

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15672

研究課題名（和文）慢性肺疾患モデルラットに対する高純度間葉系幹細胞治療の開発

研究課題名（英文）Development of high purity mesenchymal stem cell therapy for chronic lung disease model rat

研究代表者

和田 啓介（Wada, Keisuke）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：60774338

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）：慢性肺疾患（CLD）モデルラットにおいて、高純度間葉系幹細胞（REC）や骨髄由来間葉系幹細胞（B-MSC）や臍帯由来MSC（U-MSC）の移植では、CLDを有意差をもって改善させることはできなかった。肺組織からmRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを作製した後に、リアルタイムPCRで相対定量を行ったところ、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）3がCLD群で低下がみられたが、既報のTNF α やIL-1といった炎症性サイトカインの上昇は見られなかった。SOD3遺伝子を過剰発現したMSCを作成し、CLDモデルラットに移植したが、有意差を認めるほどの改善は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児慢性肺疾患（CLD）は早産児において組織的な未熟性や炎症などによる呼吸器疾患で治療法が確立していない。間葉系幹細胞（MSC）は炎症を抑制し、かつ組織を修復する能力を有している。いくつかの疾患への臨床応用が始まっているが、その効果は一定ではない。その最も重要な理由として、通常の培養方法で増殖したMSCはその機能が不均一であることが挙げられている。我々が単離した高純度間葉系幹細胞（REC）は均一な間葉系幹細胞で、抗炎症作用や組織修復作用も高いため、RECを用いたCLDに対する治療開発は高い効果を再現できることが期待されるが、有意差をもって改善する効果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：Transplantation of Rapidly Expanding Cells (REC), bone marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (BMSCs), or umbilical cord-derived MSCs (UMSCs) failed to significantly improve CLD in chronic lung disease (CLD) model rats. After extracting mRNA from lung tissue and generating cDNA with reverse transcriptase, real-time PCR was performed for relative quantification. Expression of superoxide dismutase (SOD) 3 was decreased in the CLD group, but expression of previously reported inflammatory cytokines such as TNF α and IL-1 was not elevated. We created MSCs overexpressing the SOD3 gene and transplanted them into CLD model rats, but no significant improvement was observed.

研究分野：小児科

キーワード：間葉系幹細胞 慢性肺疾患 新生児 SOD3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、新生児慢性肺疾患(CLD)に対して高純度間葉系幹細胞(REC)を用いた治療法を開発することである。CLDは早産児において組織的な未熟性や炎症などによる呼吸器疾患で治療法が確立していない。間葉系幹細胞(MSC)は炎症を抑制し、かつ組織を修復する能力を有している。いくつかの疾患への臨床応用が始まっているが、その効果は一定ではない。その最も重要な理由として、通常の培養方法で増殖したMSCはheterogeneousな細胞集団でその機能が不均一であることが挙げられる。我々が単離したRECは均一な間葉系幹細胞で、抗炎症作用や組織修復作用も高い。したがって、RECを用いたCLDに対する治療開発は高い効果を再現できることが期待されるため、CLDの標準的治療を確立するだけでなく、他の肺疾患への治療にも応用できる可能性が高い。

2. 研究の目的

CLDに対してRECを用いた治療法を開発することである。また、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)3のmRNA発現がCLD群で低下がみられたことから、SOD3を過剰発現させたMSCによる治療についても開発することを目的とした。

3. 研究の方法

右記(図1)のように、新生児ラットを生後24時間以内から高濃度酸素(90%)環境下で飼育することでCLDモデルラットが作製できる。酸素毒性によって母ラットが子の喰殺をするので、その行為を避けるために、高濃度酸素投与群の母ラットと空気群の母ラットを12~36時間以内に入れ替える。日齢4のCLDモデルラットにヒト骨髄由来のMSCまたはREC(フローサイトメトリーでCD271およびCD90陽性の分画に存在する細胞をsingle cell sortingして増殖してきた細胞)を頸静脈から静脈内投与する。投与量は両細胞とも 1.0×10^5 個/50mL PBSとする。日齢14に生存率と体重を確認したのち、肺の組織像を評価する。また、治療効果を高めるために、SOD3を過剰に発現させたMSCについて同様の実験を行う。さらに、作用機序を解明するため、リアルタイムPCRで肺組織における炎症性サイトカインなどのmRNAの発現量を検討する。

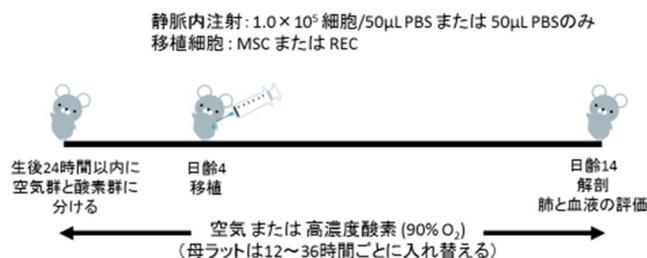


図1. 実験の概要

日齢14に生存率と体重を確認したのち、肺の組織像を評価する。また、治療効果を高めるために、SOD3を過剰に発現させたMSCについて同様の実験を行う。さらに、作用機序を解明するため、リアルタイムPCRで肺組織における炎症性サイトカインなどのmRNAの発現量を検討する。

有効性および安全性の検討

1) 体重と生存率

日齢14までに生存したラットの体重と数を調べる。

2) 肺組織像の評価

日齢14の肺組織の損傷、線維化、remodelingの組織学的回復をHE染色により顕微鏡(BZ-X710、KEYENCE)を用いて定性的に調べる。「ハイブリッドセルカウント」を使用して、肺全体に対する肺胞空間の広さの割合を評価して、肺の傷害の程度を評価した。

3) MSCおよびRECによる有効性の検討

上記1)~2)に関して、投与する細胞(MSC vs REC)で比較検討する。

4) ヒト由来のSOD3(hSOD3)を過剰発現させたMSC(hSOD3-MSC)による治療効果の比較

作用機序の解明

1) リアルタイムPCR

肺組織からmRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを作製した後に、リアルタイムPCRで相対定量を行った。炎症性サイトカインであるTNFやIL-1、活性酸素を処理する酵素であるSOD3、血管新生に関わるアンギオポイエチン(Ang)2/1、間葉系幹細胞(MSC)のホーミングに関わるCXCR4、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)やハウスキーピング遺伝子として知られるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)について調べた。

2) 乾燥右室/左室中隔重量比

CLDでは肺高血圧を合併していることが考えられるため、乾燥右室/左室中隔重量比を測定して評価した。すなわち、肺と同時に心臓を摘出し、10%ホルマリンに72~96時間固定した。冠動脈や外側の脂肪を取り除き、心房を心室から切り離したのち、右室を切り離し(前心底部から心尖部にカットダウン 後ろ側にカットアップ) 弁尖、肺動脈、大動脈を取り除いた。24時間室温で乾燥させたのち、右室と左室中隔の重量を測定した。

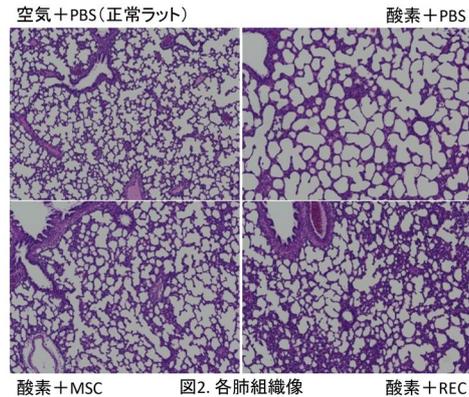
4. 研究成果

1) 体重と生存率

正常群に対して、CLD 群では有意差をもって、体重と生存率が低かったものの、MSC 治療群、REC 治療群、hSOD3-MSC 治療群のいずれでも改善が認められなかった。

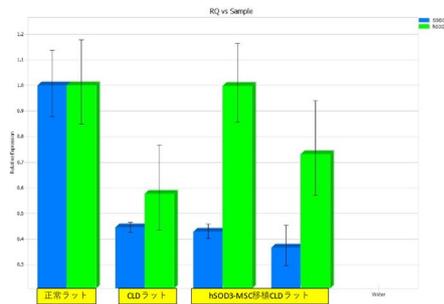
2) MSC、REC および SOD3-MSC の有用性の検討

正常群に対して、CLD 群では肺の障害を顕著に認めた。当初、右図のように REC 治療群が MSC 治療群よりも肺組織の損傷が少ない傾向があるように思われたが、CLD の無治療群に対して、MSC 治療群、REC 治療群および hSOD3-MSC 治療群のいずれでも改善が認められなかった。



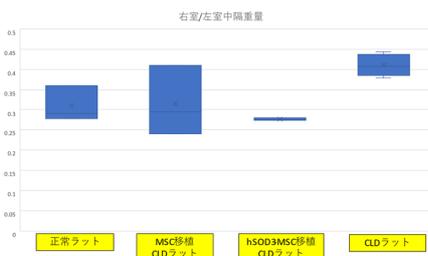
3) リアルタイム PCR

過去の文献では CLD モデルラットの肺において炎症性サイトカインである TNF や IL-1 などの mRNA の発現が高まるという報告が多いが、我々の検討では有意差をもって上昇していなかった。一方で、SOD3 の低下、Ang2/1 の上昇、CXCR4 の低下、VEGF の低下や GAPDH の上昇を認めた。しかしながら、MSC 治療群、REC 治療群では、無治療群と同等であった。hSOD3-MSC 治療群では、hSOD3 の上昇は見られたが、ラット由来の SOD3 は変化なかった (右図)。



4) 乾燥右室/左室中隔重量比

過去の文献では CLD モデルラットの心臓において、乾燥右室/左室中隔重量比の上昇が報告されている。我々の検討でも、同様の結果が得られたが、MSC 治療群と REC 治療群では無治療群と同等であった。hSOD3-MSC 治療群のいずれにおいては、改善する傾向が見られたが、有意差をもって改善するまでに至らなかった (右図)。



5) まとめ

CLD モデルラットに対して、MSC 治療、REC 治療および hSOD3-MSC 治療を試みたが、改善する傾向にはあるものの、いずれも有意差をもって改善するという結果には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------