

令和元年5月28日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16062

研究課題名(和文) COPD増悪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) Development of new therapy using mesenchymal stem cells for exacerbation of COPD

研究代表者

浅見 貴弘 (Asami, Takahiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：50623865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、細菌やウイルスの感染症などを契機にCOPD増悪をきたす。COPD増悪は、COPDによる死亡の主たる要因とされるが病態の詳細な機序は不明である。COPD増悪の原因として、肺炎球菌の感染があり、現状では抗菌薬、ステロイド、気管支拡張薬による治療が行われているが十分とはいえず新たな治療が求められている。

我々はまず肺炎球菌感染モデルマウスを作成し、間葉系幹細胞(MSC)投与により、肺炎の炎症の抑制を示唆する結果を得ることができた。今後肺炎球菌肺気腫モデルに対してMSC投与効果を検討予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症および感染により悪化する病態は、これまで抗菌薬治療が主に用いられたきた。しかし抗菌薬治療だけでは十分な効果が得られない場合があり、この原因には宿主(ヒト)の要因として、自らの免疫応答が強くなりすぎたり、不十分であることが考えられる。本研究では肺炎球菌感染の過剰な炎症をMSCの投与により抑制できたことを示唆している。抗菌薬治療で軽快が困難だった病態が、間葉系幹細胞の投与により予後が改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) can be exacerbated by bacterial or viral infections. COPD exacerbation is considered to be the main cause of death from COPD, but the detailed mechanism of the disease state is unknown. The cause of COPD exacerbation is pneumococcal infection. At present, antibiotics, steroids, and bronchodilators are used, but they are not sufficient, and new treatment is required.

First, we created a pneumococcal infection model mouse, and obtained the result which indicated the control of the inflammation of the pneumonia by the mesenchymal stem cell (MSC) administration. MSC administration effect will be examined for the pneumococcus pulmonary emphysema model in future.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間葉系幹細胞 肺炎球菌 COPD増悪

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD)は、主にタバコ煙を原因とする慢性炎症性肺疾患であり、現在世界で4番目の死因であり、難治性かつ重篤な疾患である。COPD患者では、細菌やウイルスの感染症などを契機に息切れや喀痰の増加など症状の増悪を認める、いわゆる「COPD増悪」をきたし、QOL低下、呼吸機能低下、さらには生命予後を悪化しCOPDによる死亡の主たる要因とされ、また医療経済上も問題となる(Vestbo J et al, Am J Respir Crit Care Med. 2013)。COPD増悪をおこすと悪循環により、さらにCOPD増悪を繰り返す患者群がいることも知られているが、その病態の詳細な機序はいまだ不明である。以上COPD増悪の病態の解明と新たな治療法の確立は社会的にも医学的にも最重要課題である。

COPD増悪の病態は、これまで適切な動物モデルが乏しかった事も影響して、詳細は不明である。研究代表者らは、エラストラーゼ誘導肺気腫マウスに、COPD増悪の主たる起因菌である肺炎球菌(Sethi S et al. N Engl J Med 2002)を感染させる、「COPD増悪モデル」を確立し、報告した(Takahashi S, Asami T et al. J Infect Dis, 2016)。本モデルは、非致死量の肺炎球菌感染により、肺気腫マウスが対照群に比べ、死亡率上昇と気腫の進行をみとめ、ヒトのCOPD増悪の病態をより忠実に模倣したモデルといえる。

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)は従来多分化能を有し種々の細胞に分化し障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、肺気腫、敗血症、肺線維症などの各動物モデルでMSCを用いた検討が報告され、種々の炎症性疾患に対する細胞治療の可能性が注目されている(Uccelli A et al. Nat Rev Immunol. 2008)。最近、慢性閉塞性肺疾患COPDでも小規模臨床試験にてその投与の安全性が報告され、抗炎症作用が示唆されたが、肺機能の改善の効果までは認めていない(Weiss DJ et al. Chest, 2013)。これまで研究代表者は、インフルエンザウイルス感染におけるMSCの免疫調整作用に関して、マクロファージを用いてin vitroでMSCの産生するPGE2の重要性に関して報告した(Asami T et al. Mediators Inflamm, 2013)。

COPDに対する新たな治療戦略が求められる中で、COPD患者に対するMSC投与の安全性が報告されはじめている一方で、安定期のCOPD患者ではMSC投与による肺機能改善効果は得られていない現状があるが、COPD増悪時に特化してMSC投与を行うことで、MSC投与の有効性を示し、COPD増悪の新たな治療戦略に寄与する可能性が高いという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、肺気腫増悪においてMSC投与が保護的効果を有する可能性が高いと考え、肺気腫増悪マウスモデルを用いてMSCの投与効果とその保護効果の機序を免疫学的に検討し明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肺気腫のない肺炎球菌感染マウスモデルの確立

8-10週齢のC57BL/6マウスに対し、血清型6Cの肺炎球菌を経鼻投与するモデルを作成する。

(2) 肺炎球菌感染モデルマウスに対するMSC投与

上記(1)の条件の肺炎球菌感染モデルマウスに対して、マウス由来MSCを肺炎球菌感染の1時間後に経静脈的に100万個/200 μ Lを投与し、コントロール群に対し、MSC投与群で、24時間後の気管支肺胞洗浄液における総細胞数、好中球数、MPO活性、培養コロニー数を比較する。また、気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン(TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、GM-CSF、CXCL-1、CXCL-2等)を測定する。さらに、気管支肺胞洗浄液において、炎症による肺水腫(透過性亢進)の程度を評価するために蛋白量および抗菌蛋白と報告されているlipocalin2の測定をおこなう。

(3) 肺炎球菌に対する骨髄由来マクロファージの産生する液性因子の検討

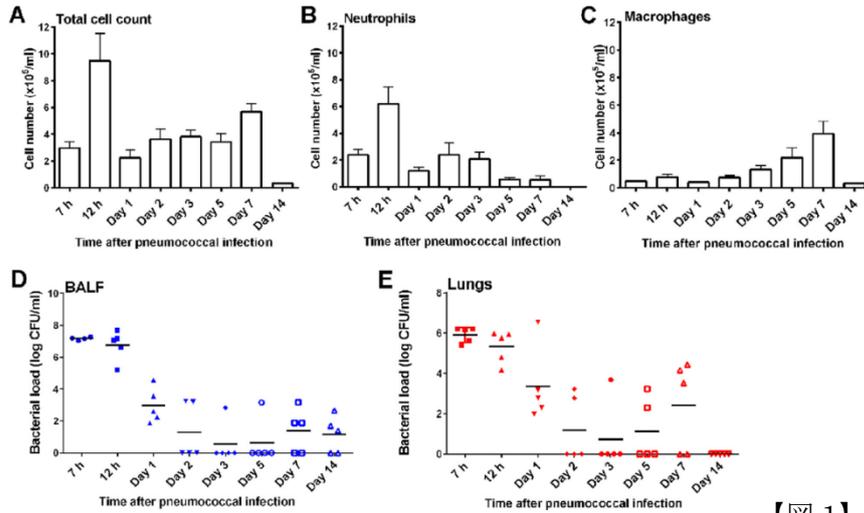
マウス骨髄由来マクロファージを培養し、肺炎球菌感染に関するTLRリガンド(TLR2: Pam3Cys, TLR9: CpG-DNA, TLR4: LPS)、肺炎球菌の生菌で刺激し、マウス骨髄由来マクロファージが産生するサイトカインを測定する。この際MSCが産生する液性因子を含むマウスMSCの培養上清の有無で差異があるか検討する。さらに、肺炎球菌の生菌で刺激した上清について、刺激18時間後の上清の肺炎球菌の生菌数を測定する。また同様にTLR2、TLR9リガンドおよびHKSPの刺激後に、好中球遊走因子であるCXCL1、CXCL2を測定する。

(4) 喫煙誘導肺気腫マウスを用いて、肺炎球菌、インフルエンザウイルスを感染させ、各々「肺気腫増悪モデル」を作成し、再現性やモデル間での差異を検討する。

(5) 肺炎球菌およびインフルエンザウイルスの肺気腫増悪モデルを用いて、MSCの投与を行い、気管支肺胞洗浄液における総細胞数、好中球数、MPO活性、培養コロニー数を比較する。また、気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン(TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、GM-CSF、CXCL-1、CXCL-2等)、蛋白量および抗菌蛋白と報告されているlipocalin2の測定をおこなう。

4. 研究成果

(1) 肺炎腫のない肺炎球菌感染マウスモデルの確立

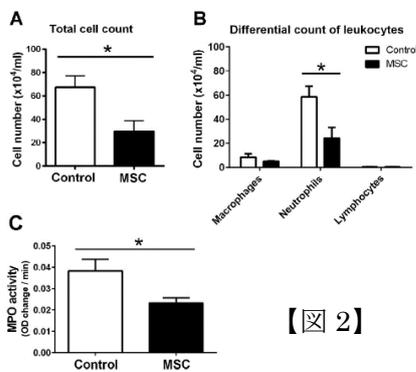


【図 1】

このモデルは致死モデルではないが、気管支肺胞洗浄の総細胞数の推移は肺炎球菌投与後 12 時間と 7 日目にピークとなる。12 時間後は好中球が上昇し、7 日後は組織球が上昇する。気管支肺胞洗浄の細菌量は 7 時間後、肺組織の細菌量は 12 時間後にピークとなる。

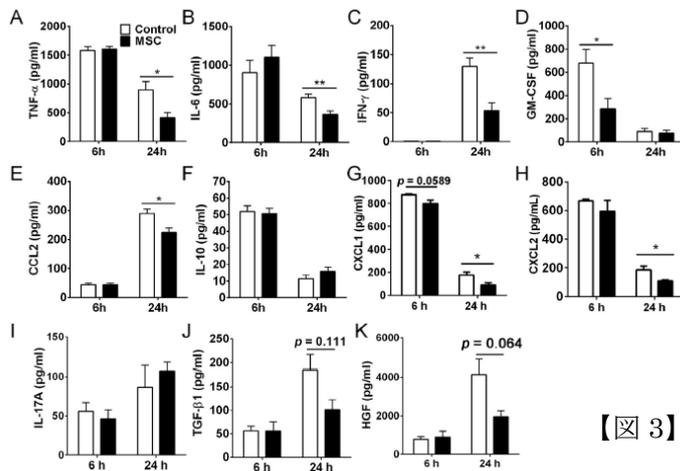
【図 1】

(2) 肺炎球菌感染モデルマウスに対する MSC 投与

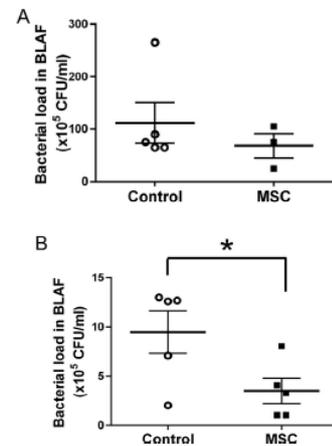


【図 2】

肺炎球菌感染モデルマウスに対して、MSC 投与を行うことで感染 24 時間後の気管支肺胞洗浄液の総細胞数、好中球数は減少し、肺の MPO (ミエロペルオキシダーゼ) 活性は低下した【図 2】。感染 6 時間後、24 時間後の気管支肺胞洗浄液のサイトカイン[(a) TNF- α , (b) IL-6, (c) IFN- γ , (d) GM-CSF, (e) CCL2, (f) IL-10, (g) CXCL1, (h) CXCL2, (i) IL-17A, (j) TGF- β 1 and (k) HGF]を測定したところ、6 時間後の GM-CSF, 24 時間後の TNF- α , IL-6, IFN- γ , CCL2, TGF- β 1, HGF で減少がみられた【図 3】。気管支肺胞洗浄液の培養では感染 6 時間後では差がみられなかったが【図 4A】24 時間後の菌量が MSC 投与群では減少していた【図 4B】。

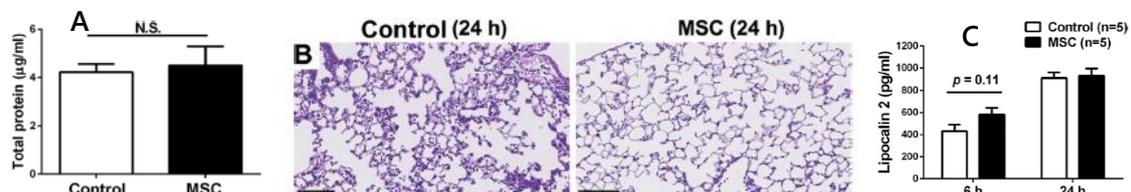


【図 3】



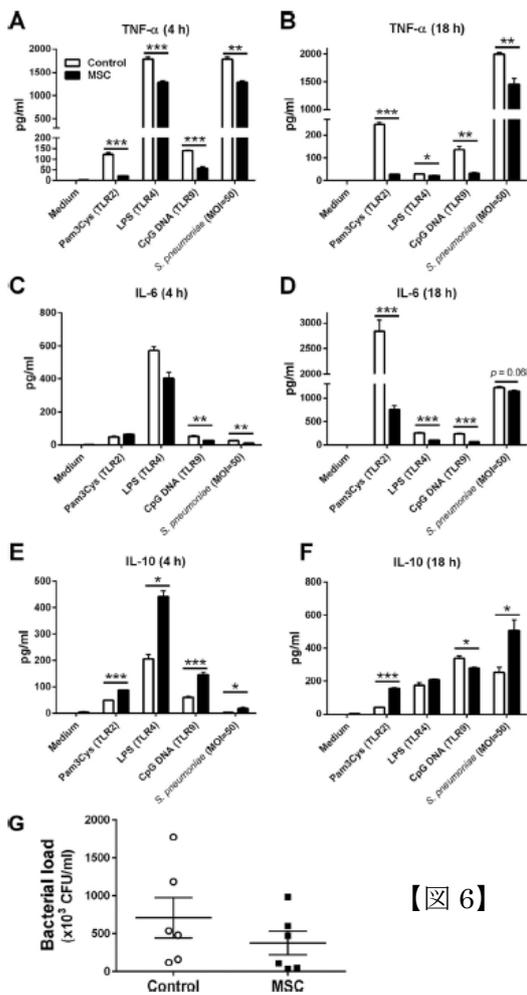
【図 4】

気管支肺胞洗浄液の蛋白濃度は MSC の投与の有無で差はみられなかった【図 5A】。感染 24 時間後の肺組織は【図 5B】のようであり、組織標本上では炎症細胞浸潤が少なかった【図 5C】。気管支肺胞洗浄液の lipocalin 2 については MSC 投与の有無で差はみられなかった。



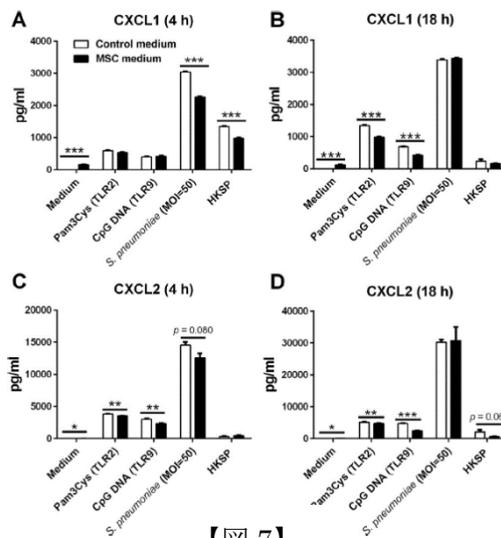
【図 5】

(3)肺炎球菌に対する骨髄由来マクロファージの産生する液性因子の検討



【図 6】

マウス骨髄由来マクロファージを培養し、肺炎球菌感染に関する TLR リガンド (TLR2: Pam3Cys, TLR9: CpG-DNA, TLR4: LPS)、肺炎球菌の生菌で刺激し、マウス骨髄由来マクロファージが産生するサイトカインを測定する。この際 MSC が産生する液性因子を含むマウス MSC の培養上清の有無で差異があるか検討した。MSC 培養上清の投与により、TNF-α、IL-6 の産生が抑制され、IL-10 の産生が増加した【図 6A-F】。肺炎球菌の生菌で刺激した上清について、刺激 18 時間後の上清の肺炎球菌の生菌数には有意差はみられなかった【図 6G】。また同様に TLR2, TLR9 リガンドおよび HKSP の刺激後に、好中球遊走因子である CXCL1、CXCL2 を測定したところ、MSC 投与群では刺激後産生の抑制がみられた【図 7】。



【図 7】

(4)喫煙誘導肺気腫マウスを用いた、肺炎球菌およびインフルエンザウイルス感染による、「肺気腫増悪モデル」の作成

喫煙誘導肺気腫マウスに対して、至適な肺炎球菌、インフルエンザウイルス各々の接種量、自然経過の検討を行っている状況である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Asami T, Ishii M, Namkoong H, Yagi K, Tasaka S, Asakura T, Suzuki S, Kamo T, Okamori S, Kamata H, Zhang H, Hegab AE, Hasegawa N, Betsuyaku T. Anti-inflammatory roles of mesenchymal stromal cells during acute Streptococcus pneumoniae pulmonary infection in mice. *Cytherapy* 20(3) 302-313
doi: 10.1016/j.jcyt.2018.01.003. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[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。