

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04181

研究課題名(和文) 肺血管内皮細胞由来の間葉系幹細胞を用いた難治性呼吸器疾患の治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategies for intractable respiratory diseases through mesenchymal stem cells derived from pulmonary vascular endothelial cells

研究代表者

巽 浩一郎 (TATSUMI, KOICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10207061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺血管内皮細胞(PVECs)の機能はARDSにおいては重要なpro-inflammatoryサイトカインなどの放出源となっており、PVECsレベルでの炎症機転の改善は一つの有力な治療戦略となりうる。DPP-4阻害薬は糖尿病治療薬として広く使用されており、抗炎症効果を有しているとされている。しかし、DPP-4阻害薬がPVECs機能さらにはARDSに対する抗炎症効果をもたらすかどうかは明らかでない。そこでマウスにおけるLPS誘導性肺損傷、またin vitroにおいてはヒトPVECsを使用して、臨床で広く使用されているDPP-4阻害薬であるsitagliptinの効果を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性呼吸器疾患に対する新規治療戦略の開拓のターゲットとして、ARDSにおける肺血管内皮細胞の役割に注目している。ARDSに対する有効な治療方法は確立しておらず、何らかの新規治療戦略が必要である。ARDS初期の過剰な炎症反応を抑制する一つの分子が多くの細胞表面に発現しているCD26と考えている。このCD26の発現上昇は過剰な炎症に繋がらう。そこでCD26活性を抑制するDPP4阻害薬であるシタグリプチンにARDS抗炎症作用があるかどうかを、マウスモデルおよびヒト肺細胞を使用して研究した。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary vascular endothelial cells (PVECs) function as an important pro-inflammatory source in ARDS, suggesting that modulation of inflammatory events at the endothelial level may have a therapeutic benefit. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitors have been reported to have possible anti-inflammatory effects. However, the potential anti-inflammatory effects of DPP4 inhibition on PVEC function and ARDS pathophysiology are unknown. Therefore, we evaluated the effects of sitagliptin, a DPP4 inhibitor in wide clinical use, on LPS-induced lung injury in mice and in human lung ECs in vitro. In summary, sitagliptin attenuates LPS-induced lung injury in mice and exerts anti-inflammatory effects on HLMVECs. These novel observations indicate DPP4 inhibitors may have potential as therapeutic drugs for ARDS.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺血管内皮細胞 ARDS CD26 DPP4 LPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ARDS は急性呼吸不全を呈する臨床的概念であり、異常な炎症を伴っている。肺血管内皮細胞 (PVECs) の機能は ARDS においては重要な pro-inflammatory サイトカインなどの放出源となっており、PVECs レベルでの炎症機転の改善は一つの有力な治療戦略となりうる。Dipeptidyl peptidase (DPP)-4 阻害薬は糖尿病治療薬として広く使用されており、抗炎症効果を有しているとされている。しかし、DPP-4 阻害薬が PVECs 機能さらには ARDS に対する抗炎症効果をもたらすかどうかは明らかでない。

2. 研究の目的

In vivo はマウスにおける LPS 誘導性肺損傷、また in vitro においてはヒト PVECs を使用して、臨床で広く使用されている DPP-4 阻害薬である sitagliptin の抗炎症効果を検討した。

3. 研究の方法

In vivo はマウスにおける LPS 誘導性肺損傷、また in vitro においてはマウス肺血管内皮細胞 (ECs) および上皮細胞、ヒト HLMVECs、HPAECs を使用して研究成果に示す検討を施行した。

4. 研究成果

(1) Sitagliptin はマウスにおける LPS 誘導性肺障害を抑制した

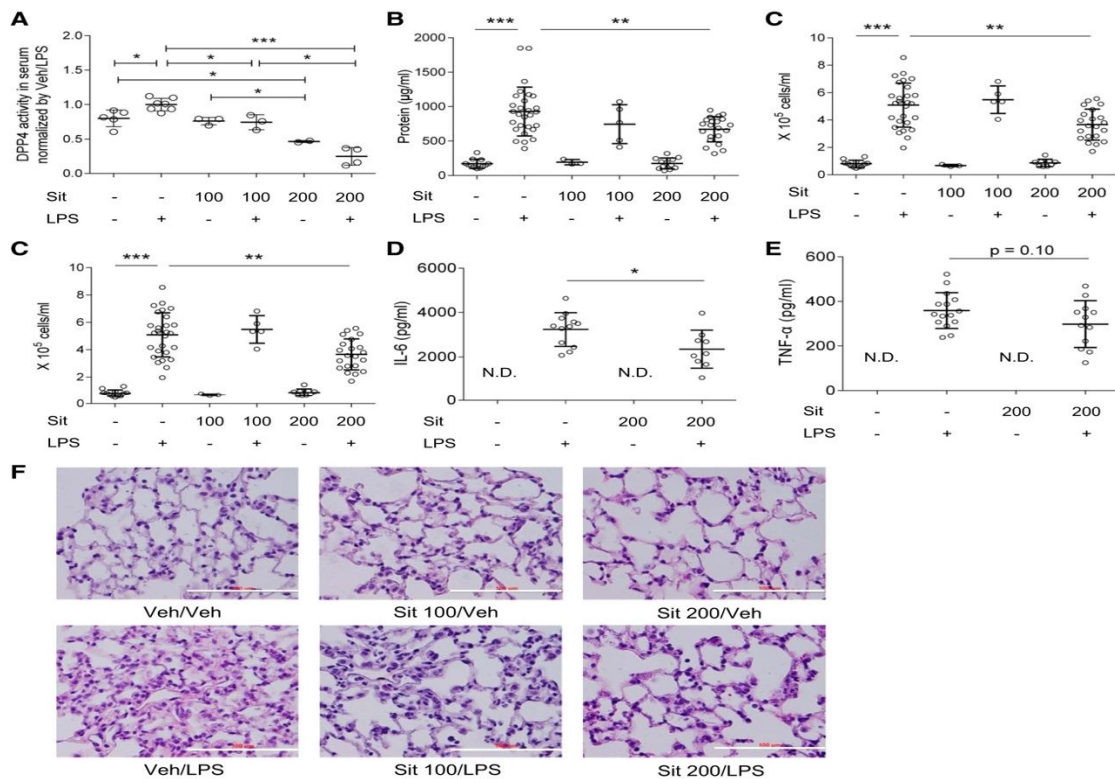


図1. マウスに LPS 投与 1 時間前に sitagliptin (100 or 200 mg/kg ip) を投与した。BAL および血漿は LPS 投与 18 時間後に採取した。DPP4 活性を血漿で測定、肺透過性は BAL タンパク濃度で評価した。LPS 投与で BAL のタンパク濃度は上昇、sitagliptin (200 mg/kg ip) はこの上昇を抑制した。肺の炎症は BAL の総細胞数および IL-6 および TNF レベルで評価した。LPS 投与にてこれらの指標は増加したが、sitagliptin に低下した。代表的な肺組織 HE 染色では、LPS は浮腫、好中球浸潤、肺組織の破壊を起こしていたが、sitagliptin 投与によりこれらの変化は抑制された。

(2) マウス肺血管内皮細胞 (ECs) および上皮細胞における CD26/DPP4 の発現レベルは LPS 投与により低下し、Sitagliptin により一部回復する

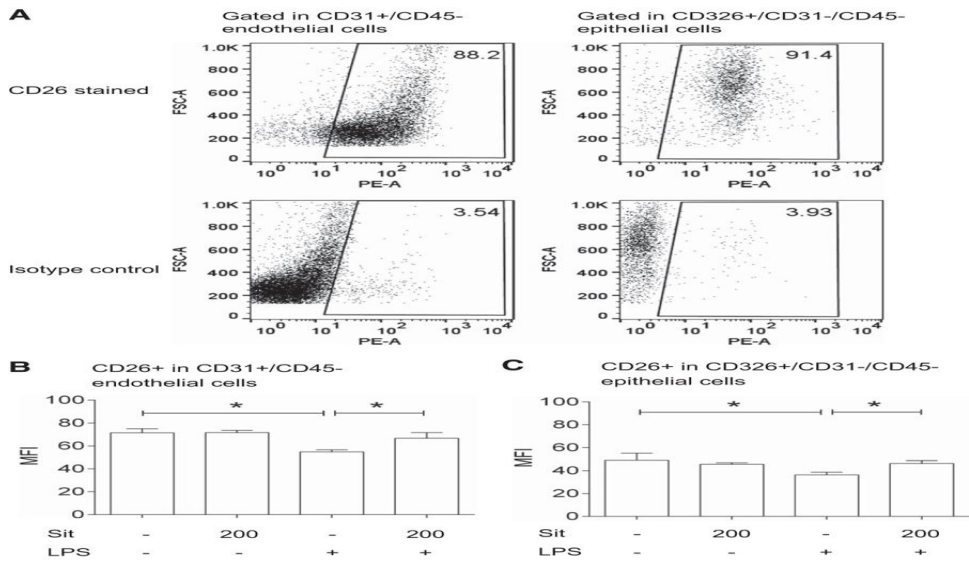


図2. マウスはLPS投与1時間前にSitagliptin (100 or 200 mg/kg) ないしはvehicleの投与を受けた。LPS投与18時間後に肺を摘出してフローサイトメトリーで解析した。A. CD26/DPP4でgatingした場合の代表的結果を示す。CD26/DPP4は~90%のCD31+/CD45-マウス肺血管内皮細胞(ECs)、CD326+/CD31-/CD45-マウス肺上皮細胞の表面に発現していた。B, C. CD26/DPP4の発現をフローサイトメトリーを使用してmean fluorescence intensity (MFI)で評価した。LPS投与でCD26/DPP4の発現は低下、Sitagliptin投与で一部回復が認められた。

(3) HLMVECsはHPAECsよりも高いレベルの細胞表面CD26/DPP4レベルを有している

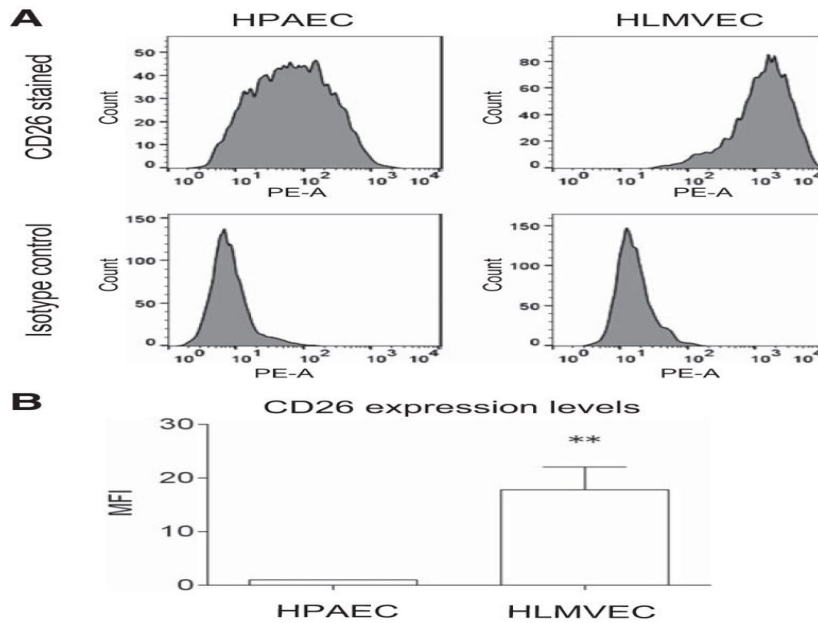


図3. A. HPAECsとHLMVECsのCD26/DPP4染色の代表的ヒストグラムを示す。B. 培養細胞HPAECsとHLMVECsのCD26/DPP4発現レベルをフローサイトメトリーを使用してmean fluorescence intensity (MFI)で評価した。HLMVECsのMFIはHPAECsよりも高値を示した。PE-A, phycoerythrin-area

(4) SitagliptinはLPSで刺激されたヒト肺微小血管内皮細胞(HLMVECs)に対して抗炎症効果を有する

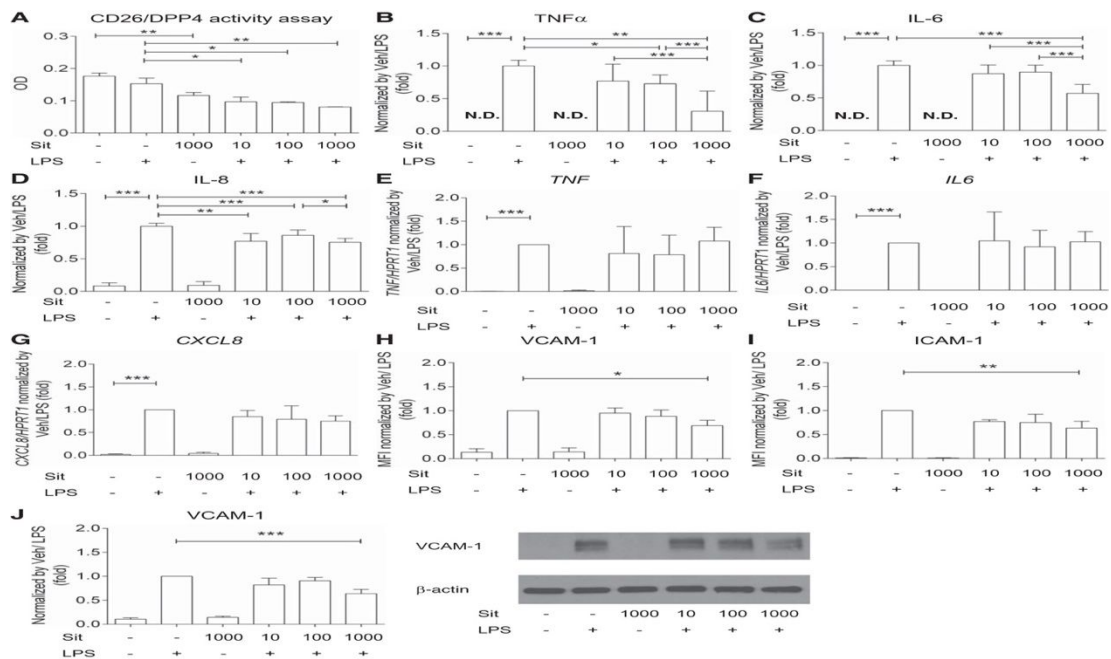


図4. HLMVECsをSitagliptin (10, 100, 1,000 μM)にて1時間培養、その後LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)を添加して4時間培養を施行した。A. cell lysatesをDPP4活性測定のために収集した。Sitagliptinはdose-dependentにDPP4活性を低下させた。次にconditioned mediaにおけるサイトカインレベルをLPS-vehicleを対照としてELISAにて測定した。TNF (B)、IL-6 (C)、IL-8 (D)はLPS投与4時間後に上昇したが、Sitagliptin (10, 100, 1,000 μM)はこれらのサイトカインレベルを低下させた。HLMVECsにおけるTNF (E)、IL-6 (F)、CXCL8 (G) mRNAレベルをLPS-vehicleを対照としてHPRT1に対する相対的PCRにて測定した。これらのmRNAレベルはLPS投与後4時間で増加したが、Sitagliptinはこれらを変化させなかった。HLMVECsのVCAM-1 (H)およびICAM-1 (I)をフローサイトメトリーを使用してmean fluorescence intensity (MFI)で評価した。VCAM-1はcell lysatesのwestern blotで確認した。

(5) LPSおよびSitagliptinはHLMVECsにおけるCD26/DPP4遺伝子およびタンパク発現レベルは変化させない

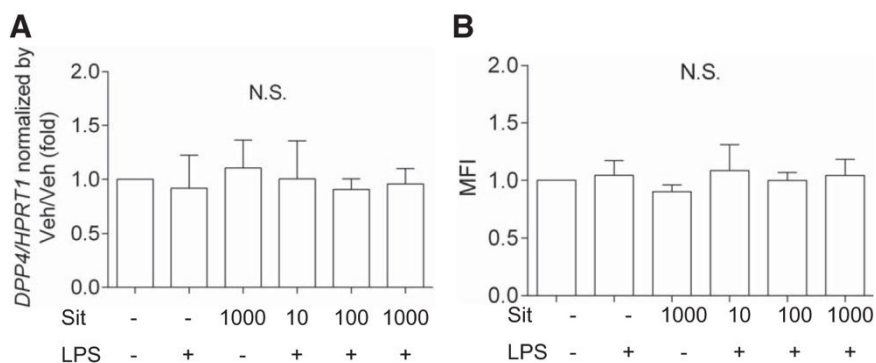


図5. HLMVECsをSitagliptin (10, 100, 1,000 μM)にて1時間培養、その後LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)を添加して4時間培養を施行した。A. HLMVECsの定量的PCRを施行、DPP4 mRNAレベルをHprt mRNAレベルで標準化して、vehicle処置群に対する相対的数値を算出した。DPP4遺伝子レベルはLPSないしはSitagliptin投与にて変化は認められなかった。B. CD26/DPP4タンパクレベルをフローサイトメトリーを使用してmean fluorescence intensity (MFI)で評価した。HLMVECsのMFIはLPSないしはSitagliptin投与にて変化は認められなかった。

(6) Sitagliptin は HLMVECs の増殖を抑制する

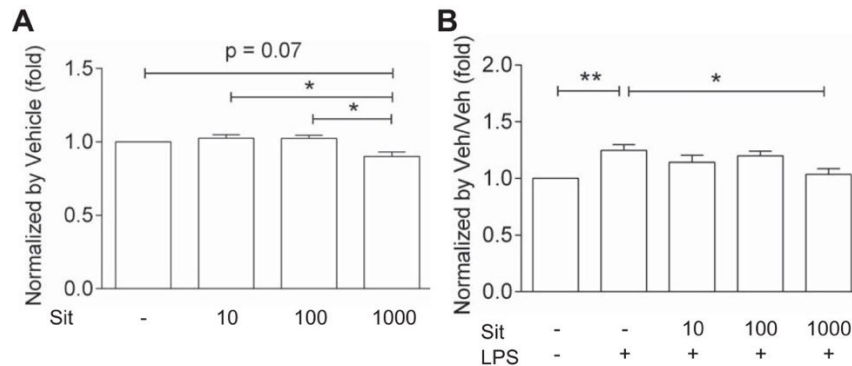


図 6. HLMVECs の数は vehicle ないしは Sitagliptin 投与後 18 時間における WST-8 assay で測定した。A. Sitagliptin (1,000 μM) は HLMVECs の増殖抑制傾向を認めた。B. HLMVECs を Sitagliptin (10, 100, 1,000 μM) にて 1 時間培養、その後 LPS (1 μg/ml) を添加して 18 時間培養を施行した。WST-8 assay の結果、LPS は HLMVECs の増殖を促進したが、Sitagliptin (1,000 μM) はこの増殖を抑制した。

引用文献

1. Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition. *Respir Res.* 2017; 18: 177.
2. Antifibrotic effects of cyclosporine A on TGF-β1-treated lung fibroblasts and lungs from bleomycin-treated mice: role of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB J.* 2017; 31: 3359-3371.
3. Endothelial cell-related autophagic pathways in Sugden/hypoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017; 313: L899-L915.
4. Isolation and characterization endothelial-to-mesenchymal transition-cells in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 314: L118-L126.
5. Kawasaki T, Chen W, Htwe YM, Tatsumi K, Dudek SM. DPP4 inhibition by sitagliptin attenuates LPS-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 315: L834-845.
6. Sanada TJ, Tanabe N, Ishibashi-Ueda H, Ishida K, Naito A, Sakao S, Suda R, Kasai H, Nishimura R, Sugiura T, Shigeta A, Taniguchi Y, Masuda M, Tatsumi K. Involvement of pulmonary arteriopathy in the development and severity of reperfusion pulmonary endarterectomy. *Pulm Circ.* 2019;9:2045894019846439.
7. Yamamoto K, Nishimura R, Kato F, Naito A, Suda R, Sekine A, Jujo T, Shigeta A, Sakao S, Tanabe N, Tatsumi K. Protective role of endothelial progenitor cells stimulated by riociguat in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol* 2020;299:263-270.
8. Tanaka N, Ikari J, Anazawa R, Suzuki M, Katsumata Y, Shimada A, Suzuki E, Matsuura Y, Kawata N, Tada Y, Tatsumi K. S100A12 inhibits fibroblast migration via the receptor for advanced glycation end products and p38 MAPK signaling. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2019;55:656-664.
9. Saito K, Tanaka N, Ikari J, Suzuki M, Anazawa R, Abe M, Saito Y, Tatsumi K. Comprehensive lipid profiling of bleomycin-induced lung injury. *J Appl Toxicol.* 2019;39:658-671.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki Toshio, Tada Yuji, Gladson Santhi, Nishimura Rintaro, Shimomura Iwao, Karasawa Satoshi, Tatsumi Koichiro, West James	4. 巻 18
2. 論文標題 Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Respir Res	6. 最初と最後の頁 177 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-017-0660-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Toshio, Carrier Erica J., Talati Megha H., Rathinasabapathy Anandharajan, Chen Xinping, Nishimura Rintaro, Tada Yuji, Tatsumi Koichiro, West James	4. 巻 314
2. 論文標題 Isolation and characterization of endothelial-to-mesenchymal transition cells in pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	6. 最初と最後の頁 L118 ~ L126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00296.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato Fumiaki, Sakao Seiichiro, Takeuchi Takao, Suzuki Toshio, Nishimura Rintaro, Yasuda Tadashi, Tanabe Nobuhiro, Tatsumi Koichiro	4. 巻 313
2. 論文標題 Endothelial cell-related autophagic pathways in Sugden/hypoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	6. 最初と最後の頁 L899 ~ L915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00527.2016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawasaki T, Chen W, Htwe YM, Tatsumi K, Dudek SM.	4. 巻 315
2. 論文標題 DPP4 inhibition by sitagliptin attenuates LPS-induced lung injury in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.	6. 最初と最後の頁 L834-845.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00031.2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto K, Nishimura R, Kato F, Naito A, Suda R, Sekine A, Jujo T, Shigeta A, Sakao S, Tanabe N, Tatsumi K.	4. 巻 299
2. 論文標題 Protective role of endothelial progenitor cells stimulated by riociguat in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Cardiol.	6. 最初と最後の頁 263-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2019.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 巽浩一郎
2. 発表標題 研究マインドを持った呼吸器臨床 ~病態生理から分子病態~
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木敏夫
2. 発表標題 難治性呼吸器疾患における内皮間葉転換
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawasaki T, Chen W, Tatsumi K, Dudek SM.
2. 発表標題 Dynamic modulation of dipeptidyl peptidase-4 in LPS-induced lung injury in mice.
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 倫太郎 (Nishimura Rintaro) (00756091)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	坂尾 誠一郎 (Sakao Seiichiro) (80431740)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	鈴木 敏夫 (Suzuki Toshio) (70771856)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教 (12501)	