

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670665

研究課題名(和文)肺組織由来のトリプシン高度耐性多能性幹細胞を用いた急性肺傷害治療法の確立

研究課題名(英文)Cell therapy for acute lung injury using lung derived trypsin resistant pluripotent cells

研究代表者

田中 園美(TANAKA, Sonomi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：80644103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺から、トリプシン高度耐性細胞を分離し、細胞の形質の検討し、ラット・エンドトキシン肺傷害モデルに投与した場合の細胞の治療効果を検討した。分離された細胞には、CD29陽性CD90陽性の形質が維持され、TIMP1,4および α 1アンチトリプシンのmRNAの発現量が多い、KGFの発現量が多く、肺胞II型上皮の形質維持または誘導に参与している可能性がある、などの特徴があり、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。

研究成果の概要(英文)：We studied the phenotype of the cells derived from rat lung tissue by trypsin treatment for 16 h, and we evaluated the efficacy of cell therapy using these cells for mouse acute lung injury model. The lung derived trypsin resistant cells had positivity for CD29 and CD90. Transcription of TIMP 1,4 and α -1 anti-trypsin were abundant, which might be related with tolerance to proteinases. When these cells were administered via nasal route to the lipopolysaccharide induced mice acute lung injury model, the activity of neutrophil elastase in the lung was reduced. These results suggested a possibility of these cells as a therapeutic approach to acute lung injury, but further study is needed to establish efficacy of this methodology.

研究分野：麻酔科学

キーワード：急性肺傷害

1. 研究開始当初の背景

2010年に、Kurodaらはヒトの骨髄細胞と皮膚線維芽細胞に対して8時間~16時間のトリプシン処理を行った後に得られた細胞が、浮遊培養系で桑実胚様の形態を有するコロニーを形成し、外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化能をもつことを示し(Kuroda Y et al. PNAS. 2010;107:8639-43)、再生医療・あるいは臓器傷害への細胞治療の一手段として注目された。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長時間のトリプシン処理を行った後も生存し、かつ増殖能を有する細胞を分離し、その性質の検討を開始した。

2. 研究の目的

本研究は(1)ラットを用いた肺トリプシン高度耐性細胞の表面抗原の同定による細胞の形質の検討すること、(2)ラット・エンドトキシン肺傷害モデルに投与した場合の細胞の治療効果を検討することを目的として計画された。

3. 研究の方法

(1)ラットを用いた肺トリプシン高度耐性細胞の分離および表面抗原による細胞の形質の検討

深麻酔下にラットを安楽死させ、摘出した肺を細断し、エラスターゼ処理を行ってえられた細胞懸濁液に対して、16時間のトリプシン処理を行い、ウシ胎児血清で中和の後、10%FBS添加 MEM培地で培養する。このようにして得られた細胞について、継代を10回までの範囲で培養を維持し、以下の検討を行い、幹細胞様の形質の有無や肺胞上皮への作用について評価した。

1) **フローサイトメトリーを用いた表面抗原によるタイピング**: CD29, CD45, CD54, CD90, に対する蛍光標識抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、表面抗原によるタイピングを行い、必要に応じて特定のサブグループの細胞をソーティングして培養した。

2) **分化誘導実験**: 市販の分化誘導培地を用いて、軟骨、脂肪、骨への分化能を検討した。

3) **トリプシン高度耐性細胞と肺胞上皮初代培養**: トリプシン高度耐性細胞と肺胞上皮初代培養の共培養を行い、上皮におけるサーファクタントプロテインの発現が長期間(21日間)の培養でも維持されるかどうかを検討し、肺胞の上皮機能の維持または活性化を誘導するかどうかについて検討した。

(2)マウス・エンドトキシン肺傷害モデルに投与した場合の治療効果の検討

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

4. 研究成果

(1)肺におけるトリプシン高度耐性細胞(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+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)。

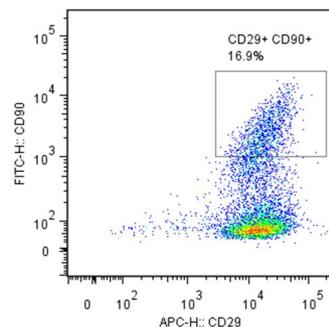


Fig 1: LTR 細胞表面のCD29とCD90に関するフローサイトメトリーの一例

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。

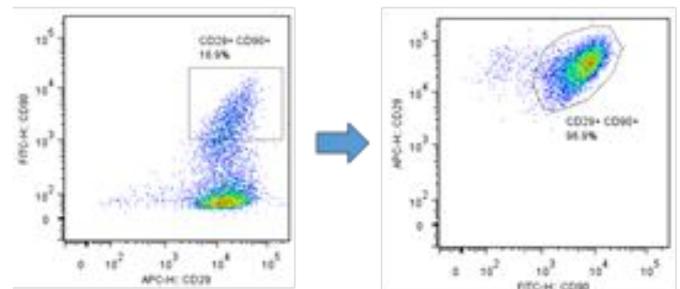


Fig 2: LTR 細胞を培養維持・継代を繰り返した後の表面のCD29とCD90の発現に関するフローサイトメトリーの一例

(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)

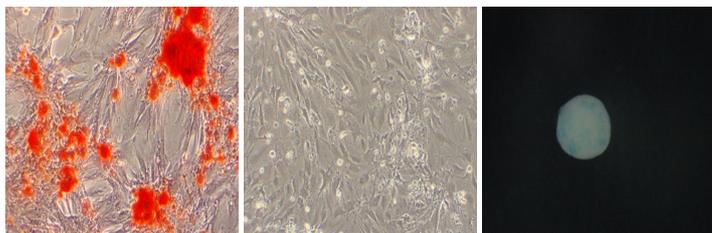
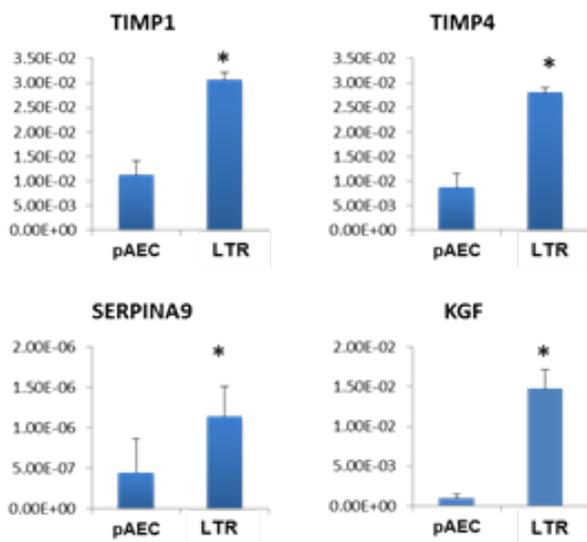


Fig 3 : LTR 細胞の中胚葉系由来組織への分化誘導
左) 骨分化誘導(陽性) 中) 脂肪分化誘導(陰性) 右) 軟骨分化誘導(弱陽性)

(3) LTR 細胞と肺胞上皮細胞 (AEC) の形質の比較

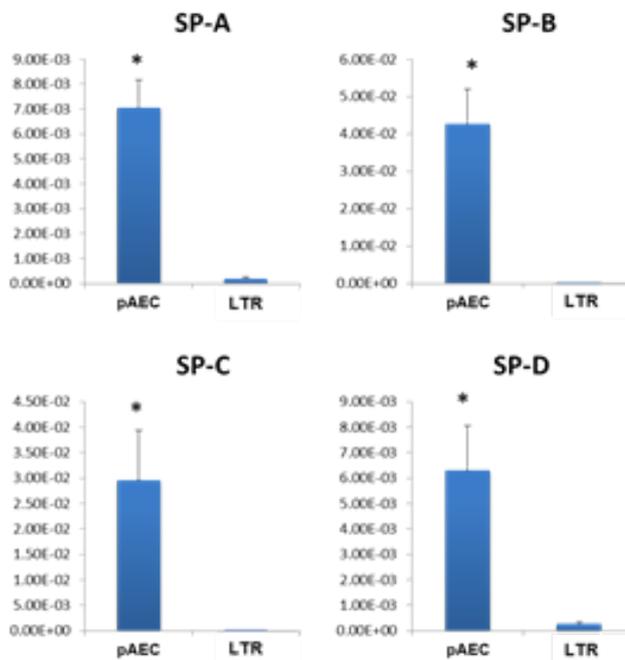
LTR 細胞は AEC と比較して、TIMP-1, TIMP-4, Alpha-1 antiproteinase inhibitor などの単分解酵素阻害因子や Keratinocyte growth factor の発現が有意に高いという性質を有していた (Fig 4)



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 細胞とラット肺胞上皮初代培養細胞 (AEC) の共培養

1) 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、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)

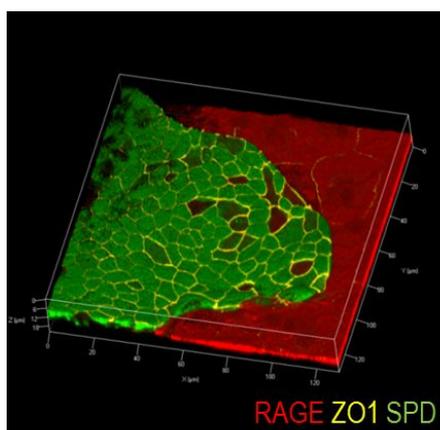


Fig 6 : LTR 細胞と AEC の分離型共培養を行った際の免疫細胞法による評価。赤く染まっているのが RAGE (I 型肺胞上皮マーカー)、黄色く染まっているのが ZO-1 (上皮間結合タンパク)、緑に染まっているのが、SP-D

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 7)

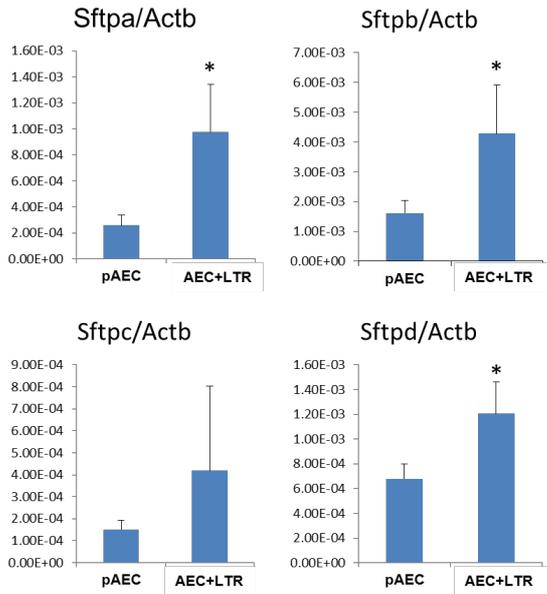


Fig 7 : LTR 細胞と AEC の分離型共培養における AEC 内のサーファクタントプロテイン A-D の mRNA 発現に関する評価

LTR 細胞と AEC の混合型共培養では、やはり、肺泡 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 8)

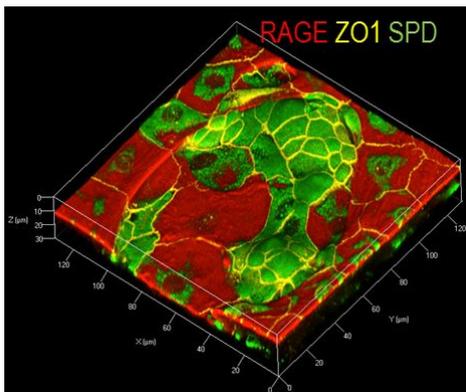
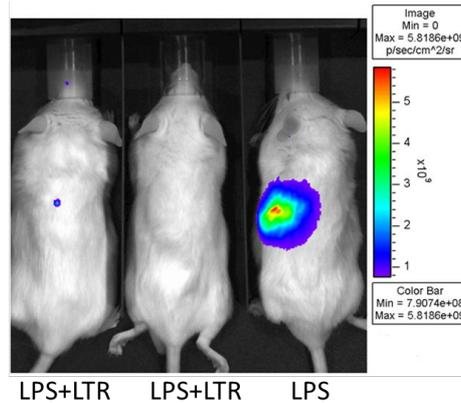


Fig 8 : LTR 細胞と AEC の混合型共培養を行った際の免疫細胞法による評価。赤く染まっているのが RAGE (I 型肺泡上皮マーカー) 黄色く染まっているのが ZO-1 (上皮間結合タンパク) 緑に染まっているのが、SP-D

(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 9)



好中球エラスターゼ活性(蛍光強度)

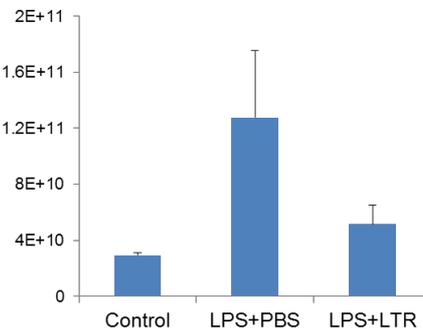


Fig 9 : (上) LTR 細胞をエンドトキシン肺傷害モデルマウスに投与した際の好中球エラスターゼ活性を IVIS にて定量的に計測した際の典型画像。、右側の動物では、LPS 投与により、有意に好中球エラスターゼ活性が上昇したが、LTR 投与群ではそれが起こらなかったことが示されている。(下) LTR 細胞をエンドトキシン肺傷害モデルマウスに投与した際に好中球エラスターゼ活性を IVIS にて定量的に計測したもの

以上の結果をまとめると、LTR 細胞には、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は弱いか全く見られない、TIMP1,4 (プロテアーゼインヒビター) および 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、KGF の発現量が多く、肺泡 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、細胞自身の SP-A, B, C, D の発現は極めて低い、in vitro の実験において、肺泡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ったが、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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中園美 (TANAKA, Sonomi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80644103

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし