

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19591

研究課題名(和文)肺炎球菌感染症に対する間葉系幹細胞を用いた新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Anti-inflammatory roles of mesenchymal stem cells during acute Streptococcus pneumoniae pulmonary infection in mice

研究代表者

浅見 貴弘 (TAKAHIRO, ASAMI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50623865

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)：肺炎球菌肺炎におけるMSCsの抗炎症作用としての役割について検討した。骨髄由来マクロファージにおいては、MSC培養上清添加し、TLR2,9,4リガンドの刺激により、炎症性サイトカインの抑制、抗炎症性サイトカインの上昇がみられた。肺炎球菌感染モデルマウスにおいては、MSC投与により気管支肺胞洗浄液、肺において好中球数、炎症性サイトカイン、肺炎球菌の菌量等の抑制がみられた。以上によりMSCsは肺炎球菌肺炎において治療介入となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to investigate whether MSCs have an anti-inflammatory protective role in pneumococcal pneumonia. After stimulation with TLR2, TLR9, or TLR4 ligands, TNF-alpha and IL-6 levels were significantly decreased, whereas IL-10 was significantly increased in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) cultured in MSC-conditioned medium. In mice, MSC treatment decreased the number of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) after pneumococcal infection. Levels of proinflammatory cytokines including TNF-alpha, IL-6, GM-CSF, and IFN-gamma were significantly lower in MSC-treated mice, and the bacterial load in the lung after pneumococcal infection was significantly reduced. These results indicate that MSCs could represent a potential therapeutic application for the treatment of pneumonia caused by S. pneumoniae.

研究分野：感染症、呼吸器内科

キーワード：間葉系幹細胞 肺炎球菌肺炎

1. 研究開始当初の背景

(1)肺炎球菌は市中肺炎の起炎菌として分離頻度が最も多い菌の1つであり、しばしば致死性的となり、菌血症を合併した場合の致死率は約20%に及ぶ。(Balakrishnan I et al. J Infect Dis. 2000)。また先行するインフルエンザウイルス感染症に合併する2次性の肺炎球菌などの細菌感染合併例では全世界で毎年25-50万人が死亡すると報告され(WHO fact sheet 2014)、本邦でも平成23年以降、肺炎は全死亡原因の第4位から第3位に上昇している(厚生労働省平成25年人口動態統計)。これらの重症肺炎は、重症化した場合、致死率は高く、その病態の詳細な解明と適切な治療法の確立が急務である。従来の抗菌薬による治療に加え、免疫調節を行うことで、重症細菌性肺炎の予後が改善する可能性が指摘されており、新たな治療ターゲットとして注目されている(Mattila JT et al. Ann Am Thorac Soc. 2014)

(2)間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell、MSC)は①一般的な培養条件でプラスチックディッシュに接着能を有する。②CD73/CD90/CD105を発現し、CD45/CD34/CD14/CD11b/CD79 α /CD19を発現しない。③脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞への分化能をもつ。の3つを満たすものと定義されている。MSCは従来多分化能を有し種々の細胞に分化し傷害された組織を修復する組織修復細胞として研究されてきたが、近年MSCが産生する液性因子や、MSCと他の細胞間相互作用を介して、免疫調整作用、特に抗炎症作用を有することが報告され(Cardenes N et al. Respiration 2013)、MSCを用いた敗血症モデルや、ブレオマイシン誘導肺線維症モデル、LPSによる肺障害モデルなど動物実験にて種々の炎症性疾患に対する細胞治療の効果が注目されている(Uccelli A et al. Nat Rev Immunol. 2008)。最近では、慢性閉塞性肺疾患 COPD では臨床試験も行われている(Weiss DJ et al. Chest, 2013)。

申請者らは、最近インフルエンザウイルス感染におけるMSCの産生する液性因子の病態に及ぼす効果を検討する目的で、インフルエンザ感染において重要な役割を有するマクロファージに着目し、インフルエンザウイルス感染におけるウイルス応答に重要なTLR7/8リガンドを用いてMSCの産生するPGE2を介する免疫調整作用のメカニズムに関して報告した(Asami T et al. Mediators Inflamm, 2013)。TLR7/8刺激において、MSCの産生するPGE2はERK経路の増強を介してIL-10の発現を増加させ、一方でNF- κ B経路を抑制してTNF- α の発現を低下させ、MSCがインフルエンザ感染においても免疫を調整する作用を有することを示した。

(3)上述の様に重症肺炎に対して、既存の抗菌薬に加え、免疫調整作用を有する新たな治療法の検討が注目され、ARDSやCOPDや敗血症などではMSCの細胞治療の可能性が報告さ

れている。一方、肺炎の起炎菌として最上位を占める肺炎球菌性肺炎に対する間葉系幹細胞(MSC)による細胞治療はこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、肺炎球菌性肺炎におけるMSCの投与効果を詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

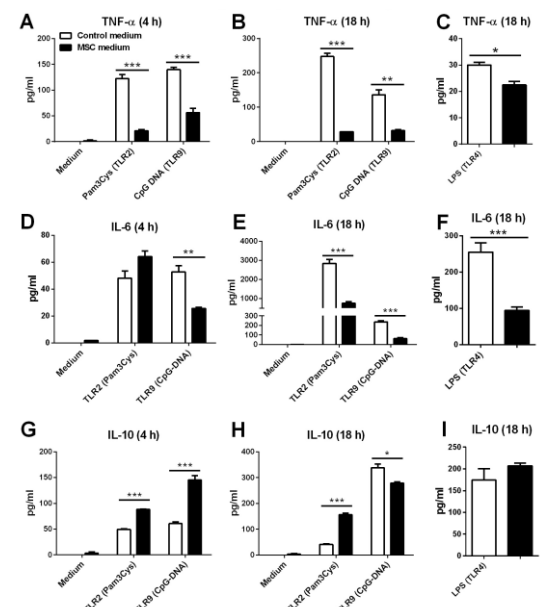
(1)マウスMSCの培養上清あるいは対照培地をマウス骨髄由来マクロファージの培地として添加した後、Toll-like

receptor (TLR)1/2, 4および9リガンドで刺激し培養上清のサイトカイン産生を検討する。

(2)雄性8-10週齢C57BL/6マウスに臨床分離株のペニシリン感受性肺炎球菌(血清型6C) 1×10^6 CFUを経鼻投与し肺炎球菌感染マウスを作成し、マウス間葉系幹細胞(1匹あたり 1×10^6 個)またはPBS(対照群)を静脈投与した。生存率、血清・気管支肺胞洗浄液・肺組織におけるサイトカインの産生量、肺内の菌量、肺病理組織、肺組織における各種免疫担当細胞数等の各種パラメータのMSC投与による変化を検討する。

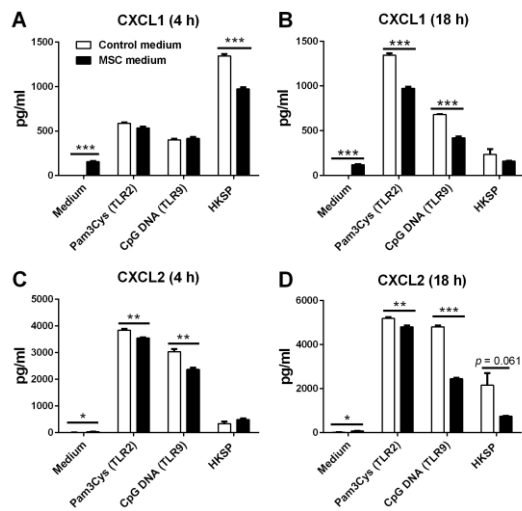
4. 研究成果

(1)肺炎球菌感染に関連する、Toll様受容体(TLR2, TLR9, TLR4)リガンドによる刺激で生じるマクロファージにおけるサイトカインの産生が、MSCの産生する液性因子により調整されると考えた。マウス骨髄由来マクロファージの培地として、マウスMSCの培養上清または対照培地を使用し、TLR2 (Pam3Cys)、TLR9 (CpG-DNA)、あるいはTLR4 (LPS)で刺激した。TNF- α およびIL-6の産生は、MSC培養上清を培地とした群で有意に減少し、TLR2 (Pam3Cys)、TLR9 (CpG-DNA)の刺激では、IL-10の産生がMSC培養上清を培地とした群で有意に上昇した。

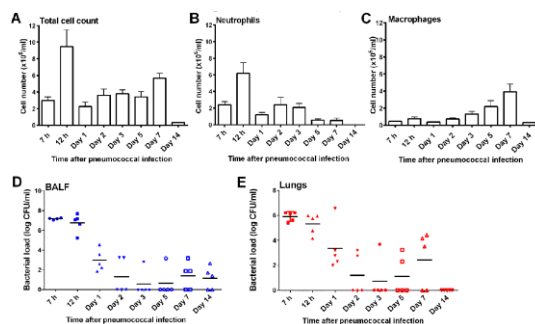


(2)次に、MSC培養上清あるいは対照培地で、マウス骨髄由来マクロファージを培養し、

TLR2、TLR9 および HKSP (heat-killed *Streptococcus pneumoniae*) で刺激し、好中球遊走因子である、CXCL1 および CXCL2 の産生を測定した。MSC 培養上清を培地とした群では、CXCL1 および CXCL2 の産生がいずれも有意に減少した。

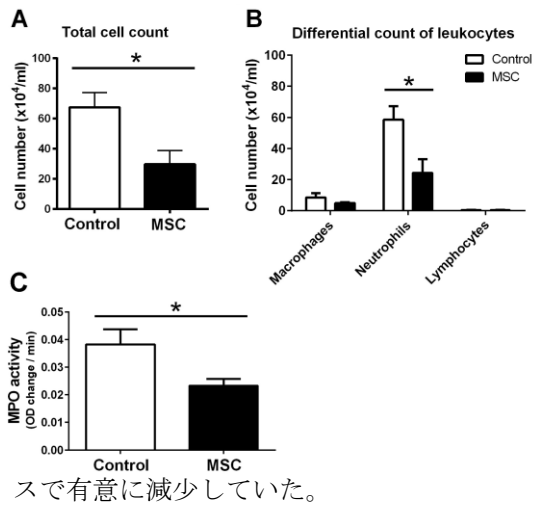


(3) 雄性 8-10 週齢 C57BL/6 マウスの肺炎球菌感染後の気管支肺胞洗浄液の総細胞数および細胞分画について検討した。自然経過においては、総細胞数は肺炎球菌感染後 12 時間後と、7 日後の 2 回のピークがあった。12 時間後は好中球、7 日後はマクロファージの上昇がピークに関連していた。好中球数は肺炎球菌感染後に 12 時間後にピークとなりその後は感染 14 日後まで徐々に減少する。マクロファージは感染 7 日後をピークに徐々に上昇する。気管支肺胞洗浄液および肺組織の菌量は、肺炎球菌感染 7 時間後と 12 時間後にピークとなり、気管支肺胞洗浄液では感染 14 日後まで検出できた。

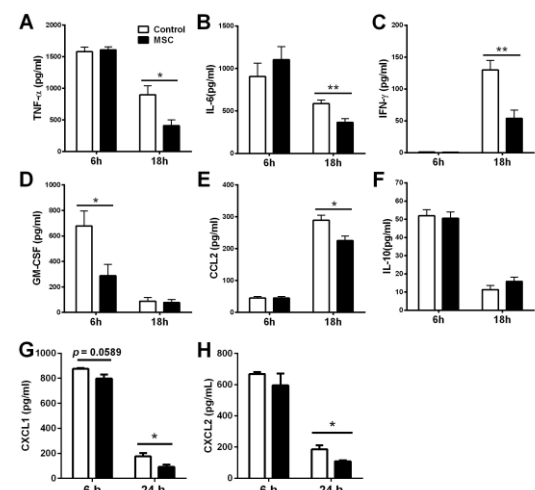


(4) 雄性 8-10 週齢 C57BL/6 マウスに肺炎球菌を経鼻で 1×10^7 cfu 感染させ、引き続き経静脈的に MSC を投与し、気管支肺胞洗浄液の総細胞数、マクロファージ数、好中球数、リンパ球数を感染 24 時間後に測定した。経静脈的に MSC を投与した群では、コントロールに比較し、有意に総細胞数、好中球数が減少した。一方、マクロファージとリンパ球は、コントロールと差はなかった。MSC 投与群のマウスで有意に好中球数が抑

制されたことから、MSC を経静脈的に投与したマウスおよびコントロールマウスの全肺のミエロペルオキシダーゼ活性を測定した。ミエロペルオキシダーゼ活性は MSC 投与マウ

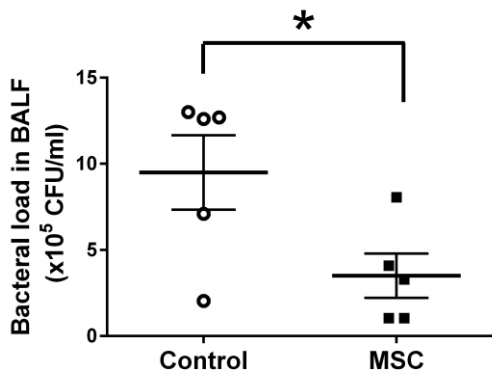


(5) 肺炎球菌感染時の気管支肺胞洗浄液において、サイトカインの分泌で MSC の効果を評価した。雄性 8-10 週齢 C57BL/6 マウスに肺炎球菌を経鼻で 1×10^7 cfu 投与し、6 時間後および 18 時間後の気管支肺胞洗浄液中のサイトカインを評価した。感染 18 時間後における、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、CCL2、および感染 6 時間後における GM-CSF は、コントロール群に比較し MSC 投与群では有意に気管支肺胞洗浄液中において減少していた。IL-10 については、MSC 投与群とコントロール群では差はみられなかった。さらに、CXCL1 および CXCL2 は 24 時間後において、MSC 投与群の気管支洗浄液において有意に低下してい

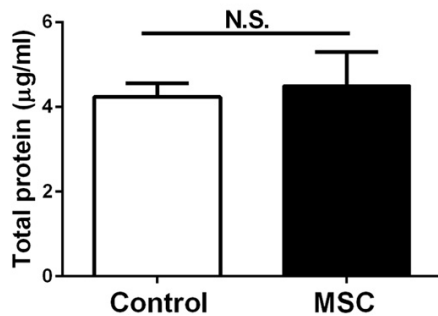


た。これらは好中球数の減少と関連している。

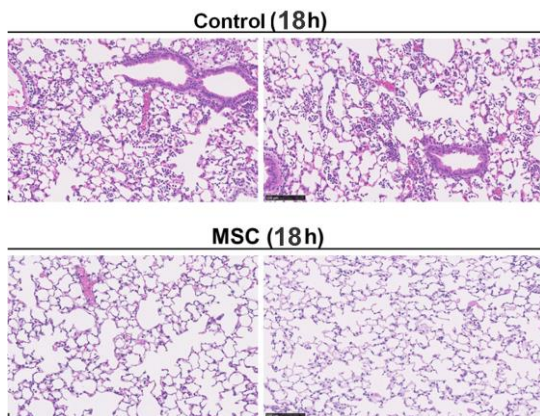
(6) 雄性 8-10 週齢 C57BL/6 マウスに肺炎球菌を経鼻で 1×10^7 cfu 投与し、感染 24 時間後の菌量を評価した。24 時間後の菌量は有意に経静脈的に MSCs を投与したマウス群で減少していた。



(7) 肺胞毛細血管壁の透過性の評価のために、気管支肺胞洗浄液の蛋白濃度を測定したが、肺炎球菌経鼻感染後の MSC 投与マウスと、コントロールマウスで差はみられなかった。



(8) 雄性 8-10 週齢 C57BL/6 マウスに肺炎球菌を経鼻で 1×10^7 cfu 投与し、感染 18 時間後肺組織を評価した。炎症細胞の浸潤は MSC 投与群で少なくなっていたが、一方肺水腫の程度の差はみられなかった。



(9) 肺炎球菌感染後の気管支肺胞洗浄液における、細菌感染により上昇し、菌の代謝や増殖に影響するとされる Lipocalin2 には、MSC 投与群と、コントロール群で差はみられなかった。

(10) 以上より、マウスモデルにおける肺炎球菌感染において、MSC は液性因子により、炎症性サイトカインの抑制あるいは非炎症性サイトカインを増加させ、また好中球炎症を抑制することが示唆された。

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 0 件)
 〔学会発表〕 (計 0 件)
 〔図書〕 (計 0 件)
 〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし
 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)

なし
 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
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅見 貴弘 (ASAMI, Takahiro)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：50623865

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()