

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659572

研究課題名(和文)複合型幹細胞シートを用いた放射線肺炎・線維症の治療

研究課題名(英文)A therapy of radiation pneumonia using hybrid stem cell sheet.

研究代表者

玉井 好史(TAMAI, Yoshifumi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：90207225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療は癌の治療にとって重要な治療法のひとつである。放射線肺炎は、放射線治療の重大な副作用であり、放射線肺炎を合併すると十分な放射線治療を受けることができないため、放射線肺炎の早急な治療法の開発が求められている。
本研究では、放射線肺炎の新しい治療法として、肺組織に分化する細胞を移植する再生医療を用いた治療法を提唱し、その治療効果を検討し、その有効性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A radiotherapy is one of an important treatment for cancer. Since radiation pneumonia is a serious side effect of the radiotherapy, the patients with radiation pneumonia cannot be received enough radiotherapy. Wherefore, the development of new treatment for radiation pneumonia is required.
In this study, we propose the new therapy using the regenerative therapy with transplanting the cells which differentiate to a lung tissue.

研究分野：放射線治療学

キーワード：放射線肺炎

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで世界に先駆け、活性酸素や、再生医療の観点から放射線肺炎・線維症の発生メカニズムと治療法を検討してきた。なかでも、放射線照射後の急性期変化である炎症機転および慢性期変化である線維化に活性酸素が強く関与すること、活性酸素抑制剤の投与が急性炎症を抑制し放射線肺臓炎の発症を遅らせること、間葉系幹細胞シートを用いた治療、は世界ではじめての報告となった。骨髄細胞や間葉系由来幹細胞投与による治療は、炎症を抑制するだけではなく、肺組織において血管新生を誘導し、一定の治療効果を認めたと、肺組織、特に肺胞上皮細胞への分化効率は低く、十分な治療とはなりえなかった。世界中でも放射線肺炎・線維症に対する有効な治療法の検討が行われており、中でも、線維化を発症する中心的なケモカインである TGF- β の制御に関わる研究は期待されたが、TGF- β を抑制しても、その作用が特異的ではなく、また、放射線照射によって障害を受けた肺組織が再生することはなく、治療効果に乏しい。一方で、骨髄幹細胞や肺性幹細胞が肺障害時の治癒機転に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。そこで、我々は、ラット放射線肺炎モデルを利用し、肺組織保護作用を有する FGF、VEGF や HGF 遺伝子を導入した骨髄幹細胞や間葉系幹細胞の投与が、肺組織を再生し、放射線肺炎の治癒を促進し、延命効果を誘導することを明らかにしたが、問題点として骨髄幹細胞や間葉系幹細胞の肺胞上皮細胞への分化効率が悪く、未だ、この問題は解決されていない。

2. 研究の目的

放射線治療において放射線肺炎・線維症は重要な合併症である。近年、肺胞上皮細胞に特異的に分化する肺性幹細胞が同定されたが、放射線肺炎・線維症に対する肺性幹細胞を用いた治療法は検討されていない。本研究で複合型幹細胞シート(肺性幹細胞及び間葉系幹細胞)を利用した放射線肺炎・線維症の治療法を開発する。そのため、動物実験モデルを利用し、複合型幹細胞シート及び遺伝子導入複合型幹細胞シートの放射線照射肺への移植により、1)それぞれが、肺に接着し、肺の各種細胞に分化誘導され、2)放射線肺炎・放射線線維症の発症を抑制し治療効果があるか検討した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪由来間葉系幹細胞の分離同定

脂肪由来間葉系幹細胞は、フィッシャーラットから採取した。ラットを全身麻酔下で鼠径部を切開し、脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織はコラーゲン処理を行った後、ストレーナーを用いて濾過し、濾過液を培養した。これまでの我々の研究 (Miyahara et al. *nature med*, 2006 : P459-465) で、3 回継

代培養した細胞が CD29、CD90 陽性であり、CD34、CD45、SMA 陰性の多分化能を持つ間葉系幹細胞であることがわかっており、FACS 装置を用いて間葉系幹細胞を分離した。

(2) 肺性幹細胞である細気管支肺胞幹細胞の分離同定

肺胞上皮細胞に分化する細気管支肺胞幹細胞は肺内に存在し、pro-Surfactant Protein C (pro-SPC)/Clara cell secretory protein(CCSP) 陽性細胞のなかで、Sca1pos/CD34pos / CD45neg / CD31neg 細胞であることが明らかになっている。フィッシャーラットの両肺を全身麻酔下で胸部正中切開により摘出し、コラーゲン処理を行った後、FACS により、pro-SPC/CCSP 陽性細胞を抽出し、さらに、Sca1pos/CD34pos/CD45neg/CD31neg 細胞を抽出し培養した。

(3) 複合型細胞シートの作製および遺伝子導入 (in vitro)

細胞シートの作製は、上述した方法で分離同定した間葉系幹細胞と細気管支肺胞幹細胞をトリプシン処理にて分離し、セルシード社の温度応答性培養皿を用い共培養することにより、複合型細胞シートを作成した。

実験に使用する遺伝子は、iNOS 遺伝子を用いた。

(4) 複合型細胞シートの生着の検討 (in vivo)

放射線肺炎モデルを作成し複合型細胞シートを肺に貼付し肺にどの程度の期間生着するか検討を行った。

放射線肺炎モデルの作製

ラット放射線肺炎モデルは、フィッシャーラットにリニアック 20G の線量を 7 分間右肺に照射するモデルを使用した。このモデルは、従来我々が放射線肺炎モデルとして長年使用しているモデルであり放射線照射後 2 週間後までに片肺に急性障害が生じ、6 カ月後には慢性障害が生じるモデルである。このモデルを用いてすでに我々は、急性期放射線肺障害の評価を CT 検査及び肺胞洗浄液と組織学的変化で、また、慢性期放射線障害の変化を CT 検査及び組織学的に評価する方法をすでに確立している。

(5) 各種細胞シートの生着期間の検討 (in vivo)

各種細胞シートの肺への貼付は開胸し行い、各種細胞や、導入された遺伝子の違いにより生着期間が変化するか検討した。実験群は間葉系幹細胞シート群、iNOS 遺伝子導入間葉系幹細胞シート群、細気管支肺胞幹細胞シート群、iNOS 遺伝子導入細気管支肺胞幹細胞シート群、複合型細胞シート群、iNOS 遺伝子導入複合型細胞シート群の 6 群に分けた。各種投与細胞がどれくらいの期間生着するのか正確に検討するために、DiI の発現期間を検討

するだけでなく、生着細胞にアポトーシスがどの程度発生しているか検討した。各種細胞の生着の検討およびアポトーシスの検討は、上記した各群の肺組織における、DiI の発現とアポトーシス経路に重要な役割を持つ Cytochrome C を免疫細胞染色することにより評価した。フィッシャーラットは、放射線照射後 1 週、2 週、4 週、8 週、12 週、16 週及び 24 週で犠死させ肺組織を採取し生着期間を評価した。

(6) 治療効果の検討

急性期障害に対する治療効果の検討

このモデルではすでに、放射線照射 2 週後に照射肺の毛細血管の透過性が亢進していることが明らかになっているので、放射線照射 2 週後に胸部 CT 写真を撮影し肺の浸潤影の有無を比較検討し、また、気管支肺胞洗浄および組織学的検討を行うことにより、治療効果を評価した。

慢性期障害に対する治療効果の検討

このモデルではすでに、放射線照射 24 週後に肺の線維化が生じてくる事が明らかである。そこで、放射線照射 24 週後に胸部 CT 写真を撮り線維化を評価し、またアザン染色を用いた組織学的検討とヒアルロン酸の定量を行い、治療効果を評価する。

(7) 細胞シートの移植が有効であるメカニズムの検討

本研究の特徴は、放射線肺臓炎の治療に細胞シートによる細胞移植療法が有効であることを示すだけでなく、その有効性のメカニズムとして、細胞シート自体が肺の各種細胞に分化再生し、さらに組織修復に関与するサイトカインの産生を分泌すること、細胞シートの移植が残存する肺のサイトカインの産生を亢進し、肺組織の再生が亢進することを明らかにする点である。そのために、放射線照射後 24 週で犠死させたあと放射線照射肺と非照射肺をともに摘出し、組織学的検査、各種 ELISA 法による下記の検討を行った。組織学的検討においては、肺を摘出後 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行った。

細胞シート自体が肺の各種細胞に分化するため、免疫組織学的に SP-A (肺胞上皮細胞、クララ細胞)、CD31 (血管内皮細胞)、CD155 (気管支上皮細胞)、cytokeratin5 (気管支上皮細胞)、CD68 (肺胞マクロファージ)を行い、DiI の発現を加味して各種細胞への分化を判定した。細胞シートの移植がサイトカインの産生を亢進することを示すために、肺臓炎の急性期障害に関与する IL-1、TNF- α 、IL-8、線維化に関与する TGF- β 、IGF-1、PDGF などのサイトカインだけではなく、炎症を抑制する IL-4、VEGF、HGF などの定量を行い、さらに免疫染色を行い、細胞シートが分泌するのか、照射肺が分泌するのか明らかにし、更に、二重染色を行うことにより、分泌細胞

を明らかにした。肺組織への分化の亢進の証明に関しては、細胞分裂している細胞を BrdU を用いた組織学的検討を行い、あわせて細胞マーカーとの二重染色を行うことにより、肺内における肺の再生が亢進するか検討した。

4. 研究成果

本研究の目的は、細胞シートを利用することにより、新たな放射線肺炎・線維症の治療法を開発することである。そのため、H24 年度には治療に使うための複合型細胞シートを作成し、動物実験モデルを作成し、細胞シートの移植を行った。

具体的には、はじめに脂肪由来間葉系幹細胞及び細気管支肺胞幹細胞を分離同定し、分離同定したそれぞれの間葉系幹細胞と細気管支肺胞幹細胞をトリプシン処理にて分離し、温度応答性培養皿を用い共培養することにより、脂肪由来間葉系幹細胞シート、細気管支肺胞幹細胞シートおよび複合型細胞シートを作成した。

放射線肺炎・線維症モデルはラット実験動物モデルを用いて、作成した後に肺の組織所見や気管支肺胞洗浄液を用いて、急性期では肺に炎症反応が生じていること、慢性期で線維化が生じていることを確認した。

平成 25 年度には昨年度作成した放射線肺炎動物実験モデルに対して、複合型細胞培養シート、脂肪由来間葉系幹細胞シート、細気管支肺胞幹細胞シートをそれぞれ移植し、その治療効果に関して確認した。

平成 25 年度には、まだ十分な動物実験数を用いての検証が終わらなかったが、生着率に関しては複合型細胞培養シートが最も高く、脂肪由来間葉系幹細胞シート、細気管支肺胞幹細胞シートの順に生着し、肺組織の基質となる成分全てが含有しているほど生着率が高いことが確認された。一方で、放射線肺炎の急性期炎症に対する治療効果はどのシートを用いても、ある一定の効果があり、シートによる差が少ない傾向にあることが確認され、治療効果の主たる機序としてサイトカインを介することが想定された。

平成 26 年度には平成 25 年度に引き続いて複合型細胞培養シート、脂肪由来間葉系幹細胞シート、細気管支肺胞幹細胞シートの移植を行い、その治療効果に関して確認した。平成 25 年度と同様、生着率に関しては複合型細胞培養シートが最も高く、脂肪由来間葉系幹細胞シート、細気管支肺胞幹細胞シートの順に生着し、肺組織の基質となる成分全てが含有しているほど生着率が高いことが確認された。しかしながら、重層の構造を構築することは困難であり、新たな課題が残された。一方で、放射線肺炎の慢性期炎症に対する治療効果は複合型培養シートで高かった。

本研究を行うことにより、肺組織の構築という点でさらなる問題の改善が必要であると思われたが、細胞シート移植による総合的な治療効果の解析を行うことができ、本研究

は有意義であったと考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉井 好史 (TAMAI, Yoshifumi)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：90207225

(2)研究分担者

福山 直人 (FUKUYAMA, Naoto)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：50349338

(3)連携研究者

盛 英三 (MORI, Hidezo)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：90146598

辻 千鶴子 (TUJI, Chizuko)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：80130079