

平成30年6月28日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19470

研究課題名(和文) 脂肪組織由来幹細胞を用いた間質性肺炎に対する新規治療法のモデルマウスにおける研究

研究課題名(英文) Adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced interstitial pneumonia

研究代表者

小谷 卓矢 (Kotani, Takuya)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：80411362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来間葉系幹細胞(以下AdSC)をブレオマイシン誘発間質性肺炎モデルマウスに移植しその治療効果を検討した。その結果、AdSCは細胞数依存性に肺炎症と線維化を抑止し、生存率を改善させた。また、AdSCは細胞数依存性に活性化マクロファージをアポトーシスに誘導し、活性化マクロファージが合成する炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-12)の遺伝子発現を抑制した。更に、AdSCはTh2型T細胞の分化増殖を抑制し、制御性T細胞の分化増殖を促進する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (AdSCs) have recently been considered a useful treatment tool for autoimmune disease because of their anti-inflammatory and immunosuppressive effects. We investigated the therapeutic effect of intravenous AdSC transplantation in a mouse model of bleomycin-induced lung injury. AdSCs inhibited both inflammation and fibrosis in the lung, markedly improving the survival rate of mice in a cell number-dependent manner. AdSCs inhibited the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-12 in activated macrophages by inducing apoptosis. AdSCs inhibited the differentiation and proliferation of Th2-type mCD4+ T cells but promoted the differentiation and proliferation of regulatory T cells, suggesting that the phenotypic conversion of T cells may be one of the mechanisms for the anti-inflammatory effect of AdSCs on pulmonary fibrosis. These findings suggest that intravenous AdSCs could be a promising treatment for patients with interstitial pneumonia.

研究分野：呼吸器、膠原病

キーワード：脂肪幹細胞 間質性肺炎 膠原病

### 1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎(以下 IP)は、進行すると呼吸不全を来し生命に関わる重篤な病態である。進行性の IP には、炎症を抑制する目的でステロイドやカルシニューリン阻害剤、シクロフォスファミドなどによる免疫抑制療法や抗繊維化薬が用いられるが、治療抵抗性、進行性で予後不良な症例も未だに多い。さらに、免疫抑制療法の結果生じる感染症などの副作用も問題となる。IP に対して、効果と副作用の観点から、より優れた治療を開発することが求められている。

近年、骨髄を初めとして皮膚・骨格筋・胎盤・臍帯血・脂肪組織などの体性組織に由来する間葉系幹細胞(以下 MSCs)が再生医療分野で盛んに研究されている。MSCs は、骨格筋細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・血管内皮細胞・平滑筋細胞・心筋細胞など他系統細胞への多分化能を有することが明らかにされ、臨床応用を目指した細胞移植治療研究が行われつつある。MSCs には抗アポトーシス作用、抗炎症作用、抗線維化作用があり、自己免疫性疾患に対する有効性が期待されている。MSCs は HLA class I, II の発現が少ないので、allogeneic に移植でき、MSCs の経静脈投与は大きな免疫拒絶反応の少ない事が示されている。これまでに、ブレオマイシン(以下 BLM)を経気道投与して作成した肺障害動物モデルにおいて、骨髄由来 MSCs の全身投与により、MSCs が肺の実質や気道に集積し、肺の炎症細胞の浸潤と線維化を減らすことが報告されている。

MSCs の中でも脂肪組織由来幹細胞(以下 AdSCs)は脂肪吸引で簡単に得ることができ、骨髄と比較して同量の体積あたりに得られる細胞数が非常に多い点で優れている。AdSCs においても、組織片対宿主病、クローン病、Goodpasture 症候群などで免疫抑制療法として開発研究が進められており、有望な結果が報告されている。

BLMを経気道投与して作成した IPモデルにおいて、ヒト AdSCs を複数回腹腔内投与する事により、肺の炎症細胞浸潤及び肺の線維化を抑制したとする報告がある。しかし、BLM誘発 IPモデルマウスにおける AdSCs の経静脈投与の治療効果、AdSCs の肺組織への集積、有効な細胞数、有効性のメカニズムは未だ検討されていない。

一般的に動物実験では、BLM を経気道的に吸入させる事により間質性肺炎モデルを作成する。しかし、経気道投与では肺病理組織において肺葉細気管支周囲に病変が focal に形成され、胸膜側にびまん性に病変を呈する IP とはそぐわない点がある。そこで、C57BL/6 マウス(B6 マウス)に Alzet mini-osmotic pump を用いて BLM の持続皮下注入を行い、胸膜側を中心にびまん性に IP 病変を呈するモデルを用いることにした。

### 2. 研究の目的

Osmotic mini pump を用いた BLM の持続皮下注入により作成した IP マウスモデルにおいて、AdSCs の有効性及び炎症細胞抑制におけるメカニズムを検討した。

### 3. 研究の方法

IP モデルマウスの作成: 13 週齢の C57BL/6 (B6) 雌マウスの後背部皮下にブレオマイシン(BLM)  $30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度で  $100 \mu\text{l}$  を Osmotic pump を用いて 1 週間持続皮下注入し、4 週間飼育することにより IP モデルマウスを作成した。

mAdSCs の採取: 13 週齢の B6 マウスの皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理にて mAdSCs を分離した。P3 まで継代培養した mAdSCs を、BLM 持続皮下注入開始後 1 週間のタイミングで尾静脈より移入した。BLM 投与開始 2, 4 週の時点でマウス肺を摘出し、病理学的、また免疫染色、real-time RT-PCR 解析の手法を用い、mAdSCs の炎症・線維化に対する効果の評価を総合的に行った。

A: 治療群: ①mAdSCs 移入群 ( $2.5 \times 10^4$  個,  $2.5 \times 10^5$  個の2群)、②BLM 単独投与 (control) 群の計3群を比較検討群として設定した。

B: 肺病理評価: HE 染色による形態評価、マッソントリクローム染色による線維化の定量評価を行った。

C: 肺組織から mRNA を抽出し逆転写反応により cDNA を精製した。炎症性サイトカインと線維化に関する因子の遺伝子発現を real-time RT-PCR 法にて解析し、定量評価した。

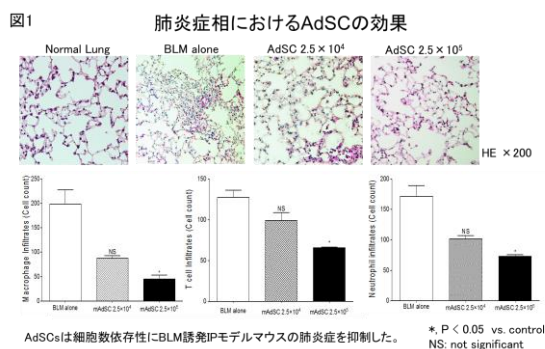
D: マウス由来の CD4 陽性 T 細胞、活性化マクロファージと mAdSCs を共培養し、mAdSCs の各炎症細胞に及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

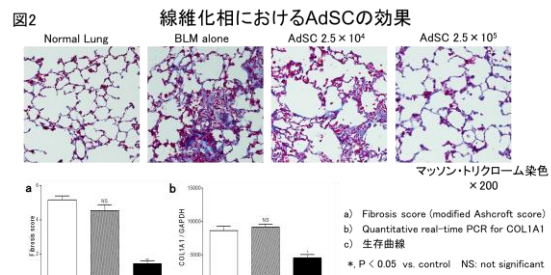
BLM 誘発 IP マウスに mAdSCs を尾静脈より移入したところ、肺血管ではなく肺間質への mAdSCs の集積を認めた。

BLM 単独群 (mAdSCs 移植無し) は BLM 投与開始4週間の生存率が 33% (9 匹中 6 匹死亡)であったのに対し、mAdSC 移植群は mAdSC の移植細胞数が多いほど予後が良い結果であった。

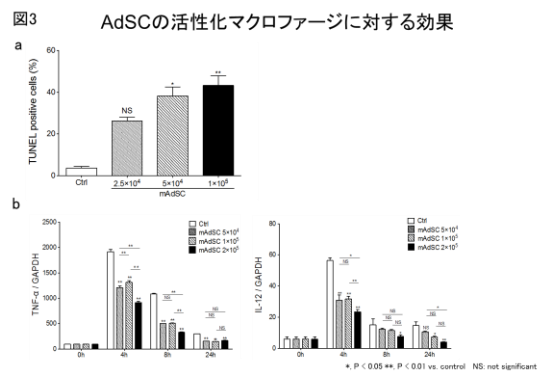
mAdSCs は細胞数依存性に BLM 誘発 IP モデルマウスの肺炎症を抑制した (図 1)。



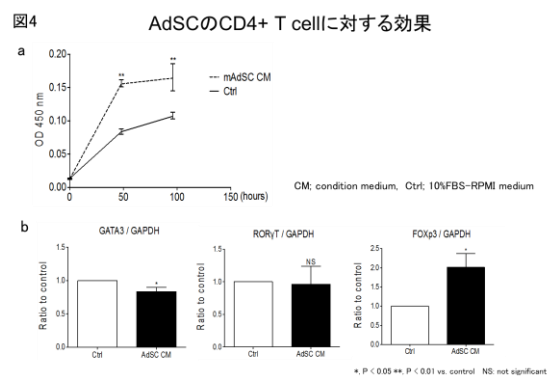
また、mAdSCs は細胞数依存性に BLM 誘発 IP モデルマウスの線維化を抑制した (図 2)。



チオグリコレート (4%) を B6 マウスに腹腔内投与し得られた活性化マクロファージと mAdSC を共培養し、mAdSC が活性化マクロファージに及ぼす影響を検討した。その結果、mAdSC は活性化マクロファージに対してアポトーシスを誘導し (図 3a)、また活性化マクロファージの TNF, IL-12 の遺伝子発現を抑制した (図 3b)。



マウス胸腺から CD4 陽性 T 細胞を分離し、増殖試験を施行した。その結果、mAdSCs のコンディショニング培養液は、コントロールと比較して CD4 陽性 T 細胞の増殖を促進した (図 4a)。また、mAdSCs のコンディショニング培養液は、コントロールと比較して 2 型 CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現を抑制し、制御性 T 細胞の遺伝子発現を促進した (図 4b)。



## 結果のサマリー

・肺にびまん性に病変を呈するブレオマイシン誘発 IP モデルマウスにおいて、mAdSCs の経静脈移植は、mAdSCs が肺間質に集積し、炎症と線維化を抑制することにより生存率を向上させた。

・mAdSCs は、活性化マクロファージに対してアポトーシスを誘導した。また、mAdSCs はマクロファージの TNF, IL-12 の遺伝子発現を抑制した。

・mAdSCs は 2 型 CD4 陽性 T 細胞の分化増殖を抑制し、制御性 T 細胞の分化増殖を促進した。

## 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 1 件)

Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of intravenous adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced interstitial pneumonia. Kotani T, Masutani R, Suzuka T, Oda K, Makino S, Ii M. *Sci Rep* 6; 7 (1): 14608, 2017.

[学会発表] (計 2 件)

1. 脂肪組織由来幹細胞の静脈投与はブレオマイシン誘発肺障害マウスの肺炎症と線維化を細胞数依存性に抑制する. 小谷卓矢、伊井正明. 第 16 回日本再生医療学会総会. 2017 年.

2. 脂肪組織由来幹細胞を用いた間質性肺炎に対する新規治療のモデルマウスにおける研究. 小谷卓矢、鈴鹿隆保、小田勝大、武内徹、槇野茂樹、荒若繁樹. 第 62 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2018 年.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[https://www.osaka-med.ac.jp/deps/in1/coll/research/translational\\_research.html](https://www.osaka-med.ac.jp/deps/in1/coll/research/translational_research.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 卓矢 (Takuya Kotani)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80411362

(4) 研究協力者

伊井 正明 (Masaaki Ii)  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10442922