

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293316

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞およびiPS細胞を用いた肺再生医療の開発

研究課題名(英文) Cell-based therapy in lung regenerative medicine using adipose tissue-derived stem cell and induced pluripotent stem cell

研究代表者

奥村 明之進 (Okumura, Meinoshin)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40252647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患COPDの新たな治療法の開発は急務であり、今回COPDに対する細胞治療を用いた再生医療を考案することを目的とした。

COPD誘導マウスに対して、健康なマウスより脂肪幹細胞を分取し、経静脈的、経気管的に投与すると、移植細胞は障害肺へ集積し気腫肺を改善した。さらに、人工多能性幹細胞iPS細胞を様々な成長因子を用いて肺胞上皮細胞への分化誘導法を検討した。分化誘導した細胞を標識して、上記と同様に肺障害マウスへの移植を施行し、肺胞への生着および呼吸機能の改善を確認した。肺の再生医療を考案する上で、脂肪幹細胞やiPS細胞が重要なツールになり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a progressive lung disease. This study was designed to develop the therapeutic solution against COPD by the cell therapy.

We used the representative mice model of COPD. The adipose tissue-derived stem cell (ADSCs), , administered intravenously, and trans-bronchially. The ADSCs accumulated the damaged area and significantly inhibited deterioration of the lung compliance and histologic changes. We also focused on the induced pluripotent stem (iPS) cell as a source of supply of lung epithelial cell. To prepare the type2 alveolar cells, we investigated the general methods of differentiation the iPS cells. The differentiated iPS cells were transplanted into COPD model mice and improved lung function. Our data indicated that the administration of ADSCs and iPS cells improved the emphysema histologically and functionally.

研究分野：肺再生医療移植免疫

キーワード：肺再生 幹細胞 脂肪幹細胞 人工多機能性幹細胞 慢性閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

現代医療の限界である重症臓器不全に対する治療としては、臓器移植置換型治療が最も有効である。しかしながら脳死ドナー数は限られており、脳死体からの臓器移植の機会は未だ数少ない。近年、肺気腫をはじめとする閉塞性換気障害の患者は増加しており、2020年には全世界の死亡原因の第3位になることが予測されている。したがって慢性呼吸不全に対する新たな治療戦略の構築が必要である。我々は慢性呼吸不全に対する治療手段の可能性の一つとして再生医療に注目してきた。その結果、(1) ラットを用いた左肺全摘モデルにおける代償性肺再生には肝細胞成長因子 HGF が関与していること、(2) ラット肺気腫モデルにおいて HGF の外的補充が肺胞・肺血管の再生をもたらすこと、(3) 肺気腫モデルにおいて肺容量減少手術に脂肪組織由来幹細胞を投与することで肺胞が再生すること、を明らかにした。このように、動物実験レベルでは肺再生医学の可能性を証明してきたが、肺実質へどのように再生因子を誘導するかなどの問題から、いまだ臨床応用には至っていない。心臓外科領域では、筋芽細胞などの細胞シートから産生される HGF が重要であることを解明し、臨床の場で使用されている。一方、当院内分泌代謝内科が同定した脂肪細胞特異的発現蛋白であるアディポネクチンが心筋再生機能を有し、また呼吸器内科が COPD の病因にアディポネクチン発現の低下が関連することを報告した。今後、アディポネクチンなどの新規肺胞再生因子の候補を探索し、効率的な投与法を検証すること、また新たに細胞治療の可能性を考慮して COPD 肺を対象とした肺再生医学にチャレンジすべく本研究を企画した。しかし、複雑な構造をもつ肺を再生するためには、まだまだ克服すべき問題が多い。COPD などの慢性呼吸不全は、細気管支より末梢の気道域に不可逆的な組織破壊を伴っており、このよう

な疾病に対する細気管支・肺胞の組織再構築は、目指すべき根源的な治療法である。

2. 研究の目的

前述のように、COPD の新たな治療法の開発は急務であり、またそれは肺胞再生にチャレンジすることに他ならない。

今回、COPD に対する細胞治療を中心とした再生医療を考案することを目的として、以下の研究を計画した。

脂肪幹細胞を用いた肺再生医療～肺胞再生因子放出による肺胞再生～

iPS 細胞を用いた肺再生医療～肺胞上皮への分化誘導法の確立～

肺胞再生細胞治療法の臨床応用に向けた技術開発・治験の提唱

3. 研究の方法

(1) 動物組織から得た細胞による肺間質微小環境の再現：肺胞上皮細胞株、肺線維芽細胞株、肺微小血管内皮細胞株は購入または初代培養で得た。また、間質成分であるコラーゲンやマトリジェルを添加することで、三次元的に微小環境を再現し、産生される肺胞再生因子を同定し、定量的 RT-PCR 法または ELISA 法によって検出した。

(2) マウス皮下脂肪由来幹細胞の採取：マウスを過剰麻酔により安楽死させ、皮下白色脂肪組織を採取した。採取した組織をコラゲナーゼ溶液で消化して、脂肪由来幹細胞を分取した。

(3) iPS 細胞から肺胞前駆細胞、肺胞上皮細胞への分化誘導法の確立：ES 細胞や肺胞前駆細胞の II 型肺胞上皮への分化誘導法を組み合わせる基本誘導法を確立した。肺胞前駆細胞、肺胞上皮細胞の分化マーカーを確立し iPS 由来細胞の各種内胚葉マーカー、肺胞前駆細胞、末梢肺胞細胞マーカーの発現を解析した。

(4) COPD モデルマウスの作成と細胞治療の効果の検討：エラストナーゼ吸入や片肺全摘モデ

ルを用いて気腫変化を誘導した。同マウスへ、(2) (3)で得た細胞を経静脈的、経気管的に投与し、細胞の生着および呼吸機能に与える影響を明らかにする。

(5) 脂肪幹細胞および iPS 細胞由来細胞の安全性、有効性の検証：脂肪幹細胞や iPS 由来細胞を用いた造腫瘍試験や慢性毒性併合試験等によって安全性を検証した。

(6) 肺の三次元組織構築に関するシグナルの解析：肺の三次元組織構築に必要な細胞外基質と液性因子を探索した。脱細胞化した薄切肺組織へ脂肪幹細胞や iPS 由来細胞を播種させ、iPS 細胞の分化・生着に関連することを検証した。

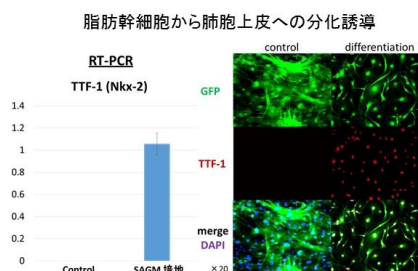
(7) 臨床応用を目指した細胞シート作成：
(2) (3)で得た細胞を温度応答性培養皿 Upcell (Cellseed 社) に播種させ、20 日後に細胞をシート状に回収した。マウスへシート移植後に呼吸機能検査や肺胞の構造、組織解析を行う。また動物イメージング装置によって肺換気血流を測定した。

4. 研究成果

(1) 肺胞上皮細胞株、肺線維芽細胞株、肺微小血管内皮細胞株を三次元で共培養したところ、肺胞上皮細胞を免疫染色で選別しカウントすることにより、肺胞上皮細胞の生存を確認することができた。脂肪幹細胞を共培養に加えることで、肺胞上皮細胞を増加させることを示した。また、アディポネクチンが発現していないアディポネクチン・ノックアウトマウスから得られた脂肪幹細胞では、肺胞細胞増加を抑制することから、間質に分泌されるアディポネクチンが肺胞上皮の増加に関わると考えられた。しかし、脂肪幹細胞補充によるアディポネクチンの補充は継時的に減少し、また微量 (ELISA) であり、肺再生を誘発するためには不十分であった。そこで、組織中のアディポネクチン発現を上昇させる薬剤として、プロスタグランジン (PG) 12 アナログに注目し、同薬剤の投与によりア

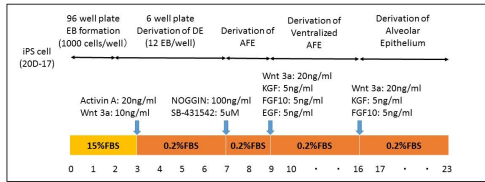
ディポネクチン発現の上昇を通して肺胞増加を促す結果を得た。

(2) GFP マウス皮下脂肪から脂肪幹細胞を単離・培養した。採取した脂肪幹細胞は、分化誘導により脂肪、骨、軟骨へ分化し多分化能を有していた。また、肺胞上皮の培養条件下 (iPS 細胞の分化誘導法：4. に記載) に脂肪幹細胞を培養することで、肺胞上皮マーカーが上昇することを mRNA、蛋白レベルで示した。



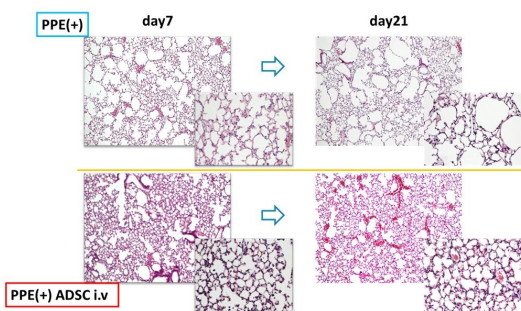
(3) マウス iPS 細胞として、iPS-MEF-Ng-20D-17 細胞株を使用した。DMEM high glucose を分化培地として使用し、培地中の FBS の濃度は、添加因子投与以後は 0.2% とした。Activin A 20ng/ml 単独、WNT3a 10ng/ml 単独、Activin A+ WNT3a 併用投与群で比較検討を行い、投与 4 日目に Activin A+ WNT3a 併用群で胚性内胚葉のマーカーの CXCR4、SOX17、FOXA2 の上昇と SOX2 の低下を認めた。NOGGIN 50 または 100ng/ml + SB-431542 5uM 投与群で比較検討を行い、いずれの投与群でも投与 2 日目に前方前腸のマーカーの SOX2 の再上昇、PAX9 の上昇を認めた。Wnt3a 20ng/ml、KGF 5ng/ml、FGF10 5ng/ml、EGF 5ng/ml (4 因子) を添加した DMEM high glucose 群と、SAGM (small airway growth media) 単独群との比較検討を行い、4 因子を添加した DMEM high glucose 群で、投与 7 日目に腹側化前方前腸のマーカーの NKX2-1 の上昇を認めた。さらに、投与 21 日目には、SPB、SPC の上昇を認めた。以上より、マーカー上は iPS 細胞から腹側化前方前腸を経て II 型肺胞上皮までの分化誘導が可能であった。

iPS細胞からII型肺胞上皮への分化誘導法



(4) エラスターゼ (PPE) をマウスに気管内投与することで、7 日目以降に肺気腫を誘導できることを組織や呼吸機能的に確認した。このモデルマウスに脂肪幹細胞 (1×10^6 cells/匹) 投与を行い、脂肪幹細胞の集積を確認した。投与経路は経尾静脈・経気管内投与とし、PPE+/脂肪幹細胞+、PPE+/脂肪幹細胞-、PPE-/脂肪幹細胞+、PPE-/脂肪幹細胞-の4群に分けて検討したところ、PPE+/脂肪幹細胞+群では気腫肺内に脂肪幹細胞の集積を認め、PPE-/脂肪幹細胞+群と比較して多くの脂肪幹細胞の集積を認めた。また、PPE+群では経尾静脈と経気管内投与いずれも脂肪幹細胞集積を認めた。また、呼吸機能測定により肺コンプライアンスを示すC-chordは脂肪幹細胞投与群で明らかに減少し、脂肪幹細胞投与により気腫肺を機能的にも改善させていた。したがって、脂肪幹細胞投与により肺障害部位への集積を認めた。脂肪幹細胞は肺損傷の再生の過程で、細胞供給源になる可能性が示唆された。

脂肪幹細胞投与の気腫肺改善効果



また、iPS 細胞より腹側化前方前腸まで分化させた細胞を肺胞上皮の Progenitor 細胞として、移植実験を同様に行った。脂肪幹細胞と同様に、障害肺の生着を認め、また呼吸機能においても同様の結果を得た。ただし、脂肪幹細胞に比して生着細胞数が少なく、今後

効率よく生着する条件を検討する必要がある。

(5) 脂肪幹細胞や iPS 由来細胞を免疫不全マウスへ移植したが、造腫瘍性、毒性を認めなかった。引き続き、大動物への移植実験による評価が必要である。

(6) マウスから得た肺組織を脱細胞化し薄切した肺組織へ脂肪幹細胞や iPS 由来細胞を播種させたとこ、細胞が肺組織へ生着した。また、肺胞上皮への分化を行った細胞を播種させると肺胞壁に沿ってそれぞれの細胞が生着しており、分化誘導することが生着部位を規定している可能性がある、さらに PG12 アナログを用いることで、生着細胞数が増加し、II 型肺胞上皮マーカーの発現レベルも上昇した。細胞の分化により、器質への接着分子が変化し、生着先を規定していることを示唆し、また分化した細胞を純化させるツールになる可能性がある。

(7) 分化させた細胞を温度応答性培養皿に播種させたとこ、細胞をシート状に培養可能でシートとして回収できた。COPD モデルマウスを小開胸しシートを肺表面へ移植したところ、14 日目の組織評価で肺表面への細胞生着 (同化) を認めた。残存細胞数は、脂肪幹細胞より iPS 細胞から分化させた細胞の方が多かった。ただし、気腫誘導後の呼吸機能や肺胞の構造には変化は認めず、細胞シートを気腫肺へ投与する効果については更なる検証が必要と考えられた。上記基礎実験から、肺胞再生に適した最適な脂肪幹細胞シートの作成を試みる必要がある。また、細胞治療の安全性を評価するため、大動物を用いた安全性評価を行う。臨床試験計画書、患者説明文書の作成し、臨床試験実施に向けた準備を行っていく。

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8件)

Kimura T, Nojiri T, Hino J, Hosoda H, Miura K, Shintani Y, Inoue M, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K.
C-type natriuretic peptide ameliorates pulmonary fibrosis by acting on lung fibroblasts in mice. *Respir Res.* 査読有.17.2016.19-20.
DOI: 10.1186/s12931-016-0335-6

Kimura T, Nojiri T, Hosoda H, Shintani Y, Inoue M, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K.
Exacerbation of bleomycin-induced injury by lipopolysaccharide in mice: establishment of a mouse model for acute exacerbation of interstitial lung diseases. *Eur J Cardiothorac Surg.* 査読有.48.2015.e85-91.
Doi:10.1093/ejcts/ezv261

[学会発表](計9件)

福井絵里子、新谷康、桃實徹、神崎隆、川村知裕、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進、肺障害治療過程における脂肪組織幹細胞の役割、第16回日本再生医療学会総会、2017/3/9、仙台

桃實徹、新谷康、福井絵里子、神崎隆、川村知裕、舟木壮一郎、南正人、奥村明之進、誘導型多能性幹細胞(iPS細胞)から肺上皮への分化誘導の検討、第16回日本再生医療学会総会、2017/3/9、仙台

Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Kimura A, Sakai Y, Miyagawa S, Sawa Y, Okumura M. Sustained-release delivery of prostacyclin analogue(ONO-1301) enhances lung regeneration after pneumonectomy in mice. American thoracic society International conference. 2014/5/16-5/21. San Diego, United States of America.

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥村 明之進 (Okumura Meinoshin)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 40252647

(2)研究分担者

南 正人 (Minami Masato)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 10240847

新谷 康 (Shintani Yasushi)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90572983

舟木 壮一郎 (Funaki Soichiro)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 50464251

川村 知裕 (Kawamura Tomohiro)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 30528675

松浦 成昭 (Matsuura Nariaki)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 70190402