

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592066

研究課題名(和文) ヒト脂肪由来幹細胞の障害肺、移植肺治療への実用化を目指す、肺生着、臓器保護の研究

研究課題名(英文) The study of tissue protection and cell implantation effects by adipose tissue derived stromal cells for future usage in damaged or transplanted lung

研究代表者

土谷 智史 (Tsuchiya, Tomoshi)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：30437884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：基礎研究としては、ラット肺門クランプによる虚血再灌流モデルを用い、PARP-1阻害剤という抗アポトーシス作用を持つ薬剤の組織障害の抑制効果を示すことができ、結果は、米国雑誌のTransplantationに受理された。脂肪幹細胞投与実験としては、ラット肺移植モデルによる組織障害の抑制研究を行い、F群(免疫抑制剤投与群)に比してAF群(免疫抑制剤投与+脂肪幹細胞投与群)は拒絶のGradeが低い傾向にあった。ラット肺門クランプによる虚血再灌流モデルの組織障害の抑制研究は、2011年に同様の報告があったので、中止した。

研究成果の概要(英文)：In the starting up study, we established rat ischemia-reperfusion model using hilar clamping. Using the model, we could show that PARP-1 inhibitor prevent the tissue injury. The study was accepted in the journal of Transplantation. In the study of adipose tissue derived stromal cells, we established rat lung transplantation model and used the cells to prevent tissue rejection. Interestingly, adipose tissue derived stromal cells enhanced the effects of immunosuppressant.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：虚血再灌流障害 肺移植 脂肪幹細胞 PARP inhibitor

## 1. 研究開始当初の背景

肺気腫や間質性肺炎、嚢胞性肺線維症等のびまん性肺疾患は、進行的で不可逆的であり、重症化した場合、肺移植が唯一の治療法と考えられている。しかしそのドナー数は限られており、たとえ移植が行われたとしても、拒絶反応のコントロールのため、生涯にわたって免疫抑制剤を使用しなければならない。

幹細胞治療は、このような疾患に有効ではないかとの報告がなされてきた。stem cellは炎症のある部位に取り込まれやすい性質があり、組織内で血管内皮細胞や肺胞上皮細胞に分化し、肺の再生や組織障害の抑制に働く。しかし、肺に関しては技術的、倫理的な問題から臨床応用はなされておらず、未だ動物実験レベルである。

これらの幹細胞の中で、自己脂肪由来幹細胞は、倫理的、技術的問題が少なく、最も有望視されている。幹細胞治療を行う場合、多量に採取出来る。最小の侵襲で採取出来る。安全に移植できる、等の条件が報告されているが(Gimble et al Circ Res 2007)、脂肪由来幹細胞は、皮下脂肪から安全に採取でき、骨髄の500倍の幹細胞を含有し (Fraser et al. Trends Biotechnol 2006)、乳房再建や形成でその再生効果が実証されている。同時に脂肪由来幹細胞は、障害肺に臓器特異的に働く有力なツールと分かってきた。ラットモデルでは、脂肪由来幹細胞を静脈投与すると、気腫肺に特異的に生着し、持続的に多量のhepatocyte growth factor(HGF)を産生して、その働きによって肺が再生する(Shigemura et al. Am J Transplant 2006)。

また、脂肪由来幹細胞を細胞シートとして、気腫肺を被覆すると、肺が再生する。HGF自体の静脈内投与でも、短期的にはあるが、げっ歯類の肺の気腫化、線維化を抑制し、肺での虚血再還流障害を抑制することが報告されている(Makiuchi et al. J Heart Lung Transplant 2006)。

これらの結果より、我々は、数種の幹細胞治療の中で、脂肪由来幹細胞に着目し、肺の疾患への治療効果を検討することとした。

## 2. 研究の目的

仮説：脂肪由来幹細胞は、肺移植の分野に応用すれば、移植肺の虚血再還流障害を予防し、さらには、移植肺にも生着してキメラ化を促進できる可能性がある。

この研究では、脂肪由来幹細胞が肺障害を抑制するか、移植肺に生着してキメラ化を促すかを肺虚血再還流モデル、肺移植モデルを使用して検証することを目的とした。

(1) 虚血再灌流モデルでは、手技の安定を目指し、脂肪幹細胞を使う前に薬剤投与で実験を行った後、同じ系で幹細胞の実験に入ることとした。これは、PARP-1阻害剤という抗アポトーシス作用を持つ薬剤を頸静脈投与

して、その組織障害抑制作用を検証した。

脂肪幹細胞による肺虚血再灌流障害抑制の効果については、当科で研究していたが、報告がなされてしまったため(Sun et al. Journal of Translational Medicine 2011, 9:118)、中断した。

(2) 脂肪幹細胞投与の、肺移植モデルについては、現在研究中である。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット虚血再灌流障害モデル

肺の虚血再灌流モデルをWistar ratで作成し、PARP-1阻害剤という抗アポトーシス作用を持つ薬剤を頸静脈投与した。

生後7週のWistarラットを用い、全身麻酔下にカニューレクションされた左頸静脈より、生食もしくは10 mg/kgのPJ34を投与。その40分後に左開胸による左肺門クランプモデルを作成した。虚血時間を1時間とし、十分なinflation後閉胸した。偽手術群(sham群)、虚血再灌流障害群(IR群)とPARP阻害薬投与群(PARP-i群)の3群(各群:n=15)で評価を行った。

#### 評価項目

- ・再灌流後2日目に、肺および肝・腎の組織学的評価、肺のTUNEL染色による評価および血清中PARP活性を評価した。また、血清中の肝機能(AST, ALT, LDH)を評価した。

- ・再灌流後4時間、2日目、7日目に、ELISAで炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6)を評価し、Luciferase assayを用いて組織内ATP濃度を測定した。また、湿乾肺重量比を評価し炎症の程度の評価を行った。

- ・酸化ストレス応答は、同一個体を用いて、留置されたカテーテルから再灌流後4時間、2日目、3日目、5日目、7日目に0.5mlの血液を採取して、WisnerII社のF.R.E.Eを用いて評価した。

- ・ラット肺門クランプによる虚血再灌流モデルを用いたラット脂肪肝細胞投与モデルでは、実験2週間前にラットの両側大腿皮下の脂肪組織からCytori therapeutics社のプロトコルに準じて脂肪肝細胞を採取、培養し、 $1 \times 10^6$ 個の脂肪幹細胞を得た。ヘパリン化を行った虚血モデルのラットに対して、再灌流開始と同時に頸静脈より脂肪幹細胞を緩徐に投与。十分な肺の含気と気漏の有無を確認して閉胸した。偽手術群、虚血再灌流障害群、脂肪肝細胞投与+虚血再灌流障害群の3群で比較を行い、再灌流後48時間の病理組織所見を検討した。

### (2) ラット肺移植モデル

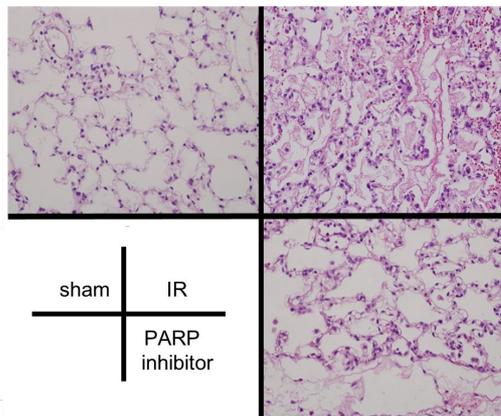
Brown Norwayラットをドナー、Lewisラットをレシピエントとして、同所性アロ左肺移植を行った。移植の2週間前にレシピエントの腹部脂肪から脂肪幹細胞を採取・培養した。移植直後に脂肪幹細胞( $1.0 \times 10^6$ )を経静脈的に投与した群(AD)、移植後から連日タクロ

リムス(0.5mg/kg)を投与した群(F)、移植直後に脂肪幹細胞を投与し、タクロリムスを連日投与した群(AF)、コントロールとして移植後無治療群(C)の、4群を作成した。移植1、3、7日目に犠牲死させ、病理学的評価やELISAによる血清学的評価を行った。幹細胞の局在を把握するための、GFPに変わる蛍光物質として量子ドットを用いることとした。

#### 4. 研究成果

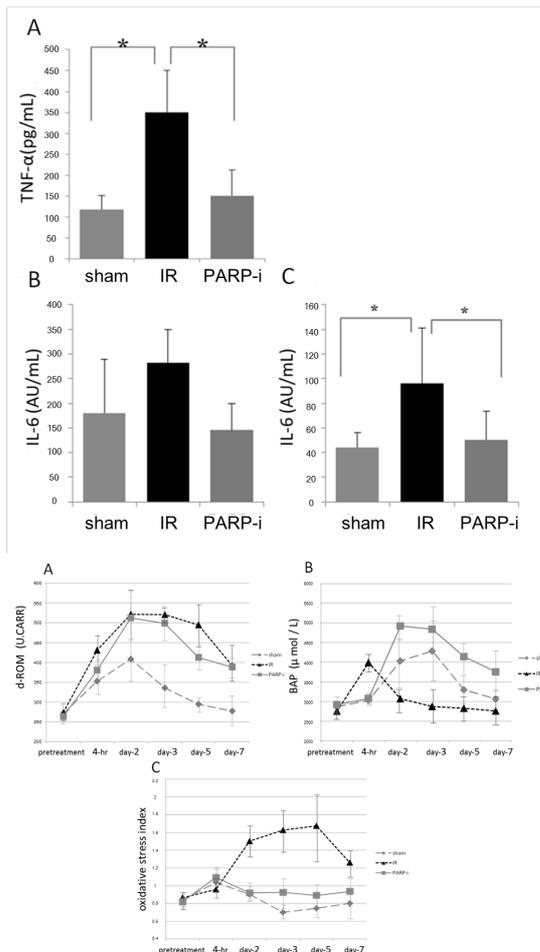
##### (1) ラット虚血再灌流障害モデル

再灌流後48時間の時点でIR群では強い炎症が誘導されるのに対して、PARP-1阻害剤投与群においては炎症が抑制された。



TUNEL染色では、IR群ではアポトーシスが炎症細胞、肺胞上皮細胞、血管内皮細胞などにみられるのに対して、PARP-i群ではshamと同程度に抑制された。

ATP活性やPARP活性、炎症性サイトカイン



も PARP-i 群で炎症が抑制されていることが示された。

酸化ストレス応答の指標として用いた、d-ROM(酸化ストレス指標)、BAP(抗酸化力指標)では特にBAPにおいて、PARP-i群が有意に高値を示した。また、IR群では抗酸化力のバランスが崩れた状態が7日目でも持続した。

・ラット肺門クランプによる虚血再灌流モデルを用いたラット脂肪肝細胞投与モデルでは、n=3では、肺泡間隔壁の肥厚は脂肪幹細胞投与群でも虚血再灌流障害群と同程度に確認されたが、炎症細胞浸潤は少ない傾向であった。また、再灌流後4時間、2日目、7日目で炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- $\alpha$ )を測定した。各群n=3で比較したが、虚血再灌流障害に対して、脂肪幹細胞投与群では炎症が抑制される傾向はあるものの、有意な差までは得られなかった。

##### (2) ラット肺移植モデル

F群に比してAF群は拒絶のGradeが低い傾向にあった(p=0.043)また、気管支周囲リンパ節におけるPCNA labeling indexが、AF群において有意に低かった(p=0.03)。また、AF群では血中のHGF、IL-10が高値を示し、IL-2が低値を示し、血清学的にも拒絶が抑制されていることが確認された。さらに量子ドットを用いた脂肪幹細胞の蛍光染色から、投与後の脂肪幹細胞が移植肺に残存していることが確認された。以上から脂肪幹細胞による拒絶抑制の機序として、HGF分泌による免疫寛容が考えられた。現在投稿準備中である。

#### 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 1件)

Go Hatachi, Tomoshi Tsuchiya, Takuro Miyazaki, Keitaro Matsumoto, Naoya Yamasaki, Shingo Matsushima, Atsushi Nanashima, Yoshikazu Higami, and Takeshi Nagayasu. Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor (PJ34) Reduces Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. Transplantation 査読有 2014 (In press)

〔学会発表〕(計 3件)

第40回日本臓器保存生物医学会:畑地豪 肺虚血再灌流障害に対するPARP阻害薬PJ34の臓器保護効果の検討。2013年11月10日 会場 東京医科大学病院臨床講堂

第49回日本移植学会総会:畑地豪 Poly(ADP-ribose) polymerase 阻害薬は肺の虚血再灌流障害時における抗酸化力を高め、酸化ストレスによる障害を軽減する。2013年9月7日. 会場 国立京都国

際会館  
ATS 2013 international conference : Go Hatachi Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor (PJ34) abrogates the oxidative stress induced by pulmonary ischemia-reperfusion injury 2013 April 30<sup>th</sup>. Philadelphia

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土谷 智史 (TSUCHIYA, Tomoshi)  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：30437884

### (2) 研究分担者

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：80284686

下川 功 (SHIMOKAWA, Isao)  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70187475

山崎 直哉 (YAMASAKI, Naoya)  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：70404217

秋田 定伯 (AKITA, Sadanori)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：90315250

### (3) 連携研究者

樋上 賀一 (HIGAMI, Yoshikazu)

東京理科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90253640