

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659217

研究課題名（和文）脂肪組織由来間葉系幹細胞の感染症治療への応用

研究課題名（英文）Application of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to antimicrobial therapy

## 研究代表者

中根 明夫（NAKANE AKIO）

弘前大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：30164239

## 研究成果の概要（和文）：

脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASCs: adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) を用い致死性の細菌感染症の治療法としての有用性を検討したところ、致死性のブドウ球菌エンテロトキシンショックマウスモデルに対し、著明な致死率低下効果を示した。この効果は、ASCs 投与による炎症性サイトカインの産生抑制によるものであることが明らかとなった。本研究により、ASCs は致死性の細菌感染症の予防・治療に応用できる可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASCs) on lethal bacterial infectious diseases was investigated. Injection of ASCs rescued mice from lethal staphylococcal enterotoxin shock. ASCs suppressed the production of proinflammatory cytokines. This study suggests that ASCs may apply to prevention and therapy for lethal bacterial infectious diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学（含真菌学）

キーワード：感染症、炎症、幹細胞、脂肪組織、免疫

## 1. 研究開始当初の背景

多剤耐性アシネトバクター、NDM1 (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase) 産生菌が報告され、従来からの HA-MRSA (病院獲得型黄色ブドウ球菌)、CA-MRSA (市中獲得型黄色ブドウ球菌)、多剤耐性緑膿菌などを含むさまざまな難治性細菌感染症が問題となっている。これらの感染症の致死的な帰結は敗血症によることが多い。エンドトキシンショックやエンテロトキシンショックを含む敗血症ショックについてはさまざまな治療法が適用されているが、究極的な決め手がない。

一方、iPS 細胞を始めとするさまざまな幹細胞を使用して、再生医学の研究が格段の進

歩を示している。間葉系幹細胞 (MSCs: mesenchymal stem cells) も幹細胞の中で注目されている。MSCs は骨髄中に存在する細胞で、すでに骨髄移植に使用されていること、ES 細胞のような倫理的問題や拒絶反応といった免疫学的問題を回避できることから臨床応用に適している。MSCs は骨、軟骨、脂肪の間葉系細胞に分化するが、外胚葉系の神経細胞にも分化できる。MSCs は骨髄だけでなく、胎盤、羊水・脾臓・心臓・肝臓などにも類似細胞が存在し、特に豊富な細胞源として脂肪組織が注目されている。一方、MSCs は炎症抑制作用を示すことが知られている。

## 2. 研究の目的

本研究者は、脂肪組織由来 MSCs (ASCs: adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) を用い、劇症肝炎マウスモデルにおいて ASCs の投与により、生存率が劇的に改善されることを見いだした。これらの知見から、本課題研究は、再生を標的としているのではなく、ASCs 自体の直接作用及び免疫学的調節作用を応用し、致死性の難治性感染症の治療法としての有用性を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ASCs の調製: C57BL/6 マウスの皮下及び内蔵脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、Isocove's modified Dulbecco medium (IMDM)+9%ウシ胎児血清+9%ウマ血清を用いて培養後、附着細胞を ASCs として使用した。

(2) エンテロトキシン・ショックマウスモデル: C57BL/6 マウスに staphylococcal enterotoxin A (SEA) 10 µg/mouse 静脈内投与し、4 時間後に大腸菌 lipopolysaccharide (LPS) 80 µg/mouse 静脈内投与した。本条件では、80%のマウスが 42 時間以内に斃死した。

(3) ASCs 投与: SEA 投与 30 分後に、ASCs を 100 万個/mouse 静脈内投与した。対照として、ASCs の代わりに脾細胞を投与した。

(4) サイトカインの定量: SEA 投与 22 時間後の血液及び脾臓を採取し、血清及び脾細胞ホモジネート中の IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-2、IL-10 を ELISA により測定した。

(5) サイトカイン関連分子の遺伝子発現の測定: SEA 投与 22 時間後の脾細胞から RNA を調製し、IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-2、IL-10、IL-12p35、IL-12 レセプター (R) mRNA 発現を quantitative real time RT-PCR により測定した。

(6) T 細胞関連転写因子の測定: SEA 投与 22 時間後の脾細胞から RNA を調製し、T-bet、STAT4、Foxp3 mRNA 発現を quantitative real time RT-PCR により測定した。

## 4. 研究成果

(1) 致死性のエンテロトキシンショックに対し、ASCs 投与マウスは有意に致死率が低下し、ASCs は明確な予防効果を示した (Fig. 1)。

(2) ASCs 投与マウスでは対照群に比べ、IFN-γ、TNF-α、IL-6、IL-2、IL-10、IL-12R 産生及び遺伝子発現が低下していた (Figs. 2-7)。

(3) T 細胞関連転写因子の中で、STAT4 mRNA

発現は ASCs 投与マウスで低下していたが、T-bet、Foxp3 mRNA 発現には影響を与えなかった (Fig. 8)。

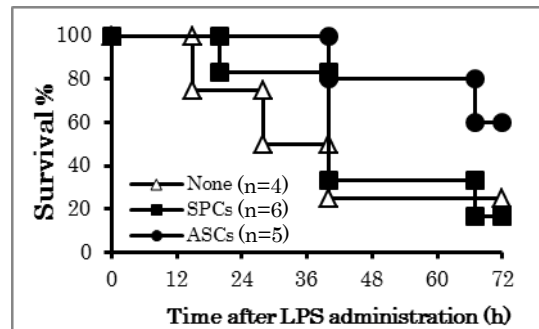


Fig. 1. Administration of ASCs rescues mice from lethal staphylococcal enterotoxin shock. ASCs or splenocytes (SPCs) was administered to mice with staphylococcal enterotoxin shock at 30 min of SEA administration. Survival of mice was observed for 72 h. None indicates survival of mice from staphylococcal enterotoxin shock without ASCs or SPCs administration.

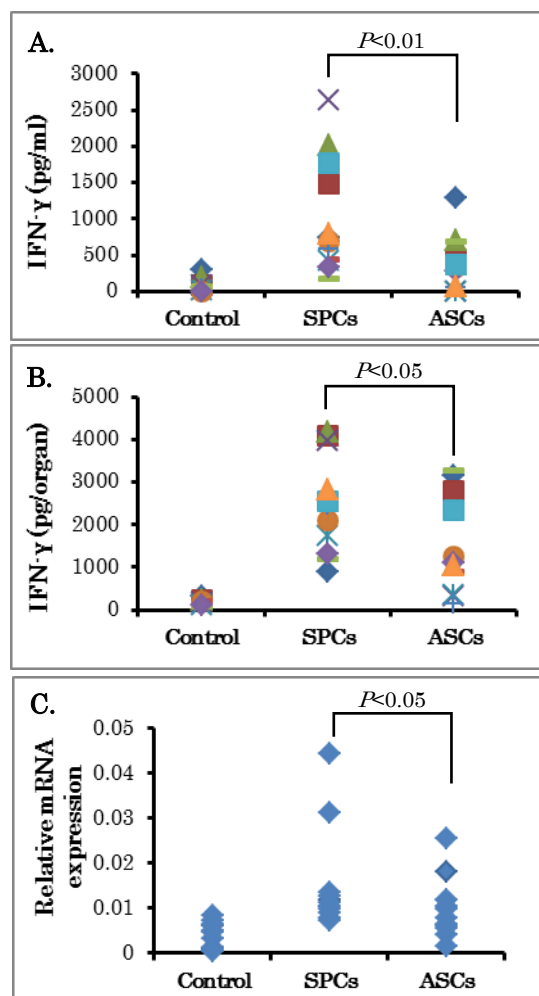


Fig. 2. Administration of ASCs suppresses IFN- $\gamma$  production in mice with staphylococcal enterotoxin shock. IFN- $\gamma$  production was determined from serum (A) and spleen (B) by ELISA. (C) Relative mRNA expression of IFN- $\gamma$  in the spleen was determined by quantitative real time PCR normalizing with mRNA of GADPH. Control indicates mRNA expression in normal mice.

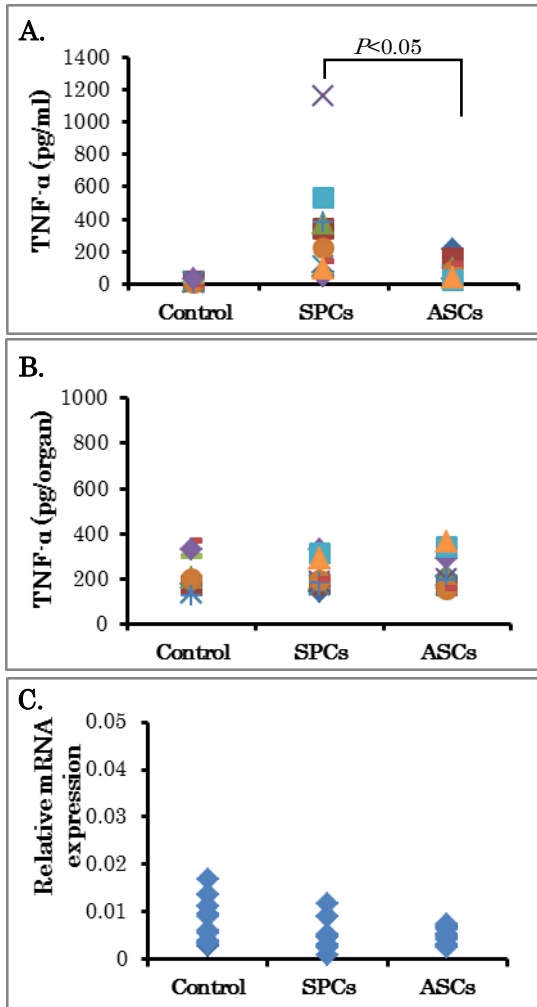


Fig. 3. Administration of ASCs suppresses TNF- $\alpha$  production in mice with staphylococcal enterotoxin shock. TNF- $\alpha$  production was determined from serum (A) and spleen (B) by ELISA. (C) Relative mRNA expression of TNF- $\alpha$  in the spleen was determined by quantitative real time PCR normalizing with mRNA of GADPH. Control indicates mRNA expression in normal mice.

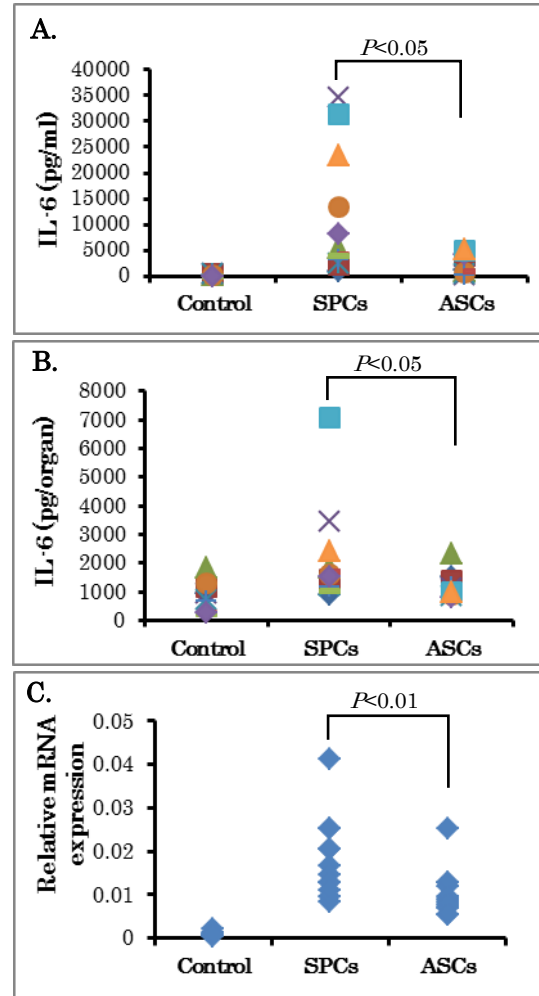
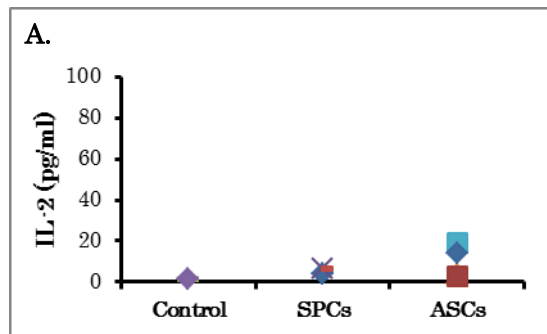


Fig. 4. Administration of ASCs suppresses IL-6 production in mice with staphylococcal enterotoxin shock. IL-6 production was determined from serum (A) and spleen (B) by ELISA. (C) Relative mRNA expression of IL-6 in the spleen was determined by quantitative real time PCR normalizing with mRNA of GADPH. Control indicates mRNA expression in normal mice.



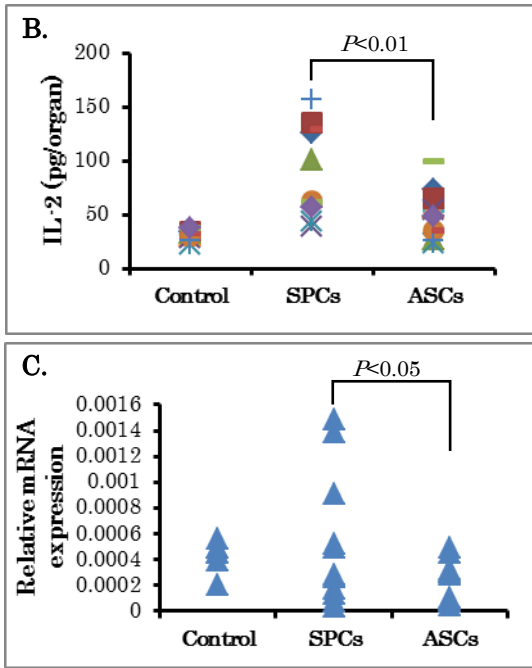


Fig. 5. Administration of ASCs suppresses IL-2 production in mice with staphylococcal enterotoxin shock. IL-2 production was determined from serum (A) and spleen (B) by ELISA. (C) Relative mRNA expression of IL-2 in the spleen was determined by quantitative real time PCR normalizing with mRNA of GADPH. Control indicates mRNA expression in normal mice.

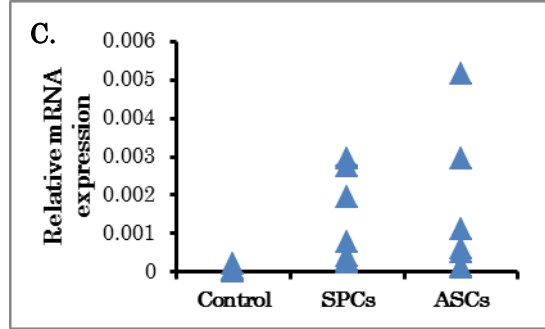
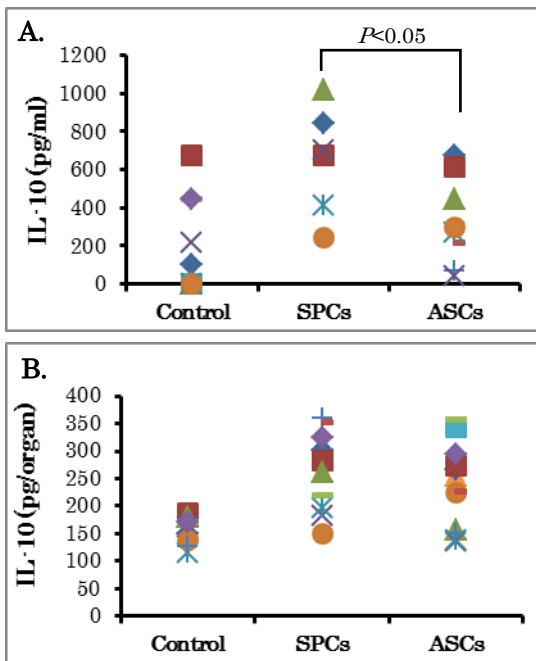


Fig. 6. Administration of ASCs suppresses IL-10 production in mice with staphylococcal enterotoxin shock. IL-10 production was determined from serum (A) and spleen (B) by ELISA. (C) Relative mRNA expression of IL-10 in the spleen was determined by quantitative real time PCR normalizing with mRNA of GADPH. Control indicates mRNA expression in normal mice.

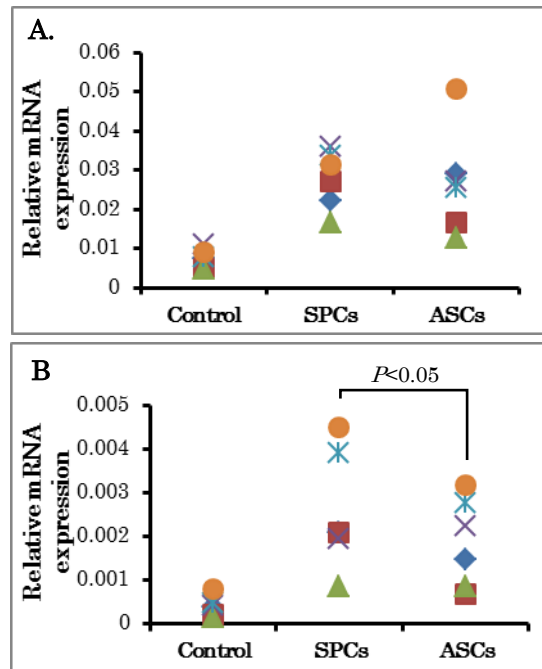


Fig. 7. Administration of ASCs suppresses expression of IL-12R in mice with staphylococcal enterotoxin shock. Relative mRNA expression of IL-12p35 (A) and IL-12R (B) in the spleen was determined by quantitative real time PCR normalizing with mRNA of GADPH. Control indicates mRNA expression in normal mice.

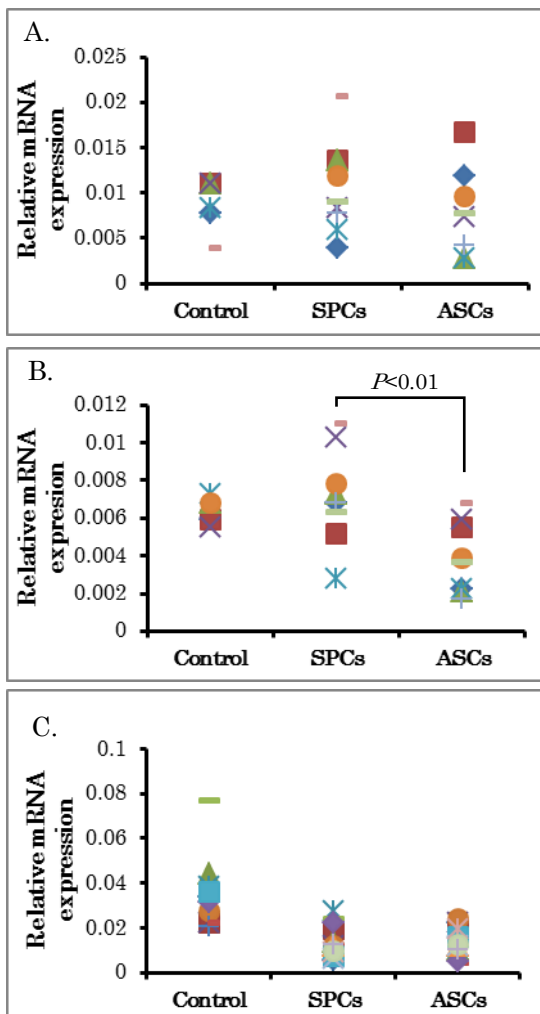


Fig. 8. Administration of ASCs suppresses expression of STAT4 in mice with staphylococcal enterotoxin shock. Relative mRNA expression of T-bet (A), STAT4 (B) and Foxp3 (C) in the spleen was determined by quantitative real time PCR normalizing with mRNA of GADPH. Control indicates mRNA expression in normal mice.

## 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)

Kubo N, Narumi S, Kijima H, Mizukami H, Yagihashi S, Hakamada K, Nakane A. Efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for fulminant hepatitis in mice induced by Concanavalin A. *J. Gastroenterol Hepatol.* 27(1):165-172, 2012. 査読あり

DOI. 10.1111/j.1440-1746.2011.06798x

[学会発表] (計1件)

Kubo N, Nakane A, et al. Efficacy of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Fulminant Hepatitis in Mice Induced by Concanavalin A. *Digestive Disease Week 2011*, 2011年5月7日, McCormick Place (Chicago, USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bact.hirosaki-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中根 明夫 (NAKANE AKIO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 30164239

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号:

### (3) 連携研究者

浅野 クリスナ (ASANO KRISANA)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 70598622