

令和元年6月27日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19463

研究課題名(和文) 肺線維症に対する間葉系幹細胞療法の試み-新規マウスモデルによる検討

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cell therapy for pulmonary fibrosis in new mouse model of pulmonary fibrosis

研究代表者

熊本 牧子 (Kumamoto, Makiko)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10623522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：プレオマイシン肺線維症モデルにおいて、脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を投与することで線維化の軽減が認められた。また、IPF患者の肺線維芽細胞を移入した新規肺線維症マウスモデルにおいても、同様の効果を得ることができた。ASCとIPF患者由来の肺線維芽細胞を共培養することで、肺線維芽細胞における線維化マーカーの遺伝子発現が低下することが確認できた。そのメカニズムとして、ASCから放出されるHGFが関与していることを確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症(IPF)には未だ有効な治療手段がなく、新規治療法の開発は急務である。筆者らはプレオマイシン(BLM)肺線維症モデルにおいて骨髄由来間葉系幹細胞の有効性はすでに報告しているが、今回、骨髄由来に比べて低侵襲で確保が容易な脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)の線維化抑制効果について証明した。また、IPF患者由来の線維芽細胞を移入することで作成される、よりIPFの病態に近い新規肺線維症マウスモデルにおいても、ASCの効果を証明した。これらの結果は、IPFに対する間葉系幹細胞の臨床応用に向けて、さらに前進させたと思う。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived mesenchymal stem cells(ASC) ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. In addition, ASCs were also effective in new pulmonary fibrosis model in mice. In this new model, pulmonary fibrosis was initiated by the intravenous introduction of primary human fibroblast lines into immunodeficient mice. The decrease of the expression of fibrotic markers in fibroblasts derived from IPF patient's lung was detected by co-culture with ASC. Hepatocyte growth factor(HGF) produced from ASC is important for this effect.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 脂肪由来間葉系幹細胞 新規肺線維症マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は慢性かつ進行性に肺の線維化が起こり、平均生存率は5年以下と予後不良な疾患である。ステロイドや免疫抑制剤の効果は乏しく、最近開発されたNintedanibやPirfenidoneといった抗線維化薬の効果も限定的であり、確立された有効な治療手段がないのが現状である。そのため、新規治療法の確立は急務である。我々は、間葉系幹細胞の損傷組織の修復能に着目し、プレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルにおいて骨髄間葉系幹細胞の有効性を明らかにした (*Eur Respir J*, 34: 740, 2009)。間葉系幹細胞は脂肪組織にも存在することが知られている。脂肪からの間葉系幹細胞の採取は骨髄と比較して低侵襲性であり、また脂肪は骨髄液に比べてはるかに多くの組織量を確保でき、幹細胞も高頻度に存在することからヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) は臨床応用により有望と考えられている (*World J Stem Cells*, 6:312-21, 2014)。これまでに、ASCによる細胞療法が心筋再生や軟部組織修復などの分野で試みられており、その有効性が報告されている (*Stem Cells*, 27: 230, 2009)。我々はASCによる細胞療法が肺線維症に対する有効な治療法として臨床応用できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

特発性肺線維症 (IPF) には未だ有効な治療手段がなく、新規治療法の開発は急務である。我々はプレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルにおいて骨髄由来間葉系幹細胞の有効性を明らかにしてきた。本研究では低侵襲で確保が容易なヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) の線維化抑制効果について検証し、その抗線維化のメカニズムを解明する。ASCは抗炎症作用を持つことから、BLM肺線維症モデルよりも炎症が少なく、よりIPFの病態を反映した動物モデルでASCの抗線維化作用を検証する必要がある。我々はIPF患者由来の肺線維芽細胞をマウスに移入する新規肺線維症モデルを確立した。このモデルを用いてASCの抗線維化作用を検討し、ASCをIPF治療の臨床応用へと展開するための基盤とする。

### 3. 研究の方法

肺線維症 (IPF) 患者由来の肺線維芽細胞 (Fb) を用いた新規病態モデルにより、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) の治療効果とその分子機序を解明するために下記の検討を行う。

Fb移入による新規モデルの病態を解析し、病態・治療評価の項目を決定する

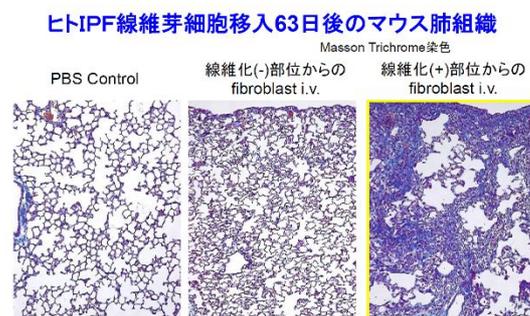
IPF患者の線維化領域と非線維化領域のFbの増殖性、遺伝子発現の比較から、線維化の原因となる遺伝子を同定する

とを基にASCの治療効果とその分子メカニズムを検討する

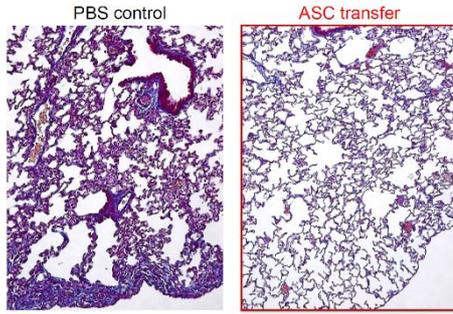
### 4. 研究成果

1) 現在まで、27人のIPF患者さんから肺組織を提供いただき、それぞれの線維化部位、及び非線維化部位からの肺線維芽細胞を培養し、冷凍ストックできている。それぞれの線維芽細胞をSCID-beigeマウスの尾静脈より移入することで、個体差はあるものの、マウス肺に線維化を起こすことに成功している。

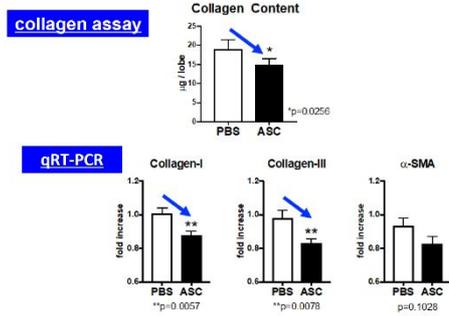
2) ヒトIPF由来肺線維芽細胞の移入によって作成した新規肺線維症マウスモデルにASCを投与したところ、抗線維化効果が得られた。



ASCは新規肺線維症マウスモデルで線維化を改善する②



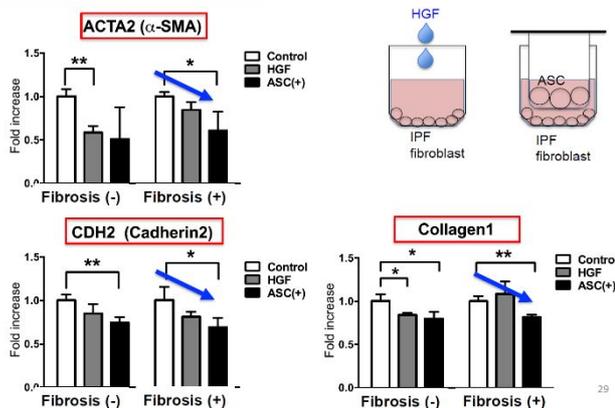
ASCは新規肺線維症マウスモデルで線維化を改善する③



3)ASC とヒト IPF 患者由来の肺線維芽細胞を cell-cell contact しない状況で共培養したところ、ヒト IPF 患者由来肺線維芽細胞における線維化に関与する遺伝子発現の低下が認められた。この結果から、ASC の肺線維芽細胞に対する間接的な作用が示唆された。先行論文からは、ASC から放出されるサイトカインやエクソソームが作用しているという報告があるが、この中でも ASC から放出される HGF に着目して実験を進めた。筆者らが使用した ASC の培養上清からも、HGF が豊富に含まれていることを見出した。HGF は上皮間葉変換の阻害作用などで、線維化の軽減を促すとされている。そこで、ヒト IPF 由来肺線維芽細胞に HGF のみを投与した場合と、ASC と共培養した場合を比較した。結果、両者ともコントロールと比較して線維化に関与する因子の発現が低下していたが、その効果は ASC との共培養にて、より顕著であった。このことから、ASC の抗線維化作用には HGF 以外の因子も関わっていることが示唆された。

IPF患者由来fibroblastに対するASCsおよびHGFの作用

qRT-PCR (Lung fibroblast)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

熊本 牧子、肺線維症に対する脂肪由来間葉系幹細胞治療の試み—新規マウスモデルによる検討、第16回日本再生医療学会総会、2017

〔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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。