

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15667

研究課題名（和文）CCL2を抑制する間葉系幹細胞を用いた新生児慢性肺疾患に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）A novel treatment for perinatal chronic lung disease using mesenchymal stem cells stably transduced with a dominant-negative inhibitor of CCL2.

研究代表者

鈴木 俊彦（Suzuki, Toshihiko）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60711083

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：7ND-MScは、マクロファージの遊走及び活性化を強く促すケモカインCCL2を阻害する、ヒトCCL2欠失変異体（7ND）を遺伝子導入した間葉系幹細胞（MSC）である。本研究では、新生児慢性肺疾患（CLD）モデルラットに対し7ND-MSc、対照MSCまたは酢酸リンゲル液を投与し、治療評価を行った。7ND-MSc投与群では、対照MSC投与群と比較して肺胞形成障害や二次性肺高血圧症に対する強い改善効果を認めた。その機序として、7ND-MScがMSC単独と比べて、肺組織における肺胞マクロファージやIL-6及びCCL2のmRNA発現量が抑制されており、7NDによる炎症抑制作用の増強が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞（MSC）は様々な疾患に対し臨床応用されており、その効果および安全性が確認されている。7ND-MScは、マクロファージの遊走及び活性化を強く促すケモカイン、CCL2を阻害する作用を持つ7NDを遺伝子導入したMSCである。そのため、新生児慢性肺疾患（CLD）モデル動物に対する7ND-MSc投与は、MSCによる細胞療法の治療効果に加え、7NDの抗マクロファージ作用により、さらに高い治療効果が期待される。本研究にて高い有効性および安全性が確認されれば、ヒトへの臨床応用も可能と考えられ、CLD児の呼吸器学的予後および神経学的予後の向上に大きく寄与すると思われる。

研究成果の概要（英文）：7ND-MSc is a mesenchymal stem cell introduced a mutant (7ND) of human CCL2 protein that functions as a potent antagonist of CCL2, that is a monocyte-activating factor. In this study, we administered 7ND-MSc, control MSC or Ringer's acetate solution to neonatal chronic lung disease (CLD) model rats and evaluated their therapeutic effects. The 7ND-MSc-treated group showed the significant improvement of hyperoxia-induced lung pathology and secondary pulmonary hypertension, compared with the control MSC-treated group. Furthermore, compared with MSC alone, 7ND-MSc decreased alveolar macrophages, particularly inflammatory (M1) macrophages, and suppressed the mRNA expression levels of IL-6 and CCL2 in lung tissue. Thus, the effects of 7ND-MScs is considered to be due to 7ND enhancing the anti-inflammatory effect.

研究分野：小児科

キーワード：再生医療 新生児慢性肺疾患 7ND CCL2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児慢性肺疾患 (Chronic lung disease: CLD) は、子宮内炎症、機械的外傷、酸素毒性などが要因となって生じる肺損傷であり、長期の呼吸障害や肺高血圧症、精神運動発達遅滞といった合併症を引き起こす。現在のところ CLD に対する十分な治療法はなく、CLD の新規治療法の開発は喫緊の課題である。

近年、新規治療法として再生医療が注目されており、CLD に関しても間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) を用いた臨床試験が進められている。しかし、MSC は CLD の病態に強く関わるマクロファージに対する作用が強いとは言えない。一方、7ND は CC chemokine ligand 2 (CCL2) に対して阻害作用を持つヒト CCL2 欠失変異体であり、単球、マクロファージの遊走及び走化抑制効果を持つ。

そのため、7ND を遺伝子導入した MSC (7ND-MSC) を幹細胞治療の細胞源として用いることは、MSC が持つ細胞療法の効果に加え、7ND による単球、マクロファージの抑制作用により、MSC と比較して CLD に対する効果的な治療法となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、7ND-MSC を周産期 CLD モデルラットに投与し免疫組織学的、生化学的評価を行うことで、7ND-MSC の治療効果を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 実験モデル動物作成と実験方法

CLD モデルは、Wistar/ST 新生仔ラットを生直後から日齢 15 まで 80% 高酸素に暴露することで作製した。日齢 5 に、酢酸リンゲル液に懸濁した 7ND-MSC (1×10^5 個; 7ND 群) 対照 MSC (1×10^5 個; MSC 群) または酢酸リンゲル液のみ (Vehicle 群) を右外頸静脈から投与した。なお、高酸素負荷を行わず、日齢 5 に酢酸リンゲル液のみを投与したラットを Sham 群とし、日齢 15 に 4 群間で各種評価を行った (図 1A)。

なお、7ND-MSC はヒト CCL2 欠失変異体 (7ND) をレンチウイルスベクターに再クローニングした後、293T 細胞にトランスフェクションしてベクターストックを作製し、Polybrene ($4 \mu\text{g/mL}$) 下でラット MSC と共培養することで作製した (図 1B)。

(2) 7ND 分泌確認

7ND はヒト CCL2 の欠失変異体であるため、7ND-MSC 及び対照 MSC の培養上清を 24 時間ごとに 4 日間収集し、7ND 含有量をヒト CCL2 ELISA キットを用いて計測した。

(3) 7ND-MSC の生着、体内動態確認

投与細胞の肺組織への生着確認は、免疫組織化学染色によって行った。日齢 15 に肺組織凍結切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

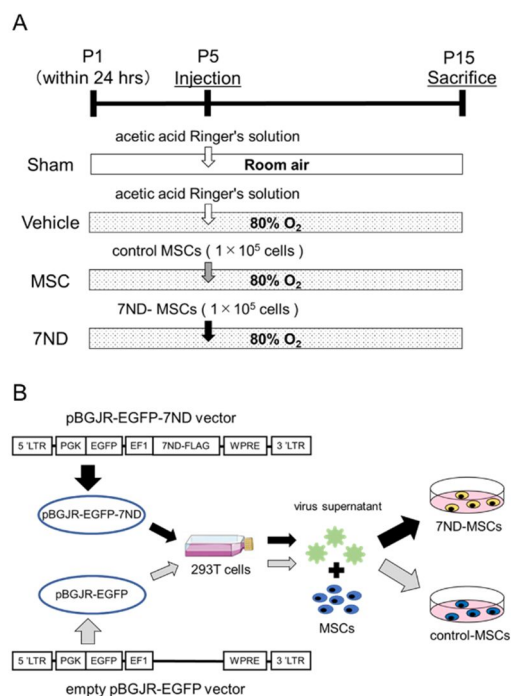
次に、各臓器における 7ND-MSC、対照 MSC の体内分布確認を *ex vivo* imaging を用いて行った。まず 7ND-MSC 及び対照 MSC に、蛍光トレーサ (1, 1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethyl indotricarbocyanine iodid: DiR) を用いて、標識を行った。次に、DiR 標識細胞または酢酸リンゲルのみを、日齢 5 に CLD モデルラットに静脈内投与した。投与後 3 時間、1 日、3 日、7 日で各群ラットを犠牲死させ、各種臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腸、腎臓、膀胱) を採取した。その後、IVIS[®] Spectrum (Caliper Life Sciences, Alameda, CA) を用いて画像化および定量化を行った。

(4) 肺組織評価

肺パラフィン切片を用いて H&E 染色を行い、組織体積密度 (VD_T)、平均線形切片 (L_m) および肺胞表面積 (S_A) の計測を行った。 VD_T は、 $25 \mu\text{m}$ 間隔で等間隔に配置された 10×10 グリッド、計 100 個のポイントにおける肺組織の有無を計測し、肺内における肺組織 (肺胞管および肺泡) の割合を算出した。 L_m は $25 \mu\text{m}$ の水平線と交差する、最初の肺胞壁から隣接する肺胞壁までの距離を測定した。 S_A は、 $S_A = 4 \times VD_T \times \text{肺容量} / L_m$ の計算式に基づいて算出した。肺容量は、日齢 14 に *in vivo* マイクロ CT スキャナ (Skyscan 1176) を用いて肺 CT 画像を撮影し、三次元画像へ再構成後自動的に算出された。

次に肺組織内におけるマクロファージについて評価するために、肺組織切片に対し Iba-1 (汎マクロファージマーカー)、iNOS (M1 マクロファージマーカー)、CD206 (M2 マクロファージマーカー) を用いた免疫組織化学染色を行った。Iba-1/iNOS 二重陽性細胞を M1 マクロファージ、

図1 実験デザイン



Iba-1/CD206 二重陽性細胞を M2 マクロファージとして細胞数の計測を行った。

(5) 血液、肺胞洗浄液 (BALF) 評価

全身および気道の炎症を評価するために、日齢 15 に血液、BALF を採取し、白血球数とその分画を測定した。血液は、動物用血球計数装置 (VetScanHM5®) を用いて自動測定を行った。BALF は、Türk 溶液で染色後、血球計算盤を用いて総細胞数を計測した。次いで塗抹標本を作製し、メイギムザ染色後に白血球分画を評価した。

(6) 肺高血圧、肺血管リモデリング評価

肺高血圧評価のため、日齢 15 に右心室収縮期圧 (RVSP) の計測を行い、さらに右心室肥大の指標として、採取した心臓を用いて右心室と左心室および中隔の乾燥重量比 (RV/LV+S) を測定した。RVSP は、経皮的に右心室穿刺を行い、LEG-1000 (日本光電) を使用して測定を行った。採取した心臓は、左心室と中隔から右心室を切離した後、ドライオープンで 60、48 時間乾燥させた。その後各乾燥重量を測定し、乾燥重量比 (RV/LV+S) を算出した。

次に肺血管リモデリングの評価として、肺血管内壁の肥厚と、血管平滑筋細胞の増殖について検討を行った。肺血管内壁の肥厚は、血管平滑筋のマーカーである α -SMA 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、肺血管内壁厚 (MWT) を測定した。MWT は、 $MWT=2MT \times 100 / ED$ (MT: 内弾性板と外弾性板間の距離、ED: 血管外径) の計算式に基づいて算出した。血管平滑筋細胞の増殖については、 α -SMA 及び核増殖マーカーである Ki-67 の二重染色を行い、Ki-67 陽性血管の割合 (Ki-67 陽性血管率) を評価した。

(7) サイトカイン・ケモカイン評価

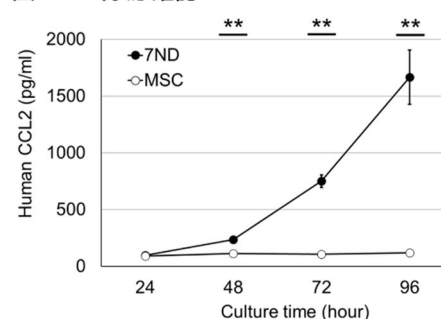
肺組織中のサイトカイン・ケモカイン評価として、肺組織中の IL-6 及び CCL2 mRNA 発現量を、定量的 RT-PCR を用いて評価した。まず日齢 15 の肺組織から、TRIZol 試薬を使用して RNA の抽出を行った。次に、SuperScript VILO cDNA 合成キットを使用して cDNA を合成し、Mx3005P RT QPCR システムにて定量的 RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 7ND 分泌確認

7ND-MSC の培養上清からは多量のヒト CCL2 を検出したが、対照 MSC の培養上清からは検出されなかった。この結果から、7ND-MSC はヒト CCL2 つまり 7ND を分泌するが、対照 MSC は分泌しないことが確認された (図 2)。

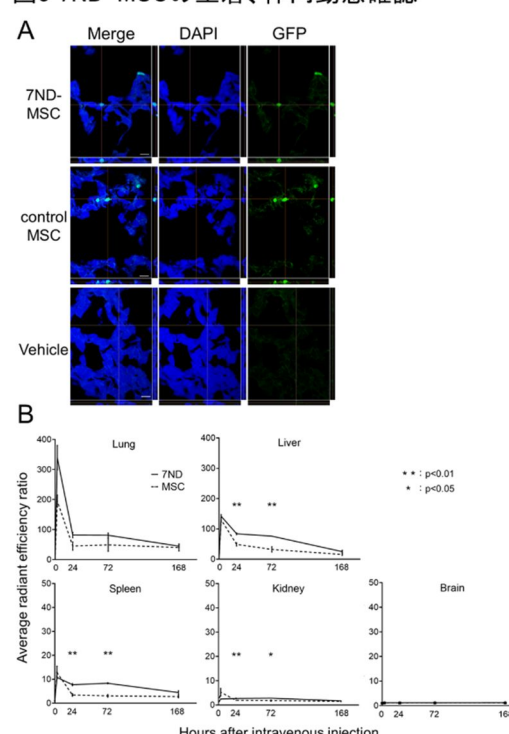
図2 7ND分泌確認 ** : p < 0.01



(2) 7ND-MSC の生着、体内動態確認

7ND-MSC 及び対照 MSC を投与した肺切片のいずれにおいても、抗 GFP 抗体陽性の細胞を認めた。この結果から、移植された 7ND-MSC 及び対照 MSC が、肺組織に移行したことが確認された (図 3A)。

図3 7ND-MSCの生着、体内動態確認



体内動態確認では、7ND-MSC 及び対照 MSC のいずれにおいても、投与後 3 時間の時点で肺と肝臓を中心に蛍光が検出され、以降は徐々に低下していた。肝臓、脾臓、および腎臓では、投与後 24 時間および 72 時間の時点で、7ND-MSC の蛍光量が対照 MSC と比較して有意に上昇したが、肺では有意差を認めなかった。脳では、7ND-MSC 及び対照 MSC いずれの群でも、有意な蛍光は検出されなかった (図 3B)。

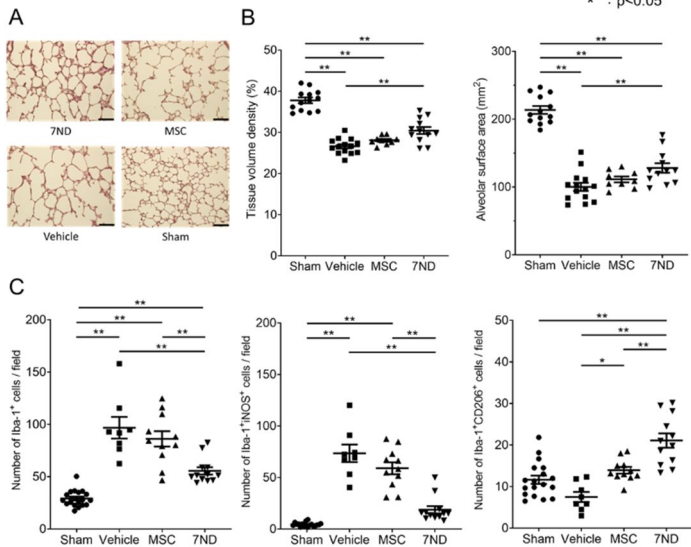
(3) 肺組織評価

H&E 染色による肺組織評価では、Sham 群は正常な肺胞化を示したが、高酸素負荷群(7ND 群、MSC 群及び Vehicle 群)の肺組織は、肺胞中隔の大小不同や肥厚を認めた。高酸素負荷群のうち、7ND 群のみが、MSC 群及び Vehicle 群と比較して形態学的に有意な改善を認めた(図 4A)。

次に肺組織学的評価では、 VD_T に関して Vehicle 群は Sham 群よりも有意に低値であったのに対し、7ND 群は Vehicle 群よりも高値であった($p < 0.01$)。 L_m に関しては、高酸素負荷群間で有意差は認めなかった。また、 S_A に関して高酸素負荷群では Sham 群と比較して有意に低値であったが、7ND 群では Vehicle 群と比較して有意な改善を認めた($p < 0.01$)。一方、Vehicle 群と MSC 群間では有意差は認めなかった。この結果から、7ND-MSC は MSC よりも高酸素負荷に伴う肺胞形成障害を改善させることが確認された(図 4B)。

さらに肺組織内におけるマクロファージ評価では、Iba-1 陽性細胞及び Iba-1/iNOS 二重陽性細胞の総数は Vehicle 群では増加していたが、Vehicle 群及び MSC 群と比較して 7ND 群では有意に減少していた(共に $p < 0.01$)。対照的に、Iba-1/CD206 二重陽性細胞の数は、Vehicle 群及び MSC 群と比較して 7ND 群で有意に増加していた(共に $p < 0.01$)。肺組織内において、マクロファージは炎症性(M1)マクロファージと抗炎症(M2)マクロファージに分類され、特に M1 マクロファージは急性肺損傷に重要な役割を果たす。本結果から、7ND-MSC が肺組織内の炎症を引き起こす M1 マクロファージを抑制し、さらに M1 から M2 へマクロファージの極性を変化させることで、炎症を抑制している可能性が示唆された(図 4C)。

図4 肺組織評価



(4) 血液、肺胞洗浄液(BALF)評価

血液中の総細胞数及びリンパ球数について、Vehicle 群と比較して 7ND 群では有意な減少が認められた($p < 0.01$, 図 5A)。一方、単球数及び好中球数は、高酸素負荷群間で有意差はなかった。また、BALF 中の総細胞数及びマクロファージ数について、Vehicle 群、MSC 群と比較して、7ND 群で有意な減少が認められたが(共に $p < 0.01$, 図 5B) 高酸素負荷群間で、好中球数及びリンパ球数に有意差は認められなかった。この結果から 7ND-MSC は BALF 中のマクロファージを抑制するだけでなく、血液中のマクロファージ以外の免疫細胞にも何らかの影響を与え、全身性の非特異的炎症を改善させる可能性が示唆された。

(5) 肺高血圧、肺血管リモデリング評価

7ND 群の RVSP は、Vehicle 群及び MSC 群と比較して有意な低下を認めた($p < 0.01$, 7ND 群対 Vehicle 群; $p < 0.05$, 7ND 群対 MSC 群; 図 6A)。さらに、Vehicle 群、MSC 群と比べ、7ND 群では RV/LV+S が著明に減少していた(共に $p < 0.01$, 図 6B)。この結果から、7ND-MSC は右心室圧を低下させ、さらに右心室肥大を抑制しており、肺高血圧に対する高い治療効果を有することを確認した。

また肺血管リモデリング評価において、Vehicle 群では、Sham 群と比べ末梢肺動脈での α -SMA 発現が強く、MWT は有意に高かった。一方、7ND 群の MWT は、Vehicle 群及び MSC 群と比較して有意に低下していた($p < 0.01$, 7ND 群対 Vehicle 群; $p < 0.05$, 7ND 群対 MSC 群; 図 7A)。さらに、Ki-67 陽性血管率は、Sham 群と比較して Vehicle 群で有意に増加していたが、7ND 群では減少していた($p < 0.01$, 図 7B) この結果から、7ND-MSC は肺血管壁肥厚を改善し、血管平滑筋細胞の増殖血管を減少させることで、肺血管リモデリングに対する抑制効果を有することを確認した。

図5 血液・肺胞洗浄液評価

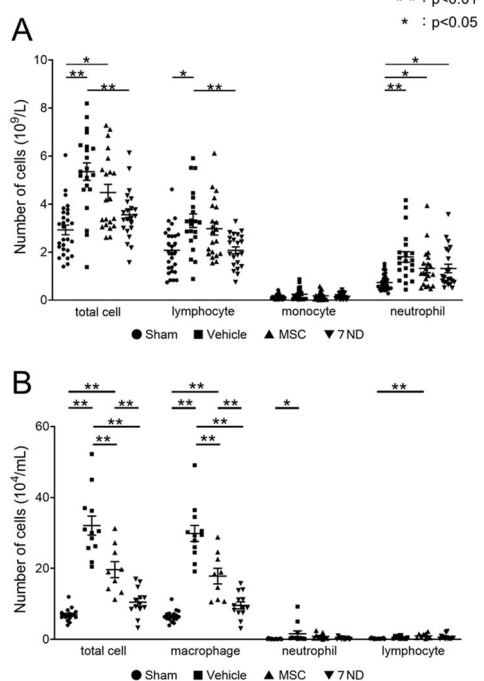


図6 肺高血圧評価

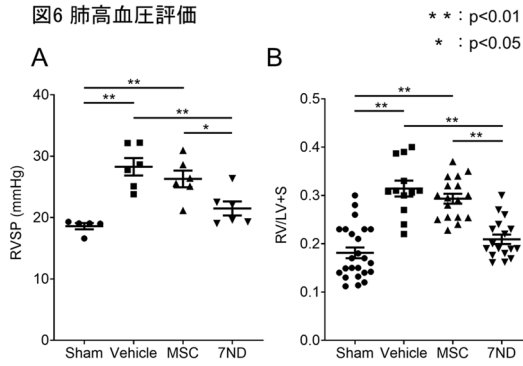
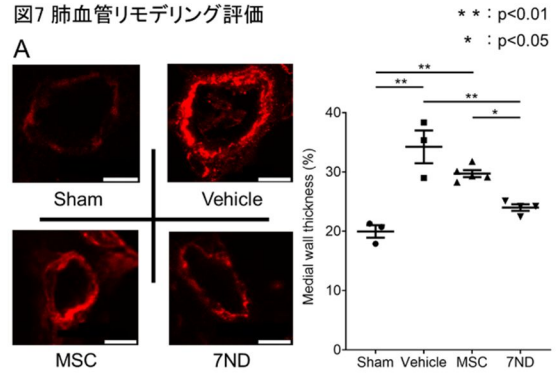


図7 肺血管リモデリング評価



(6) サイトカイン・ケモカイン評価

肺組織中のサイトカイン・ケモカイン評価では、定量的 RT-PCR 検査において、Vehicle 群では肺組織中の IL-6 及び CCL2 の mRNA 発現量が増加していたのに対し、7ND 群では mRNA の発現量は減少していた。一方、MSC 群では mRNA 発現を抑制させる傾向はあったが、有意ではなかった(図 8)。この結果から、7ND-MSC は対照 MSC よりも IL-6 及び CCL2 といった炎症性サイトカインを抑制させることが確認された。

これらの結果から、CLD モデルラットに対する 7ND-MSC の静脈内投与が、MSC と比較して、肺胞形成障害や肺高血圧に対して高い改善効果をもたらすことが示された。さらにその機序として、7ND-MSC は肺組織中のマクロファージ極性を変化させ、さらに IL-6 及び CCL2 の mRNA 発現量を抑制しており、7ND による炎症抑制作用の増強が考えられた。

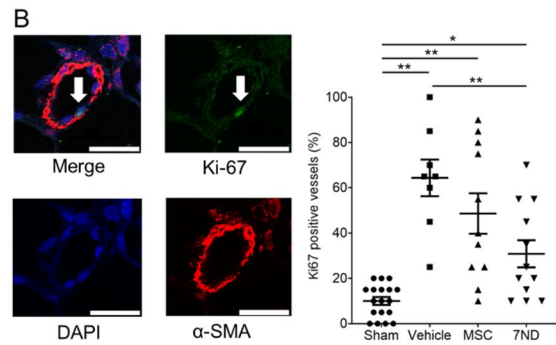
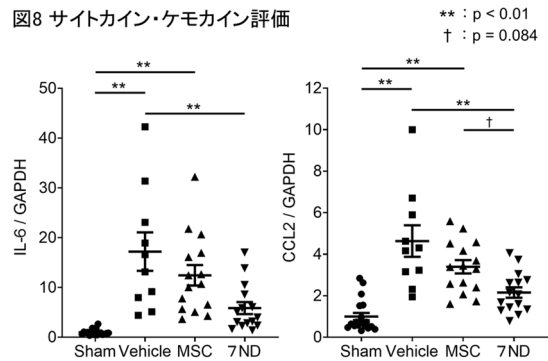


図8 サイトカイン・ケモカイン評価



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki T, Sato Y, Yamamoto H, Kato T, Kitase Y, Ueda K, Mimatsu H, Sugiyama Y, Onoda A, Saito S, Takahashi Y, Nakayama T, Hayakawa M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Mesenchymal stem/stromal cells stably transduced with an inhibitor of CC chemokine ligand 2 ameliorate bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 180-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcyt.2020.01.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----