

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390411

研究課題名(和文)急性肺傷害における肺組織幹細胞系細胞を用いた細胞治療開発への基礎研究

研究課題名(英文)Cell therapy for acute lung injury: possibility of lung derived mesenchymal stem cells

研究代表者

内田 篤治郎(Uchida, Tokujiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40262183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの肺に対してトリプシン処理を長時間行い、生存した細胞を増殖させることで得られる培養細胞について、CD29+CD90+の形質が維持され、骨分化能を有する、タンパク分解酵素の阻害因子を発現している、Keratinocyte Growth Factorの発現量が多い、サーファクタントプロテインの発現は極めて低い、in vitroの実験において、肺胞様構造の形成を誘導する働きがあるなどの特徴があり、in vivoの実験において、マウスの急性肺傷害を軽減する作用があることを明らかにした。今後、急性肺傷害における組織の再生を促す治療手段としての可能性を引き続き検討していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We recently established a cell culture prepared from lung tissue, which is resistant to trypsin treatment for 16 h. This cell maintained positivity for CD29 and CD 90, and osteogenesis could be induced by osteogenesis inducing media. Also, it abundantly expressed keratinocyte growth factor and released paracrine factors which induced surfactant protein expression in alveolar epithelial cells when it was co-cultured with alveolar epithelial cells. We demonstrated therapeutic potential of this cell for the mouse lipopolysaccharide induced lung injury model, but further study is needed to establish efficacy of this cell as a clinical therapy option to ARDS.

研究分野：麻酔蘇生学

キーワード：間葉系幹細胞 急性肺傷害 ARDS 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

2001年に、Kottonらが、骨髄由来の間葉系幹細胞を投与したマウスにおいて、間葉系幹細胞から肺胞上皮への分化が認められたとの報告をして以来、国内外において、急性肺傷害に対する細胞治療の開発に対する期待が高まった。Guptaらによって、骨髄由来の間葉系幹細胞をエンドトキシン経気管投与により傷害を受けた肺に気道から投与した場合に、生着率は低いものの傷害肺における炎症が抑制されるという結果が報告されている。この報告は、細胞治療によって、生着した細胞が、単に構造的に、組織保護作用を発揮するだけではなく、局所的な液性因子の放出によって、炎症を抑える作用を有していることを示唆している。したがって、今後の方向性としては、投与した細胞の生着率をあげることや、投与する細胞にどのような機能が備わっているかを分析することが、重要になると考えられる。

一方、最近、間葉系幹細胞は、骨髄以外の臓器からも分離されており、肺もその例外ではない。また、これらの幹細胞については、由来する組織によって、間葉系幹細胞の分化の性質や速さが異なることが示されている。たとえば、軟骨組織の産生を誘導した場合に、もっとも、産生量が多いのは、関節包由来の間葉系幹細胞であるとする報告がある。仮に、全身の各臓器でも、臓器組織中に、より成熟型細胞に近い状態で存在する前駆細胞が存在するとすれば、それらを採取して増殖させ、傷害を受けた組織に生着させることによって、細胞治療の効率を上げることができると考えられる。

このような観点から、われわれは、最近、ラットの肺より得られた間葉系の培養細胞系を確立し、その性質の検討を開始した。本研究は、この培養系の性質を明らかにし、急性肺傷害の治療に役立てることができないかという観点から研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、我々がすでにラット肺組織より確立した間葉系幹細胞の性質を部分的に持つ培養細胞株について、この細胞の投与を受けたレシピエント肺で投与細胞がどのような作用を発揮するのか、あるいは急性肺傷害モデルで高い治療効果をあげることができるかを検討し、研究の最終段階においては、ヒトにおいても同様な性質を持つ培養細胞株を確立し、ヒトにおける急性肺傷害に対する治療法確立の基礎を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット肺組織からの Lung derived trypsin resistant (LTR)細胞の分離

我々が用いる培養細胞系は肺組織に対して長時間トリプシン処理を行い、生存した細胞を増殖させることで得られる培養細胞で

あり、継代による維持が可能である。この細胞を、以下、Lung derived trypsin resistant (LTR)細胞と表記するものとする。SDラットに対して、ペントバルビタールを投与し、気管切開を行った後、ペントバルビタール追加投与を行い、腹部大動脈切断後瀉血処置を行い、続いて、開胸後に肺動脈をHBSS液で灌流し、血液を洗い流す。この状態で、肺を摘出した。気道にエラストーゼ含有HBSS液を注入した状態で、同じ液に浸漬し、40分後に肺組織を細断したのち、30 μ m ナイロンメッシュでフィルター処理を行った。ここで得られた細胞 1.5×10^6 個をトリプシン 10ml で懸濁し、10 cm培養皿で37 $^{\circ}$ Cで16時間培養。トリプシン培養後 15ml チューブに移し、740g で15分間遠心し上清を吸引破棄した後、生細胞の割合を計測し、細胞をMEM α +10%FBS 培地で懸濁し、培養プレートに播種して培養を開始した。

(2) 骨髄由来間葉系幹細胞の分離・培養

SDラットに対して、ペントバルビタールを投与し、気管切開を行った後、ペントバルビタール追加投与を行い、深麻酔下に腹部大動脈切断後瀉血処置を行い、続いて、四肢の長管骨を採取して、骨端より18G針を用いて、HBSS液でフラッシュして、骨髄細胞を得た。これを、10 cm径の培養ディッシュに10%FBS 添加DMEM下に培養し、接着した細胞を増殖させた。これをトリプシン処理して、フローサイトメーターにかけ、CD90陽性CD29陽性の細胞をソーティングして回収し、DMEM下に培養を継続し、骨髄由来間葉系幹細胞として取り扱った。

(3) フローサイトメトリーを用いた LTR 細胞の表面抗原の評価

MEM α +10%FBS 培地を用いて増殖させたLTR細胞について、トリプシン処理を行い、フローサイトメーターにかけ、CD90およびCD29の発現について検討した。さらに、CD90陽性CD29陽性の細胞をソーティングして回収し、培養を行い、継代の後、再びフローサイトメトリーを行って、これらの表面抗原の発現が維持されているかどうかを検討した。

(4) LTR 細胞の中胚葉系由来組織への分化誘導実験

LTR細胞をStemPRO[®] Osteogenesis Differentiation Kit、StemPRO[®] Adipogenesis Differentiation Kit、StemPRO[®] Adipogenesis Differentiation Kit (いずれもInvitrogen製)を用いて培養し、骨分化、脂肪組織への分化、軟骨組織への分化が誘導されるかどうかを検討した。

(5) LTR 細胞と肺胞上皮細胞の形質の比較

MEM α +10%FBS 培地を用いて増殖させたLTR細胞について、肺胞上皮細胞との形質を

比較するため、リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量の定量を行った。タカラ社製 CellAmp® Direct RNA Prep Kit を用いて細胞を処理し、One Step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit により、surfactant protein (SP)-A, -B, -C, -D, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) 1, TIMP4, serpin peptidase inhibitor, clade A, member 9 (SEPIA9), keratinocyte growth factor (KGF) の mRNA の発現量を定量し、GAPDH または β アクチンの発現量との比較により、標準化を行った。

(6) LTR 細胞および骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) とラット肺胞上皮初代培養細胞 (AEC) の共培養

LTR 細胞および BMSC が肺胞上皮細胞に対してどのような影響を及ぼすかを調べるために、下記の 2 種類の共培養実験を行った。

① 分離型共培養

LTR 細胞または BMSC をトランズウェルの下層に播種し、その翌日にトランズウェルの上層に AEC を播種した。ラットの AEC はラットをペントバルビタールの深麻酔下に安楽死処理を行い、摘出した肺をエラスターゼ処理することにより得たものを初代培養細胞として使用した。21 日間培養の後、SP-D・RAGE・ZO-1 の免疫染色または(5)に示した mRNA の抽出により、surfactant protein の発現などを検討した。

② 混合型共培養

コラーゲンコーティングを行ったトランズウェルに LTR 細胞または BMSC を播種しその翌日に AEC を追加する形で播種した。21 日間培養を維持し、SP-D・RAGE・ZO-1 の免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

(7) 免疫細胞染色と共焦点顕微鏡による観察

LTR 細胞または BMSC を定められた期間培養した後、4%ホルマリン PBS で固定処理し、0.2% Triton X で 15 分処理した後、1% BSA でブロッキング処理を 30 分間行う。1 次抗体・蛍光標識 2 次抗体で順次処理し、共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss MicroImaging 社製 LSM510) で観察した。撮影した画像ファイルは、Zeiss LSM Image Browser 4.2 および Zeiss Zen 2011 version 7.0 により、断層観察や 3 次元処理を行った。

(8) エンドトキシン肺傷害モデルにおける LTR 細胞の経気道投与とその治療的効果の検討

7-8 週齢の CD-1 マウスを麻酔下に 5mg/kg のリポポリサッカライド (LPS: Escherichia coli 0111:B4, Sigma Aldrich Japan) を経鼻投与し、麻酔から回復させた。LPS 投与 6 時間後に LTR 細胞 (10^6 cells in 40 μ L PBS) または 40 μ L PBS を全身麻酔下に追加投与する。さらに 18 時間後、200 nM の fMLP を 40 μ L PBS に溶解したものと、4 nM の

NE680 (Neutrophil Elastase 680 FAST, PerkinElmer 社製) を混合したものを経鼻投与し、さらに 6 時間後にイソフルラン吸入麻酔下に、好中球エラスターゼ活性を IVIS 撮影装置で測定した。

4. 研究成果

(1) LTR 細胞の分離とフローサイトメトリーを用いた LTR 細胞の表面抗原の評価

ラットから肺を摘出、エラスターゼ処理を行い、トリプシン処理を 16 時間行った際の細胞の生存率は 20-30% であり、これを MEM α + 10% FBS 培地を用いて増殖させた場合、CD29 および CD90 の発現を調べると、約 17% の細胞において、両方の抗原が陽性となった (Fig 1)。

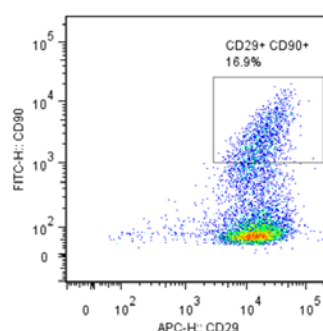


Fig 1 : LTR 細胞表面の CD29 と CD90 に関するフローサイトメトリーの一例

この性質を持つ細胞をソーティングして培養を行い、増殖した細胞を継代し、細胞表面の表面抗原を再評価すると、ほとんどの細胞で CD29 および CD90 がともに陽性のままであった (Fig 2)。そこで、このようにして得られた CD29+CD90+ の細胞を以下の実験で LTR 細胞として取り扱うこととした。

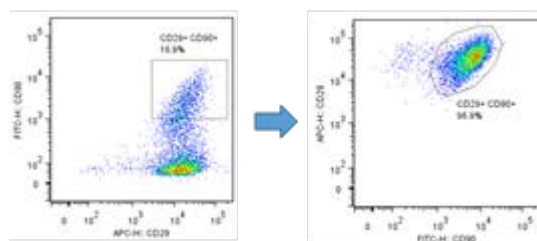


Fig 2 : LTR 細胞を培養維持・継代を繰り返した後の表面の CD29 と CD90 の発現に関するフローサイトメトリーの一例

(2) LTR 細胞の中胚葉系由来組織への分化誘導実験

LTR 細胞を StemPRO Osteogenesis Differentiation Kit、StemPRO Adipogenesis Differentiation Kit、StemPRO® Adipogenesis Differentiation Kit を用いて培養し、それぞれ、Alizarin red, Oil red O, Alcian Blue 染色を行ったところ、

骨分化誘導は陽性であったが、軟骨分化誘導は弱陽性であり、脂肪分化誘導は陰性という結果となり、これらがすべて陽性となる間葉系幹細胞とは異なる性質を有していることが明らかとなった (Fig 3)。

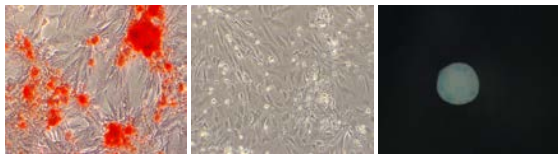
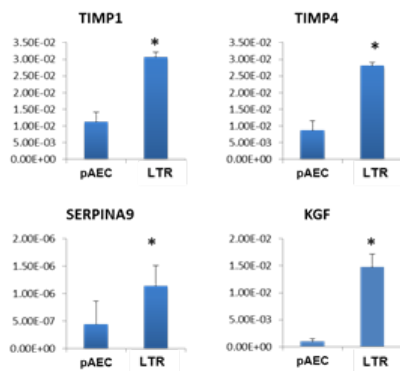


Fig 3 : LTR 細胞の中胚葉系由来組織への分化誘導
左) 骨分化誘導(陽性) 中) 脂肪分化誘導(陰性) 右) 軟骨分化誘導(弱陽性)

(3) LTR 細胞と肺胞上皮細胞 (AEC) の形質の比較

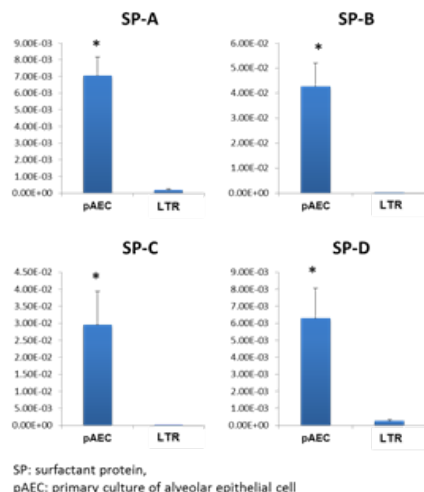
LTR 細胞は AEC と比較して、TIMP-1, TIMP-4, Alpha-1 antiproteinase inhibitor などの単分解酵素阻害因子や Keratinocyte growth factor の発現が有意に高いという性質を有していた (Fig 4)



TIMP1: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1
SERPINA9: Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A (Alpha-1 Antiproteinase, Antitrypsin), Member 9
KGF: keratinocyte growth factor

Fig 4 : LTR 細胞におけるタンパク分解酵素阻害因子および KGF の発現の評価

一方、サーファクタントプロテイン A-D の発現については有意に低かった (Fig 5)。



SP: surfactant protein,
pAEC: primary culture of alveolar epithelial cell

Fig 5 : LTR 細胞におけるサーファクタントプロテイン

A-D の mRNA 発現に関する評価

(4) LTR 細胞および骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) とラット肺胞上皮初代培養細胞 (AEC) の共培養

1) BMSC と AEC の共培養

BMSC と AEC の分離型共培養においては、21 日間の維持培養の後でも、SP-D 陽性の II 型上皮の形質を持つ細胞が、集塊を形成しているのが観察された (Fig 6)。

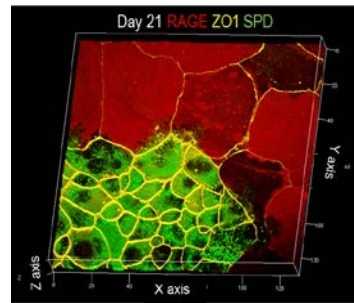


Fig 6: BMSC と AEC の分離型共培養を行った際の AEC の免疫細胞法による評価。赤く染まっているのが RAGE (I型肺胞上皮マーカー)、黄色く染まっているのが ZO-1 (上皮間結合タンパク)、緑に染まっているのが、SP-D

これらの細胞において、SP-A, B, C, D の mRNA の発現量は、AEC の単培養と比較して有意に上昇しており、BMSC が何らかの液性因子を培地中に放出することにより、AEC において、II 型の形質が維持されていたと考えられた (Fig 7)。

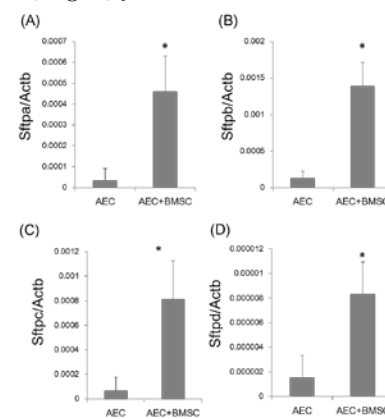


Fig 7 : LTR 細胞におけるサーファクタントプロテイン A-D の mRNA 発現に関する評価

また、混合型共培養では、21 日間の培養後に、SP-D 陽性の細胞がところどころに認められるのに加えて、胞状の構造を形成している様子が観察された (Fig 8)。

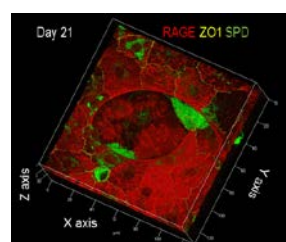


Fig 8: BMSC と AEC の混合型共培養を行った際の免疫細胞法による評価。赤く染まっているのが RAGE (I 型肺胞上皮マーカー)、黄色く染まっているのが ZO-1 (上皮結合タンパク)、緑に染まっているのが、SP-D

また、透過型電子顕微鏡を用いた観察でも同様の構造が観察され、胞状構造のポケットに相当するような箇所ではラメラ体を持つ II 型上皮細胞が観察された (Fig 9)。

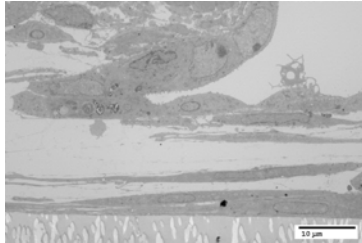


Fig 9: BMSC と AEC の混合型共培養を行った際の免疫細胞法による評価。

2) LTR 細胞と AEC の共培養

LTR 細胞と AEC の分離型共培養においては、BMSC の場合と同様、21 日間の維持培養の後でも SP-D 陽性の II 型上皮の形質を持つ細胞が、集塊を形成しているのが観察された (Fig 10)。

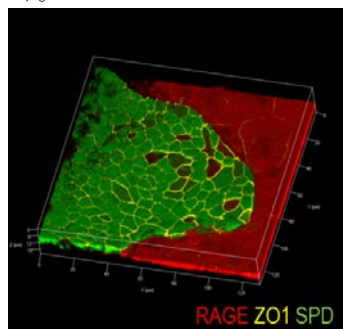


Fig 10: LTR 細胞と AEC の混合型共培養を行った際の免疫細胞法による評価。赤く染まっているのが RAGE (I 型肺胞上皮マーカー)、黄色く染まっているのが ZO-1 (上皮間結合タンパク)、緑に染まっているのが、SP-D

また、SP-A, B, D について、有意な発現増加が認められ、LTR 細胞も何らかの液性因子を培地中に放出し、AEC における II 型の形質維持を助けているのではないかと考えられた (Fig 11)。

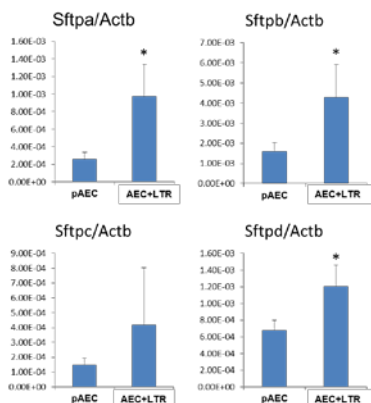


Fig 11: LTR 細胞と AEC の分離型共培養における AEC 内のサーファクタントプロテイン A-D の mRNA 発現に関する評価

LTR 細胞と AEC の混合型共培養では、やはり、肺胞 2 型上皮様細胞の集塊形成とともに、胞状構造の形成が観察された (Fig 12)。

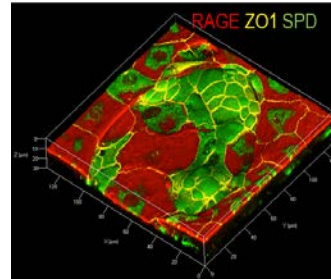


Fig12: LTR 細胞と AEC の混合型共培養を行った際の免疫細胞法による評価。赤く染まっているのが RAGE (I 型肺胞上皮マーカー)、黄色く染まっているのが ZO-1 (上皮間結合タンパク)、緑に染まっているのが、SP-D

(5) エンドトキシン肺傷害モデルにおける LTR 細胞の経気道投与とその治療的効果の検討

マウスに対してリポポリサッカライド (LPS, 5mg/kg) を経鼻投与し、その 6 時間後、LTR 細胞 (1×10^6) を経鼻投与し、その 18 時間後、fMLP (200nM) と NE680 (好中球エラスターゼ特異的近赤外蛍光色素, 4nM) を経鼻投与した。対照群 (n=3)、LPS+PBS 群 (n=7)、LPS+LTR 群 (n=4) で IVIS® imaging system を使用し好中球エラスターゼ活性を蛍光強度として比較したところ、LPS 投与で有意に上昇したが、LTR を投与した群では、好中球エラスターゼ活性が有意に低くなっていることが示された。(Fig 13)

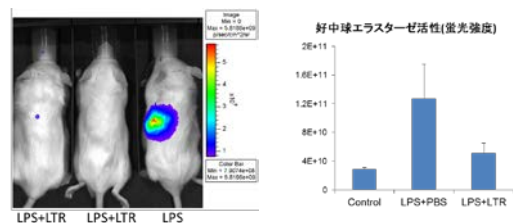


Fig 13: (左) LTR 細胞をエンドトキシン肺傷害モデルマウスに投与した際の好中球エラスターゼ活性を IVIS にて定量的に計測した際の典型画像。右側の動物では、LPS 投与により、有意に好中球エラスターゼ活性が上昇したが、LTR 投与群ではそれが起こらなかったことが示されている。(右) LTR 細胞をエンドトキシン肺傷害モデルマウスに投与した際に好中球エラスターゼ活性を IVIS にて定量的に計測したもの

以上の結果をまとめると、LTR 細胞には、① CD29 陽性 CD90 陽性の形質が維持され、骨分化能を有するが、軟骨組織や脂肪組織への分化を誘導してもこれらの組織への分化は弱いと全く見られない、②TIMP1, 4 (プロテアーゼインヒビター) および $\alpha 1$ アンチトリプシンの mRNA の発現量は多く、タンパク分解

酵素への耐性との関係が考えられる、③KGFの発現量が多く、肺胞 II 型上皮の形質維持または誘導に関与している可能性がある、④細胞自身の SP-A, B, C, D の発現は極めて低い、⑤in vitro の実験において、BMSC と同様に、肺胞様構造の形成を誘導するはたらきがある、などの特徴があり、in vivo の実験において LTR 細胞は、マウスの急性肺傷害を軽減する作用があることが示された。今回ヒトの組織において、同等な細胞が存在するか、実証を行うことができなかつたが、今後検討を進めることで、急性肺傷害における組織の再生を促す治療手段としての可能性を引き続き検討していきたいと考えている。

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 9 件)

1. Ito H, Uchida T, Makita K. Interactions between rat alveolar epithelial cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells: an in vitro co-culture model. *Intensive Care Med Experimental*. 3:15, 2015 doi: 10.1186/s40635-015-0053-2 (査読あり)
2. Mitaka C, Hnin Si MK, Tulafu M, Yu Q, Uchida T, Abe S, Kitagawa M, Ikeda S, Eishi Y, Tomita M. Effects of atrial natriuretic peptide on inter-organ crosstalk among kidney, lung and heart in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Intensive Care Med Experimental*. 2:28, 2014 doi: 10.1186/s40635-014-0028-8 (査読あり)
3. Uchida T, Ito H, Yamamoto H, Ohno N, Asahara M, Yamada Y, Yamaguchi O, Tomita M, Makita K. Elevated Levels of Angiopoietin-2 as a Biomarker for Respiratory Failure After Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 28: 1293-301, 2014 (査読あり)
4. Suzuki K, Tanaka S, Uchida T, Nakazawa K, Makita K. Catecholamine release induces elevation in plasma lactate levels in patients undergoing adrenalectomy for pheochromocytoma. *J Clin Anesth* 2014 doi: 10.1016/j.jclinane.2014.06.005 (査読あり)
5. Uchida T, Ohno N, Asahara M, Yamada Y, Yamaguchi O, Tomita M, Makita K. Soluble Isoform of the Receptor for Advanced Glycation End Products as a Biomarker for Postoperative Respiratory Failure after Cardiac Surgery *Plos One* 2013, 8: e70200 (査読あり)

6. Senda M, Uchida T, Kobinata H, Nakazawa K, Makita K. i-Gel Supraglottic Airway for Inexperienced Anesthesia Residents. *Open Journal of Anesthesiology* 3: 64-66, 2013 (査読あり)
7. Yamakawa N, Uchida T, Matthay MA, Makita K. Proteolytic release of the receptor for advanced glycation end products from in vitro and in situ alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 300:L516-25, 2011 (査読あり)
8. Yamamoto H, Uchida T, Yamamoto Y, Ito Y, Makita K. Retrospective analysis of spontaneous recovery from neuromuscular blockade produced by empirical use of rocuronium. *J Anesth* 25: 845-9, 2011 (査読あり)
9. Uchida T. Acute lung injury and alveolar epithelial function. *J Anesth*. 25:152-4, 2011 (査読なし)

[学会発表] (計 3 件)

1. 伊藤裕之、内田篤治郎、榎田浩史 骨髄由来間葉系幹細胞—肺胞上皮細胞間相互作用. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会 2013 年 5 月 18 日 札幌
2. 内田篤治郎 ARDS の病態と治療:最新知見(招待講演) 第 35 回日本呼吸療法医学会 2013 年 7 月 21 日 東京
3. Yamamoto H, Uchida T, Ito H, Ohno N, Asahara M, Yamada Y, Yamaguchi O, Makita K. Serum Angiopoietin-2 as a Biomarker for Postoperative Respiratory Failure After Cardiac Surgery. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists 2013. 10. 12, San Francisco, USA

[図書] (計 1 件)

1. 内田篤治郎 呼吸療法 Up Date : ARDS の病態と治療:最新知見 榎田浩史編, 真興交易 2015 年 2 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 篤治郎 (UCHIDA, Tokujiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 40262183

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし