様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月 １６ 日現在

機関番号：１１３０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：２６８７００４２

研究課題名（和文）移植肺機能不全に対する間葉系幹細胞を用いた細胞治療の基礎研究

研究課題名（英文）Investigation of the cell based therapy for primary lung dysfunction after lung transplantation using mesenchymal stem cell

研究代表者
渡邉　龍秋（Tatsuaki, Watanabe）

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号：７０６３６０３４

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）：本研究では間葉系幹細胞の有する抗炎症効果、免疫調整効果に着目をして肺移植術後急性期死亡の主因である急性移植肺機能不全の予防効果をマウス肺移植モデルを用いて検討をした。移植6時間後に移植肺より回収した気管支肺胞洗浄液中のタンパク濃度はコントロール群に比して低値を示し炎症性サイトカインも低値を示す傾向であった。病理組織学的検討でも間葉系幹細胞投与群では肺障害は軽度であることが示唆された。間葉系幹細胞は再生医療以外にも抗炎症効果、免疫調整効果に着目をした臨床応用が行われ始めているが、肺移植においても応用が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Primary graft dysfunction is a major cause of morbidity and mortality after lung transplantation. Mesenchymal stem cells (MSCs) have a suppress inflammation and immune responses. We examined whether MSCs attenuate ischemia-reperfusion injury in a mouse model of lung transplantation. Mouse lungs were preserved at 4°C for 18 h. Human MSCs were injected into the lung grafts, and orthotopic left lung transplantation was performed. The lung isografts were reperfused for 6 hours. Protein concentration and cell count in Bronchioalveolar lavage fluid were significantly lower in the MSC-administered grafts than in the PBS-administered controls. Concentrations of proinflammatory cytokines showed a decreasing trend in the MSC-administered grafts compared with the controls.Pretransplant administration of MSC may attenuate ischemia-reperfusion injury after prolonged cold ischemia in the mouse model of lung transplantation.

研究分野：胸部外科

キーワード：肺移植　細胞治療　虚血再灌流障害　間葉系幹細胞

１．研究開始当初の背景
肺移植は重症呼吸不全に対しする有効な治療法として1990年代より欧米を中心に普及・発展し、累積症例数はすでに32000例を超える。本邦においても2000年に東北大学、大阪大学で国内初の脳死肺移植が行われ、2013年4月現在298例(脳死168例、生体130例)の肺移植が行われている。しかし、術後3 0日以内の死亡は現在でも約1 0%と高率であり，早急な改善が求められている①。肺移植後30日以内の死亡の約30%を占めるのが，移植肺機能不全（Primary Graft Dysfunctio n ; PGD）である。臨床的には肺水腫、肺動脈圧上昇、低酸素血症を認める。PGDの 原因はドナー肺摘出・冷保存から肺移植・血液の再灌流後まで間に加わる様々なストレス、いわゆる虚血再灌流障害と考えられている②。虚血再灌流障害の原因は未だ解明されていない点も多いが、その病態は敗血症やARDS/ALIに類似した血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の傷害と考えられる。間葉系幹細胞（MSC; Mesenchymal Stem Cell）は骨髄や脂肪組織に存在し、骨、脂肪、軟骨へ分化能を有する細胞集団であり再生医療への応用が進んでいる。MSCは分化能の他に多くの液性因子を産生し抗炎症作用・免疫抑制作用を発揮する③。すでに骨髄移植後の移植片対宿主病の治療などに応用されており、臨床的な安全性も高い④。申請者はMSCがIL-1 receptor antagonist, IL-10, PGE2, TSG-6など免疫調節・炎症抑制作用を有する多彩な液性因子を分泌する点に着目し、MSCによる肺移植後PGDの予防・治療への応用を検討した。

引用文献
①Christie JD, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report--2011. J Heart Lung Transplant 2011; 30:1104-22
③Perrot M, et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. Am J Respir CritCare Med 167:490-511
④Yang S-H, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. Exp Mol Med 2009;41:315-24
⑤Ikehara S,et al. A new bone marrow transplantation method for stem cell disorders. Ann N Y Acad Sci. 2009, 1173, 774-80

２．研究の目的
(1)MSCが肺移植後のPGDの予防・治療に有効であるか否かを検討した報告はなかった。これまでMSCを用いた実験的研究として、呼吸器領域では、低酸素・アシドーシス下の肺胞細胞保護①、ブレオマイシンによる急性肺傷害軽減作用②、Elastase による肺気腫形成軽減作用③、Sepsis による急性肺傷害軽減作用④などが報告されている。しかし、 MSCが肺移植後のPGD の予防・治療に有効であるか否かを検討した報告はない。
また，本研究の特徴は、MSCを移植前から用いることである。PGDが発症した際の治療に関しては多くの研究が行なわれているが，移植前の処置によりそれを軽減させようとした試みはほとんどない。MSCの投与が敗血症などに合併した急性肺傷害に有効との研究結果が近年報告されており、急性肺傷害と類似した病態と考えられているPGDに対してもその効果が期待される。
(2)PGDの予防・治療にあたっては，これまで肺保存液の改良，炎症性サイトカインや好中球エラスターゼの抑制，さらに移植肺循環不全の改善などに焦点が当てられてきた⑤。しかし，現在のPGD に対する治療戦略は一定の成果をあげていると考えられるがこれを完全に抑制することはできず，PGD による周術期死亡は少なくない。一つには、肺血管内皮細胞傷害がある程度以上進行してしまった状況では現行の様々な治療の効果は限定的であることに由来すると推測される。この状況を解消するためには、移植する前の段階でドナー肺のコンディショニングを行い、肺血管内皮細胞傷害をできる限り改善させておくことが重要であると思われる。MSC は液性因子の分泌により抗炎症作用をきたす他に、肺へ直接投与した場合には、肺細胞と直接的な相互作用によりMSCのもつミトコンドリアを肺細胞へ移送し肺保護作用をもたらす⑥。本研究は、移植肺に対する細胞治療という新しい発想に基づいて，PGD に対する予防戦略を提案する試みである。
本研究で期待される成果の一つは、移植前のドナー肺の機能改善により、PGDの発生率ならびにPGDによる死亡率を大きく減少させる可能性である。また、MSCが長期間肺内で活性を維持する可能性があり、その場合抗炎症作用が持続する場合には、肺移植後の免疫抑制療法に変革を持たしうる可能性がある。
もう一つ重要な点は、これまで移植不可とされてきたようなドナー肺の機能を改善させられる可能性を持つ点である。現在，肺移植に用いられているのは，全脳死ドナーの20%程度に過ぎないとされている。本邦では肺移植待機中の呼吸不全患者の半数は待機中に肺移植を受けることなく死亡している。現在、欧米では従来移植を断念されていたドナー肺に対しex vivo 肺灌流(EVLP)を行い、ドナー肺の再評価、さらには薬剤の投与により機能改善を行った後に肺移植を行うことが試みられている⑦。今回の小動物実験により移植肺の機能改善がみられれば、次の段階として大動物実験、及び大動物肺を用いたEVLPへのヒトMSC投与による肺機能改善効果の検討を行い、最終的には臨床応用も期待される。つまり、本研究の成果により，ドナー肺の利用率を向上させることができれば、肺移植待機患者の待機中死亡を減少が期待できる。
引用文献

①Block GJ, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by up regulation and secretion of stanniocalcin-1. Stem cells, 2009; 27: 670-81
②Kaminski N, et al, Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. PNAS, 2003; 100, 8407-11
③Katsha AM, et al, Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. Molecular Therapy 2011; 19: 196-203
④Matthay MA, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. Chest 2010; 138: 965-72)
⑤Shargall Y, et al. Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction part VI: treatment. J Heart Lung Transplant 2005; 24: 1489-500
⑥Mohammad Maimul, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. Nature Medicine 2012;18:759-65
⑦Cypel M, et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. N Engl J Med,2011; 364: 1431-40

３．研究の方法

(1) MSCの培養

テキサス農工大学のProckop教授より供与されたhMSCおよびmMSCを使用する。hMSCは健常成人ドナーより提供された初代培養細胞を16.7%FBS＋83.3%αMEMで培養し、3継代目培養細胞を実験に使用する。hMSCは幹細胞としてのcharacterを維持するため60cells/cm2という少細胞数で播種し培養する。同大が供与するhMSCは健常ボランティアの骨髄から同意を得て得られたものである。研究目的で米国外に供与されることは、同大の倫理委員会とアメリカ国立衛生研究所から承認を受けている。なお，hMSCは通常の体組織と異種抗原・同種抗原の発現様式が異なり，またそれ自体が有する免疫抑制作用のため、マウスに投与して異種間拒絶反応が起こったという報告はない。mMSCはC57BL/6Jマウス骨髄由来の5継代培養細胞を10%FBS＋10%ウマ血清＋80%IMDMを用いて培養し7継代目培養細胞を実験に使用する。mMSCは幹細胞のcharacterを維持するため50cells/cm2で播種し培養する。

(2) マウス左肺移植モデル

ドナーマウスを麻酔し、ヘパリンを静脈投与し抗凝固を行う。気管を切開し20Gの静脈留置針の外とうを挿入する。小動物用人工呼吸器へ接続し胸腹部正中切開を行う。氷冷したLowpotassium dextran肺保存液2mlを肺動脈より灌流し、心肺ブロックを摘出する。心肺ブロックは4°Cで18時間保存し、左肺静脈、左肺動脈、左気管支へそれぞれ20G、24G、20Gの静脈留置針の外とうで作成したカフを装着する。MSCは、カフ装着直後にドナー肺の左肺動脈または左気管支から投与する。

①MSCの経左肺動脈投与

24Gの静脈留置針の外とうを1mLシリンジに装着し、hMSC懸濁液またはmMSC懸濁液、コントロールとしてりん酸緩衝生理食塩水(PBS)を左肺動脈に装着したカフより投与する。

②MSCの経左気管支投与

マウス気管内投与用スプレーを用いて、hMSC懸濁液またはmMSC 懸濁液、コントロールとしてPBS を左気管支に装着したカフより投与する。

一方、レシピエントマウスは麻酔した後。20Gの静脈留置針の外とうを経口挿管し小動物用人工呼吸器へ接続する。第4肋間で左開胸し、肺門部を剥離する。左肺動脈、左気管支、左肺静脈を剥離し9-0絹糸およりクリップでそれぞれをクランプする。ドナー肺の左肺動脈、左気管支、左肺静脈のカフをそれぞれレシピエントの肺門組織へ挿入し10-0ナイロンで結紮する。

(3) 気管支肺胞洗浄液の評価

レシピエントマウスを肺移植6時間、24時間後に安楽死させる。右肺門をクリップで遮断し左肺、へPBS400μlx2回注入、気管支肺胞洗浄液として回収する。回収した気管支肺胞洗浄液は遠心し細胞成分と上清に分離する。一部を用いて細胞数の計測を行い、残りは塗抹標本とし、細胞分画を計測する。上清はBCA法でタンパク濃度を計測する。また、多項目のサイトカインを測定できるBio-Plex サスペンションビーズアレイシステムを用いて気管支肺胞洗浄液中のTNFα、IL-1β、IL-6、KC、MCP1、IL-10、IL17A等のサイトカインを測定する。細胞数、タンパク濃度により肺傷害の程度を比較する。

気管支肺胞洗浄後、残った左肺の一部は-84°Cで凍結保存し、後日DNA、RNAについて解析を行う。残り左肺は-84°Cで保存し、後日タンパク発現の解析を行う。

(4) 組織学的評価

レシピエントマウスを肺移植6時間に安楽死させる。左肺をホルマリン固定し、HE染色を行い肺傷害の比較検討を行う。また、ヒトMHC classⅠ特異的抗体を用いてhMSCの免疫染色を行い、hMSCの肺内での局在を検討する。

４．研究成果

(1) MSCの培養

テキサス農工大学より供与されたMSCは同一条件で培養可能であった。

(2) マウス左肺移植

マウス左肺移植の成功率は 80-90%程度を確保しているため、同モデルを用いてMSCの効果検討を行った。

(3)気管支肺胞洗浄液の解析

MSC を肺動脈または気管支より投与後に気管

支肺胞洗浄液を回収し解析を行った。MSC を肺動脈から投与後６時間での気管支肺胞洗浄液中のタンパク濃度、細胞数はコントロール群に比し低値を示した(図１、図２)。気管支肺胞洗浄液中のマウス由来のサイトカイン濃度は Bioplex を用いて測定をした。TNFα等の炎症性サイトカインは低値を示した。

(4)移植肺の組織学的評価

移植肺のうっ血や肺動脈周囲の浮腫は MSC 投与群では軽度であった。ヒト MHC class1 抗体を用いた免疫染色では MSC は肺動脈や肺の間質に局在していた(図 3)。

図１　気管支肺胞洗浄液中のタンパク濃度

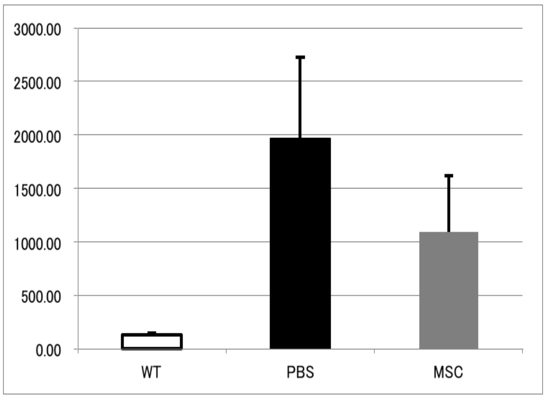



図２　気管支肺胞洗浄液中の細胞数

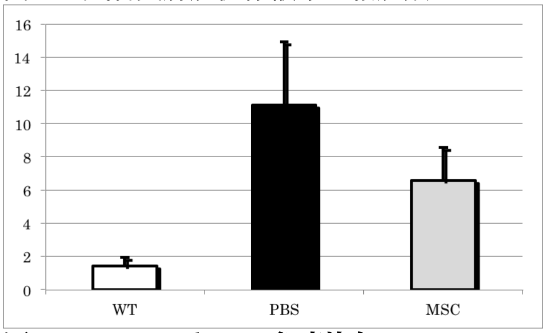
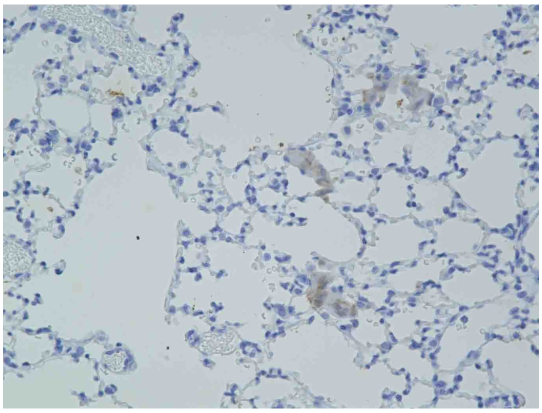



図 3 ヒト MHC class１免疫染色



## 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　１件）

渡邉 龍秋，岡田 克典，石橋 直也，三友 英紀，野田 雅史，星川 康，近藤 丘．間葉系幹細胞の経気道投与による肺移植後虚血再灌流障害抑制効果．Organ biology．2014．Jul;21(2):187-90.(査読なし)

〔学会発表〕（計　0 件）

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/surg/pg45.html

## ６．研究組織

(1)研究代表者

渡邉　龍秋　(WATANABE TATSUAKI)

東北大学·加齢医学研究所·非常勤講師

研究者番号：70636034

(2)研究分担者

（　0　）

研究者番号：

(3)連携研究者

（　0　）

研究者番号：