

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 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：25670759

研究課題名(和文)急性肺傷害におけるMUSE細胞(ストレス耐性多能性幹細胞)投与による治療法の開発

研究課題名(英文)Cell therapy using multilineage differentiating stress enduring (MUSE) cell for acute lung injury

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの皮膚線維芽細胞からMUSE細胞を分離し、ラット・エンドトキシン肺傷害モデルに同種または異種移植投与した場合の治療効果を検討した。今回ヒト皮膚線維芽細胞から16時間のトリプシン処理ののち、SSEA3陽性細胞として分離した細胞は、CD105の陽性率が高く、Methocult H4100を用いた浮遊培養では桑実胚様のコロニーを形成する性質が認められたが、マウス急性肺障害モデルにおける治療的な効果を明らかにすることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Multilineage differentiating stress enduring cells were isolated from a human dermal fibroblast cell line. The isolated cells were sooted by SSEA3 positivity, and they maintained positivity of CD105 as a surface marker. When these cells were cultivated in Methocult H4100, they formed colony shaped cell spheres. However, we could not show the therapeutic effect of these cells in mice acute lung injury model, probably because of technical failure in the maintenance of the phenotype of MUSE cells. Further studies are needed to establish efficacy of cell therapy using MUSE cells.

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)、Multilineage differentiating stress enduring cell(MUSE細胞)と名付け、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。この細胞は、分離・培養に必要な一定期間を経れば、治療に必要な細胞を、皮膚などの比較的採取しやすい組織からとることができ、安全性の高い自家細胞移植にも適用できるという特徴を有している。また、トリプシンに耐性であることは、炎症組織に浸潤した白血球などから放出されるプロテアーゼに対しても耐性を示すことが期待され、より高い組織への生着が期待でき、また、抗プロテアーゼ活性を持つ液性因子を放出していることが推察され、炎症時の組織の破壊を抑制し、正常な組織構造の修復や再生に寄与する可能性がある。

このような観点から、このMUSE細胞の投与により、急性肺傷害の治療の効率を向上させることができると考え、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトの皮膚線維芽細胞からMUSE細胞を分離し、ラット・エンドトキシン肺傷害モデルに同種または異種移植投与した場合の治療効果を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト皮膚線維芽細胞からのMUSE細胞の分離・培養

ヒト皮膚線維芽細胞はLonza社の細胞培養株を用いた。

①ヒト皮膚線維芽細胞を、16時間トリプシン-EDTA中で維持したのち、10%FBS添加αMEM培地を加えた細胞懸濁液の形で回収し、300g・5分間の遠心で培地およびトリプシンを除去したのち、PBSを加えて再び遠心し、回収した細胞を10%FBS添加αMEM培地を加えて25cm<sup>2</sup>フラスコで培養した

②接着した細胞を増殖させ、トリプシン処理で回収し、抗SSEA-3抗体で標識し、SSEA-3陽性細胞をFACS AriaIIを用いてソーティングし、得られた細胞を10%FBS添加αMEM培地で培養し、これをMUSE細胞として取り扱った。

③Methocult H4100含有培地を用いた浮遊培養で桑実胚様のコロニー形成をすることを確認した。

④骨化誘導培地、軟骨化誘導培地、脂肪細胞化誘導培地による多能性分化能について検討した。

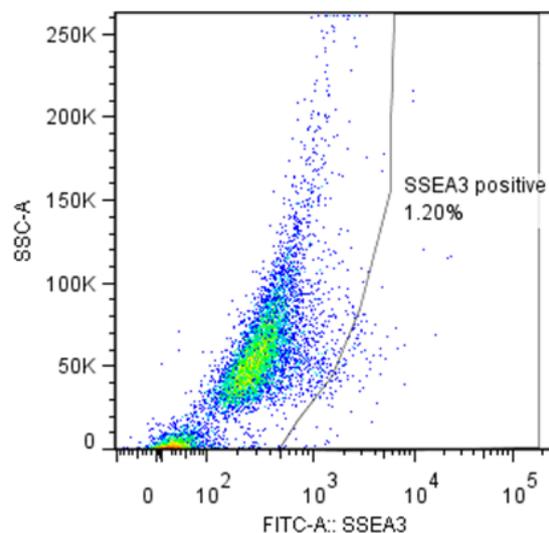
#### (2) ヒトMUSE細胞の、ラット・エンドトキシン肺傷害モデルに同種または異種移植投与した場合の治療効果の検討

ラット急性肺傷害モデルとして、Lypopolysaccharide投与による肺傷害モデルを作成する。キシラジン・ケタミン麻酔下に気管挿管し、5mg/mlのlypopolysaccharideを300μl経気道的に投与する。4時間後に治療細胞の投与を行い、麻酔から覚醒させて、自発呼吸下に24-48時間飼育する。治療に用いる細胞は、ヒト由来のMUSE細胞とし、5000細胞/μlに調整し、経鼻的に1x10<sup>6</sup>細胞投与した。その18時間後、fMLP(200nM)とNE680(好中球エラスターゼ特異的的近赤外蛍光色素, 4nM)を経鼻投与して、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) ヒト皮膚線維芽細胞からのMUSE細胞の分離とフローサイトメトリーを用いたMUSE細胞の形質の評価

ヒト皮膚線維芽細胞を、16時間トリプシン-EDTA中で維持したのちの生存細胞数は、トリプシン処理直前の細胞数の約10%であった。生存した細胞を10%FBS添加αMEM培地を加えて25cm<sup>2</sup>フラスコで培養し、SSEA3+でソーティングを行うと、1-2%の細胞が分離



された。(図1)

図1 SSEA3によるソーティングの例。SSEA3+の細胞が1.2%検出されている。

これを、10%FBS添加αMEM培地で培養し、CD105の発現についてフローサイトメーターで調べると、約80%の陽性率が得られた。

#### (2) MUSE細胞の中胚葉系由来組織への分化誘導実験

MUSE細胞をStemPRO Adipogenesis

Defferentiation Kit、StemPRO Chondrogenesis Defferentiation Kit を用いて培養し、それぞれ、Oil red O, Alcian Blue 染色を行ったところ、軟骨分化誘導は弱陽性であったが、脂肪分化誘導は陽性という結果となった。

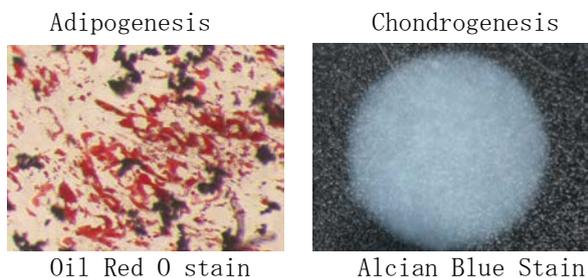


図2 (左) 脂肪分化誘導。戚職に染まっているのが、脂肪分化誘導された細胞 (右) 軟骨分化誘導。Alcian blue により全体が淡青色に染色され、弱陽性を示した。

### (3) Methocult H4100 含有培地を用いた浮遊培養

Methocult H4100 含有培地を用いた浮遊培養で桑実胚様のコロニー形成をすることが確認された。

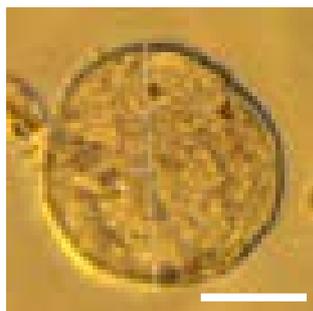


図3 位操作顕微鏡による桑実胚様コロニーの観察像。スケールバーは 50 μm を示す。

### (4) MUSE 細胞とラット肺胞上皮初代培養細胞 (AEC) の共培養

MUSE 細胞とラット AEC の混合型共培養では、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 (図4)

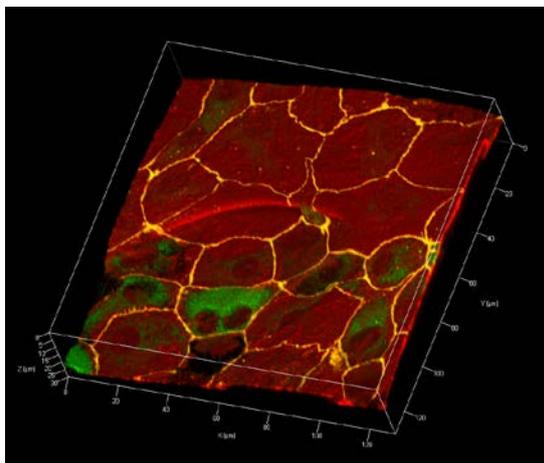


図4 MUSE 細胞とラット AEC の混合型共培養。赤く染色されているのが RAGE、緑色に染色されているのが、SP-D、黄色に染色されているのが、ZO-1。図左下に、胞状構造の形成が観察されている。

### (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、MUSE 細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を経鼻投与し、その 18 時間後、fMLP (200nM) と NE680 (好中球エラストラ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=3)、LPS+MUSE 群 (n=3) で IVIS® imaging system を使用し好中球エラストラ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。MUSE 細胞投与による明らかな治療効果は観察されなかった。

また、ラットを用いた Lipopolysaccharide 投与による肺傷害モデルにおいて、屠殺直後に肺胞洗浄を行って得られた BAL 中の肺胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  においても、MUSE 細胞による治療の有無で差は検出されなかった。

以上の結果をまとめると、今回ヒト皮膚線維芽細胞から 16 時間のトリプシン処理ののち、SSEA3 陽性細胞として分離した細胞は、CD105 の陽性率が高く、Methocult H4100 を用いた浮遊培養では桑実胚様のコロニーを形成する性質が認められた。また、軟骨分化誘導は弱陽性であったが、脂肪分化誘導は陽性であり、中胚葉系由来組織への多能性の分化能を有していた。ラットの肺胞上皮との混合性共培養では、21 日間の培養後にもサーファクタントプロテイン D 陽性の II 型上皮様の形質を有する上皮細胞が維持され、肺胞様の立体構造を作る性質があることが示された。しかしながら、Lipopolysaccharide 投与により作成したラット急性肺障害モデルにおいては、この細胞を投与しても、治療的な効果は明らかにならなかった。

MUSE 細胞としての形質の維持が十分にできていなかった可能性があり、細胞治療としての有用性を明らかにするためには、技術的な面も含めてさらなる工夫が必要であると思われた。

### 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 5 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 Exp. 3: 53, 2015. doi 10.1186/s40635-015-0053-2. (査読あり)
2. 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. doi: 10.1053/j.jvca.2014.03.004. (査読あり)
  3. 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 Medicine Experimental*. 2:28, 2014. doi: 10.1186/s40635-014-0028-8. (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* 26: 616-22, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0070200. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

1. Yamamoto Y, Uchida T, Ito H, Kido K, Yamamoto M, Yamada Y, Ohno N, Asahara M, Yamaguchi O, Makita K. Perioperative Elevation in Cell Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction: A Multicenter Observational Study. *Anesthesiology* 2015. 2015.10.24 San Diego, USA
2. Ito H, Uchida T, Makita K. Ketamine Causes Mitochondrial Dysfunction in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neurons. *Anesthesiology* 2015. 2015.10.26 San Diego, USA
3. Itoh Y, Kasuga T, Toyama S, Uchida T,

- Makita K. Retrospective Analysis for Intra-Operative Ventilatory Management During General Anesthesia: Is Lung Protective Ventilation Accepted as a Common Practice in the Operating Room? *Anesthesiology* 2015. 2015.10.24 San Diego, USA
4. 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 札幌市教育文化会館 (北海道札幌市)
  5. 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 京王プラザホテル東京 (東京都新宿区)
  6. 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, SanFrancisco, 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 134-145 総ページ数 12 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