

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861727

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた敗血症の病態解明および新規治療法の創出

研究課題名(英文) Elucidation of pathological condition of sepsis by using iPS cells for creation of novel therapy

研究代表者

粕田 承吾 (KASUDA, Shogo)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を用いた敗血症治療の確立を目的とし、iPS細胞から血球系胚葉体(Hematopoietic Embryoid body: EB)を作製した。EBは血管内皮細胞の整合性を保持する作用があることが、明らかとなり、この作用はSphingosine-1-phosphate(S1P)を産生することによるものと考えられた。

実際に、敗血症モデルマウスにEBを投与すると、肺水腫の発症が抑制され、マウスの生存率は上昇した。EBが産生するS1Pが、マウスの血管内皮細胞の整合性を保持し、敗血症の進展を阻害するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：iPS cells differentiated into hematopoietic embryoid body (EB) in order to establish novel therapy for sepsis. We revealed that EB protected the endothelial integrity by producing Sphingosine-1-phosphate (S1P).

Intravenous injection of EB into sepsis mice significantly restored their survival rates compared to saline-injected mice. Also, onset of lung edema was protected by EB injection. S1P produced from EB exerted protective effects on endothelial integrity of lungs, resulting in inhibition of sepsis progression.

研究分野：血管生物学 血液凝固学

キーワード：敗血症 sphingosine-1-phosphate 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の高度救命医療の現場においてさえ、敗血症は高い死亡率を示している。敗血症の基礎病態は Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) と呼ばれる全身的な炎症性サイトカインレベルの上昇である。SIRS により全身の血管内皮細胞は傷害される。血管内皮細胞の整合性の維持は生体のホメオスタシスに重要であり、内皮細胞傷害による血管内容の漏出は hypovolemic shock や肺水腫を惹起し、敗血症による死亡率を高める。さらに、傷害により、内皮細胞表面に露出した tissue factor (TF) は血液凝固系を攪乱し、Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) を誘発し、さらには微少循環障害により Multiple Organ Failure (MOF) へと至り死亡する。

(2) これらのことから、敗血症の治療を目指して、かつては抗炎症性サイトカイン抗体や Toll-like receptor 抗体など様々な試みがなされたが、いずれも失敗に終わっている。活性型 protein C (APC) が敗血症に有効であるとの Bernard らの報告を受け (Bernard GR, New Engl J Med; 2001)、米国で組み換え型 APC 製剤 (Xigris®) が発売されていたが、その後の大規模調査 (PROWESS-SHOCK study) で敗血症に有効ではなくむしろ出血等の副作用が認められたとして (Ranieri, V.M, New Engl J Med; 2012)、発売中止となった。敗血症は全身性の無秩序な凝固・炎症亢進状態であり、無数の凝固・炎症因子がその進展に関与している。単一因子の投与で凝固・炎症のストーム状態を鎮めることは困難であり、化学的な薬剤での敗血症治療は限界の状態に来ていると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は敗血症に対する iPS 細胞による治療法を創出することを目的とする。化学的な薬剤に頼らない、まったく新規の治療法の

礎を築きたい。現在、次世代の敗血症治療として細胞治療が注目されている。敗血症に対する細胞治療は、移植細胞から幾多の因子が放出されることにより、あるいは移植細胞とレシピエント細胞の cell-cell interaction により、敗血症病態を抑制することを期待している。現在までに、骨髄由来前駆細胞やヒト ES 細胞から分化誘導した angiotensin converting enzyme 陽性細胞が敗血症マウスの生存率を上昇させることが報告されている (Toya SP, Am J Pathol; 2011)。

(2) これら過去に報告されている移植細胞は、いずれも中胚葉系 (血球・血管内皮) の性格を持っている。しかし、骨髄由来細胞はヒトへの応用を考えた場合、ドナーの確保が事実上不可能である。また、ヒト ES 細胞を用いた報告では極めて煩雑な培養方法を用いて Embryoid body (EB) への分化誘導を行っており、実際的ではない。しかし我々はすでに iPS 細胞を用いて、簡便に中胚葉系 EB (hematopoietic-like EB) へと分化誘導することに成功している (Kasuda S, Blood Coagul Fibrinolysis; 2011)。そこで、iPS 細胞による細胞治療を行うことを発案した。iPS 細胞は事実上無限に増殖させることが可能であり、ドナー不足の問題は無い。

(3) Sphingosine-1-Phosphate (S1P) は、低濃度では低分子量 G タンパク Rac を介して血管内皮細胞の整合性の維持に働き、逆に高濃度では同 Rho を介して血管内皮細胞を破綻させる (Wang. Microvascular Res; 2009)。S1P は赤血球、血管内皮細胞、血小板などの中胚葉由来の組織が主な貯蔵部位とされている。Hematopoietic-like EB が敗血症に対して何らかの効果を持つのであれば、S1P は必ず何らかの関与をしているはずである。さらに、S1P の血管内皮細胞に対する作用を解析し、敗血症の病態も解明し、診断法へも応用も目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS 細胞より血球系胚葉体

(Hematopoietic embryoid body; EB)を作製する。RT-PCR にて適切に中胚葉系細胞へ分化誘導できているかを確認する。また、リアルタイム PCR 法にて S1P の産生酵素 (Sphingosinekinase; SphK) の mRNA 発現を確認する。

(2) Trans-membrane を用いた共培養法により、hematopoietic-like EB が血管内皮細胞の LPS による permeability 亢進を抑制するかどうかを検討する。また、FITC-Phalloidin を用いた細胞骨格染色にて、EB のストレスファイバー形成に対する影響を検討する。

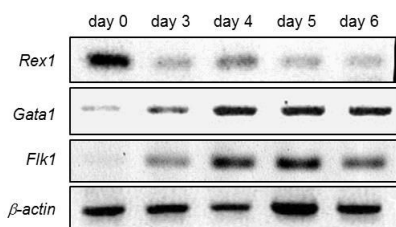
(3) EB を LPS により刺激し、培養上清中の S1P を測定する。

(4) 敗血症モデルの作製は cecal ligation and puncture (CLP)法により行う。手術直後に EB を尾静脈より投与する。敗血症モデルはにより作成する。CLP モデルは LPS の投与により実際の敗血症に近いとされる。投与後のマウスの生存率をコントロール群と比較する。投与後のマウスから採血し、炎症性マーカー(pentraxin3; PTX3)を測定する。また、S1P 濃度も測定する。肺水腫の程度を評価する。

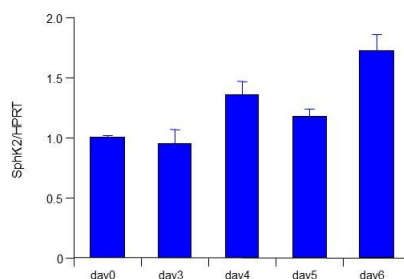
### 4. 研究成果

#### (1) Hematopoietic-EB の作製

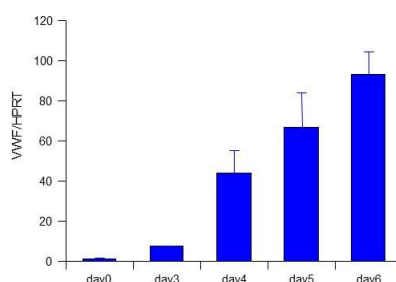
すでに我々が確立している方法により関瓶に Hematopoietic EB の作製に成功した。



6日間培養後の EB(day6 EB) で未分化細胞のマーカー遺伝子 Rex1 は発現しなくなり、中胚葉系のマーカー遺伝子(Gata1 および Flk1) が強く発現している。



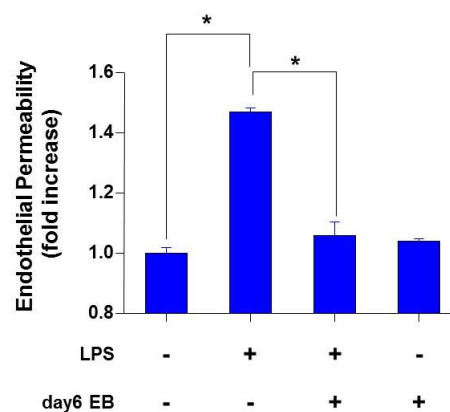
また、リアルタイム PCR 法にて、S1P 産生酵素 (SphK2) が day6EB で発現亢進していることを明らかにした。



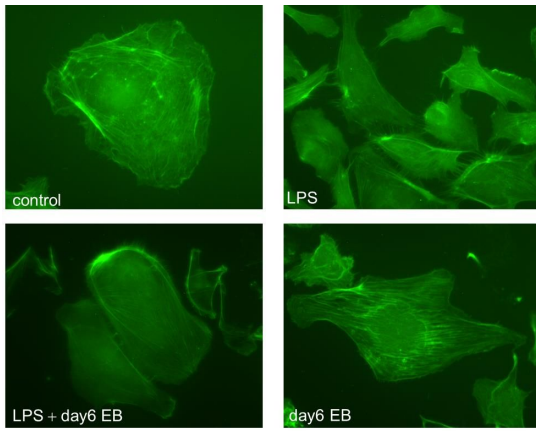
さらに、血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor の発現が培養日数にしたがって上昇し、day6 で最高に達した。

以後の実験は day6EB を用いて行うこととした。

#### (2) 血管内皮細胞に対する影響

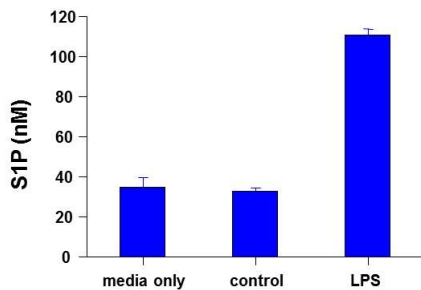


EB は LPS 刺激による内皮細胞の透過性亢進を抑制した。



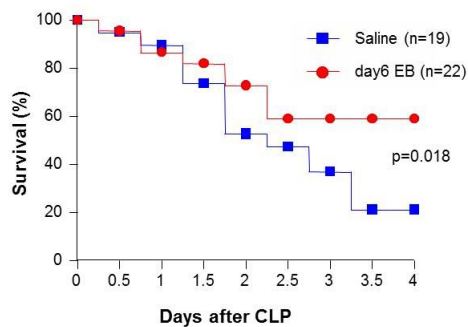
EBはLPSによる内皮細胞のストレスファイバー形成を抑制した。

### (3) EBによるS1P産生



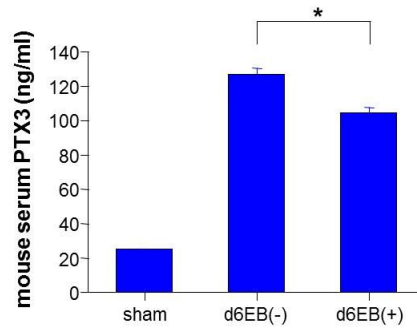
EBはLPS刺激によりS1P産生を亢進させた。

### (4) 敗血症モデルマウスへの効果



EBの投与により、CLP後の生存率が有意に上昇した。

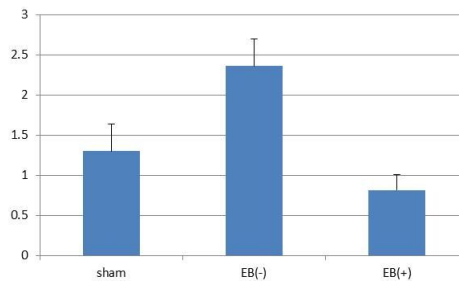
### (5) 血中PTX3濃度



炎症マーカーPTX3の濃度が、EB投与群ではEB非投与群に比較して有意に低下した。

### (6) 血中S1P濃度

S1P濃度が、EB投与群ではEB非投与群に比較して有意に低下した。



### (7) 肺水腫への影響

EB投与群ではEB非投与群に比較して、肺水腫の発症が抑制された。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

粕田承吾、工藤利彩、勇井克也、川島 渉、玉置盛浩、中西真理、石谷昭子、羽竹勝彦  
iPS細胞由来 hematopoietic-like embryoid body の敗血症への効果および法医診断への応用の可能性

第99次日本法医学会学術全国集会 平成27年6月11日 高知

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

粕田 承吾 (KASUDA, Shogo)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70434941