疫染色などで詳細に検討した。

さらに、各侵襲モデルにおいて最も有効な血管内細胞移植を評価し、侵襲の種類による血管内細胞移植の反応性の違いを明らかにする。特に、骨髄間質細胞移植による抗炎症効果、血管内皮細胞保護作用を発揮するメカニズムを明らかにするために、骨髄間質細胞と血管内皮の共培養系を確立し、以下の検討を加えた。Wistar ラット (雄) 8 週齢の脛骨、腓骨から骨髄を回収し、単細胞に分離した後に、 α -MEM 下で dish 上に接着性に培養して増殖させた。第 3 世代の BMSC を共培養実験開始時まで凍結保存した。

共培養実験は transwell システムを用いて行った。あらかじめ、well の bottom に HMVEC (肺微小血管内皮細胞) を EGF, VEGF, FGF, IGF-1 添加 EBM2 (5%FBS) 下で confluent に増殖させた。共培養時直前には、HMVEC に対して、成長因子を添加せずに FBS の濃度を 0.5% に落とした EBM2 下で 6 時間の pre-conditioning を行った。基礎となる培養液はこのままとし、共培養時に単細胞に分離

してある BMSC を transwell 上に静置した。共培養開始時には、 $10 \mu\text{g/mL}$ の lipopolysaccharide (LPS) の投与、ないし更に 1% の低酸素侵襲を加えた。コントロール群は、transwell 上に BMSC を投与しないもの (非共培養) とした。即ち、①LPS (-), hypoxia (-), BMSC (-), ②LPS (+), hypoxia (-), BMSC (-), ③LPS (+), hypoxia (-), BMSC (+), ④LPS (-), hypoxia (+), BMSC (-), ⑤LPS (+), hypoxia (+), BMSC (-), ⑥LPS (+), hypoxia (+), BMSC (+) の計 6 群を用意した。

pre-conditioning 開始から 24 時間後 (共培養開始から 18 時間後) に HMVEC を回収し total RNA の抽出・精製を行った。cDNA 作成後、real-time PCR にて、各群における E-selectin, IL-6, VEGF, thrombomodulin の遺伝子発現量を、 β -actin を内在性コントロールとして半定量化した。

4. 研究成果

多臓器障害モデルにおける再生治療に関する研究として、骨髄間質細胞移植の効果を検討した結果、非移植群では腹膜炎作成後 24 時間以内に半数以上が死亡し、7 日目の生存率が 17% であったのに対し、骨髄間質細胞移植群では生存率 50% と有意な生存率の改善を認めた。

また、炎症性サイトカインである血中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 値は、いずれも非移植群では腹膜炎作成後経時的に上昇したが、骨髄間質細胞移植群では有意に抑制された。同様に、好中球、単球それぞれのケモカインである CXCL-1 及び CCL4 値も、非移植群では腹膜炎作成後経時的に上昇したが、骨髄間質細胞移植群では有意に抑制された。一方、興味深いことに、抗炎症効果を有するサイトカインである血中 IL-10 値は、非移植群に比べ骨髄間質細胞移植群において腹膜炎作成 6 時間後に一過性に有意な上昇を認めた。

さらに、各臓器における病理組織変化として、非移植群では腹膜炎作成 24 時間後には、肺において肺泡隔壁の肥厚、細胞浸潤を伴う肺泡構造の破壊、肝臓では肝細胞の空砲化変性、腎臓では尿細管周囲の間質の浮腫と出血が引き起こされた。一方、骨髄間質細胞移植群ではこれら各臓器の組織障害がいずれも軽減されていた。

敗血症に伴う多臓器不全の進行過程において、血管内皮細胞機能の障害がみられることに注目し、血管内皮細胞障害時に増強する von Willebrand factor の発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、非移植群では腹膜炎作成後、肺泡、類洞、尿細管周囲の血管内皮に von Willebrand factor の発現が著明

に増強したが、骨髄間質細胞移植群ではこれらの発現がいずれも抑制された。

また、移植細胞の生体内における定着を追跡するため、静注前に骨髄間質細胞を緑色蛍光を発する PKH67 で標識して移植した結果、腹膜炎作成 24 時間後には、移植細胞の多くは肺に認められ、数は減るものの肝臓、腎臓にも移植細胞が認められた。

以上より、ラット多臓器不全モデルに対して、骨髄間質細胞を経静脈的に投与することにより、移植細胞は主に肺に集積し、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CXCL1、CCL4 の発現抑制、IL-10 の一過性発現増強、血管内皮細胞における von Willebrand factor の発現抑制とともに、各臓器障害の軽減や生存率の有意な改善が認められた。

多臓器不全の進行過程において、骨髄間質細胞移植は抗炎症効果、血管内皮細胞保護作用を発揮すると考えられ、新たな治療戦略として有望であると考えられた。

骨髄間質細胞移植による抗炎症効果、血管内皮細胞保護作用を発揮するメカニズムを明らかにするために、骨髄間質細胞と血管内皮の共培養系を確立し、以下の結果を得た。E-selectin、IL-6 に関しては、酸素正常状態、低酸素状態いずれにおいても、LPS 非投与群に比して LPS 投与群において遺伝子の発現が有意に増加し、BMSC との共培養によってこれらの発現増強が有意に抑制された。

VEGF に関しては、酸素正常状態、低酸素状態いずれにおいても、LPS 非投与群に比して LPS 投与群において遺伝子の発現が有意に増加したものの、酸素正常状態では BMSC 共培養による VEGF 遺伝子発現への影響は認められなかった。一方、低酸素状態では、共培養をすることで、LPS で誘導される VEGF 発現がさらに有意に増加することが明らかになった。

Thrombomodulin に関しては、酸素正常状態、低酸素状態いずれにおいても、LPS 非投与群に比して LPS 投与群において遺伝子の発現が有意に減少し、BMSC との共培養によってこれらの発現減弱が有意に抑制されることが分かった。本研究では、敗血症環境を疑似化して、LPS 投与や低酸素侵襲を負荷することで血管内皮細胞傷害を *in vitro* 実験にて誘導したが、BMSC の存在により血管内皮細胞における様々な遺伝子発現が変動することが明らかになった。BMSC 共培養によって、血管内皮細胞の E-selectin 発現は軽減した。このことは、敗血症に対する BMSC 移植時に、血管内皮細胞における E-selectin の発現を抑制して、白血球の接着を阻止しながら、その後生じる白血球の各組織への浸潤による臓器傷害を改善する効果が発揮されることを示唆している。また、共培養によって

血管内皮細胞における IL-6 産生が抑えられることより、PAMPs が血管内皮細胞の PRRs に結合することで誘導される炎症反応経路が、BMSC 由来の何らかしらの因子により阻害されるものと考えられる。低酸素環境下では、LPS 投与による血管内皮細胞の VEGF 発現上昇が BMSC の存在下で増強した。興味深いことに、この現象は正常酸素状態では認められない。BMSC は、VEGF の発現を増強することによって低酸素侵襲による血管内皮を保護するとともに組織再生に必須な血管新生を促す作用があるのではないかと推測される。一方で VEGF は血管透過性亢進を増強する作用がある。敗血症に対する BMSC 移植により誘導される血管内皮細胞由来の VEGF が、実際に生体内における微小循環に対してどのように作用しているのかを見極めることは今後の課題である。また、BMSC の存在下で血管内皮細胞の Thrombomodulin 発現が増強することが明らかになったが、BMSC が積極的に血管内皮を保護する作用を有しているものと考えられる。これらの血管内皮細胞に対する BMSC の保護作用は、この実験系が非接触性の共培養により行われていることから、BMSC 由来の分泌性因子が関与しているものと推定される。さらに今後、BMSC 由来のどんな機能分子が血管内皮細胞保護に寄与しているのかを同定していかなければならない。

また、LPS 投与+低酸素侵襲群で血管内皮細胞における Angiopoietin-1 (Ang1) 発現が低下し、Angiopoietin-2 (Ang2) 発現が上昇するが、BMSC を加えることでこれらの反応は有意に抑制された。血管内皮細胞が分泌する Ang1 は、血管内皮細胞上に発現するチロシンキナーゼ型受容体である Tie2 に結合して血管内皮細胞の安定性を維持している。一方、Ang2 は Ang1 に拮抗して Tie2 へのシグナルを減弱させる。David らは、感染患者の血中 Ang2 の上昇が重症度、ショック併発や死の転帰等の予後に影響することを示すと共に、敗血症動物モデル、*in vitro* 実験において Ang2 の機能を阻害すると、微小血管内皮細胞のバリア機能を保護しながら炎症、組織損傷を抑制することを明らかにしている

(Crit Care Med 40: 3034-3041, 2012)。
以上のことから、BMSC 由来分泌性因子は血管内皮細胞に直接働きかけて、敗血症で誘導される Ang1、Ang2 インバランスから生じる血管内皮細胞の不安定性を改善し、血管バリア機能を維持している可能性が示された。

本研究により、敗血症に対する BMSC 細胞移植治療の効果として、BMSC の分泌性因子が血管内皮細胞傷害を直接的に抑制する経路があることが明らかとなった。

さらに、クラッシュ症候群モデルに対し、骨髄由来単核球細胞を静脈内投与すると、

クラッシュで誘導される全身性炎症（血中 IL-6 上昇等）、肺傷害を改善し、死亡率を有意に改善することを明らかにした。興味深いことに、骨髄由来単核球細胞を投与すると、3 時間後に血中 TGF-beta が一過性に上昇を示した。骨髄由来単核球細胞から分泌される TGF-beta が炎症誘導シグナルを早期に抑制することで、その後の予後に影響を与える可能性が考えられた。

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 3 件）

- ① Shimazaki J, Matsumoto N, Ogura H, Muroya T, Kuwagata Y, Nakagawa J, Yamakawa K, Hosotsubo H, Imamura Y, Shimazu T. Systemic involvement of high-mobility group box 1 protein and therapeutic effect of anti-high-mobility group box 1 protein antibody in a rat model of crush injury. Shock, Vol37, 634-8, 2012、査読有

〔学会発表〕（計 29 件）

- ① 松本直也、小倉裕司ら、ラット敗血症モデルに対する経静脈的骨髄間質細胞移植とその血管内皮保護効果、第 40 回日本救急医学会、2012 年 11 月 15 日、東京
- ② 島崎淳也、松本直也、小倉裕司ら、クラッシュ症候群ラットモデルに対する抗 HMGB-1 抗体治療の有効性、第 39 回日本救急医学会、2011 年 10 月 19 日、東京
- ③ 松本直也、小倉裕司ら、重症敗血症に対する新たな抗炎症治療の開発（骨髄間質細胞移植、脳症への IL-1ra 治療）、第 39 回日本救急医学会、2011 年 10 月 18 日、東京
- ④ 松本直也、小倉裕司ら、ラット敗血症・多臓器不全モデルにおける骨髄間質細胞移植による抗炎症効果の評価、第 38 回日本救急医学会、2010 年 10 月 9 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 裕司 (OGURA HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70311265

(2) 研究分担者

鉾方 安行 (KUWAGATA YASUYUKI)
大阪大学・医学系研究科・招へい教授
研究者番号：50273678

松本 直也 (MATSUMOTO NAOYA)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50359808

田崎 修 (TASAKI OSAMU)
長崎大学・長崎大学病院・教授
研究者番号：90346221

入澤 太郎 (IRISAWA TAROU)
大阪大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：50379202

田原 憲一 (TAHARA KENICHI)
大阪大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30570361