

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16424

研究課題名（和文）難治性肺疾患に対する脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた幹細胞治療の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on stem cell therapy using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for refractory lung diseases

研究代表者

土肥 良一郎（DOI, RYOICHIRO）

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：00817786

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：難治性肺疾患に対する脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた幹細胞治療について、臓器骨格を維持した無細胞の肺間質における幹細胞の三次元培養法を用いて、移植した幹細胞の肺間充組織内における時空間的動態に関する知見を示し、肺胞上皮細胞との複合投与による幹細胞の肺組織への定着率改善の可能性を示した。また、試験管内において間葉系幹細胞と肺胞上皮細胞との複合共培養によって細胞間接合の強化と物質拡散効果を生じ空気血液関門のバリア機能が強化されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞の細胞源として脂肪組織は重要であり、本研究成果は脂肪組織由来間葉系幹細胞の肺間質における定着率改善へ向けた基礎的研究として、脱細胞化した三次元構造をもつ肺間質内で時空間的動態を一部明らかにした独自性の高い研究となった。将来的に本研究手法が深化し、脂肪由来間葉系幹細胞の肺組織への生着率改善の重要な手掛かりとなる接着因子やニッチ細胞が解明された場合、間葉系幹細胞治療による肺再生治療の実現が期待される。

研究成果の概要（英文）：Stem cell therapy using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for refractory lung diseases, using a three-dimensional culture method of stem cells in cell-free pulmonary interstitium that maintains the organ skeleton, we presented findings on the spatiotemporal dynamics of transplanted stem cells in the lung interstitium and the possibility of improving the fixation rate of stem cells in the lung tissue through combined administration with alveolar epithelial cells. The possibility of improving the fixation rate of stem cells in lung tissue by combined administration with alveolar epithelial cells was also demonstrated. We also showed that in vitro combined co-culture of mesenchymal stem cells and alveolar epithelial cells enhances cell-to-cell junctions and mass diffusion effects, thereby strengthening the barrier function of the air-blood barrier.

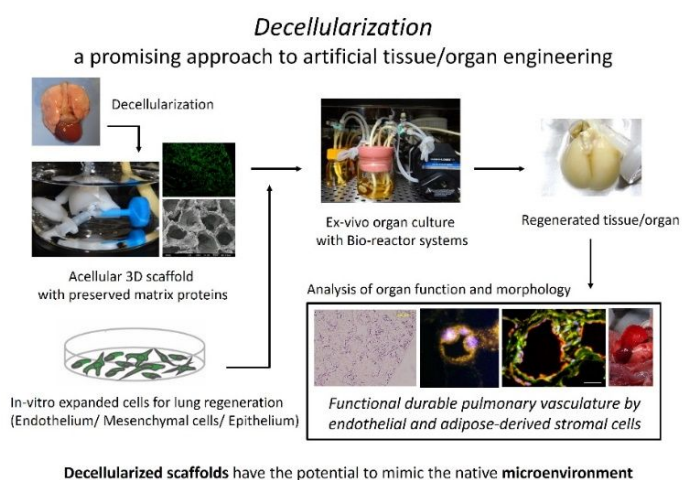
研究分野：呼吸器外科学

キーワード：空気血管関門 脂肪組織由来間葉系幹細胞 脱細胞化 細胞外マトリックス 細胞治療 肺再生

1. 研究開始当初の背景

(1)「肺」は再生しない臓器と認識され、呼吸器領域における間葉系幹細胞を用いた肺細胞治療は、肺胞の再構築や機能改善までには至っておらず、肺の再生についての研究・治験は他臓器に大きな後れをとっている。そのため、難治性呼吸器疾患における細胞療法の開発は喫緊の課題であると言える。難治性呼吸器疾患に対する細胞治療で解決すべき問題は以下の2点に集約される。幹細胞の定着率が悪く、脂肪幹細胞補充によるサイトカイン誘導は微量であり、肺再生を誘発するためには不十分であった。先行する治験の多くが細胞培養液を懸濁液として注入・移植する方法であるため、細胞の定着率が低いという課題をかかえている。肺細胞への分化が起こらず、肺構造の再構築がおきないことである。一方で、現在、世界で行われている細胞治療の治験の7割が間葉系幹細胞を用いた治療である。間葉系幹細胞を用いた細胞治療においては、その細胞源をどこから確保するかという大きな問題がある。骨髄由来の間葉系幹細胞より低侵襲に大量に採取培養できる脂肪由来の間葉系幹細胞が注目を集めている。がん化しない、骨髄細胞よりも増殖能で勝るなど、の利点も有し、間葉系幹細胞の細胞源として有望である。

(2)これまでに我々は、脱細胞化し肺の細胞外骨格を残したままの肺スcaffoldを用いて、In vitroでありながら生体内に近い環境で幹細胞を三次元培養する肺共培養系(三次元培養)を確立し、脂肪組織由来間葉系幹細胞(Adipose Tissue derived Mesenchymal Stem Cell; AD-MSC)の細胞外器質への幹細胞定着および血管壁細胞への分化誘導を研究してきた¹⁾。この脱細胞化マトリックスを元にした幹細胞の三次元培養系では、生体内での観察の前段階としての研究として、生体内での細胞治療後の肺再生プロセスを、幹細胞の組織への定着や分化増殖へのマトリックスの影響や、幹細胞と特定の肺細胞との相互作用などに注目し解析することが可能となった(上図)。



(3)そこで、我々はこの肺3次元培養系を用いて、AD-MSCの肺組織への生着のKeyとなる組織形態、マトリックス蛋白やニッチ細胞などの周辺環境を解明すること、そして肺胞上皮細胞への分化誘導因子とその周辺環境を解明することが、肺の細胞治療における問題点の解決へ大きな手がかりとなると考えた。この系の先行研究として、Yale大学のグループがこの脱細胞化足場上で脂肪由来間葉系幹細胞から肺胞上皮細胞を作成できると報告した²⁾。具体的には1型肺胞上皮内で発見されるサーファクタントプロテインCを蛋白とRNAレベルで同定し、かつラメラ正体を発見した。また、気道上皮細胞の組織幹細胞であるとされるクララ細胞に似た細胞への分化も認めたと報告している。発生過程や再生過程に関する研究においては、組織形態が幹細胞ニッチ形成に影響を与え、脱細胞化した肺scaffoldのように臓器(組織)形態を有した細胞外マトリックスの存在下においては、幹細胞のニッチ形成およびそれに続く細胞増殖や分化制御が成される可能性を示している。脂肪由来間葉系幹細胞が2型肺胞上皮細胞やクララ細胞様細胞などの肺細胞へ分化したという報告は極めて少ない。先行研究において、AD-MSCが脱細胞化肺マトリックス上に接着し3次元培養系において、肺細胞へ分化誘導に成功したのは重要な事実である。AD-MSCの、細胞外肺マトリックスへの定着率の改善、および肺胞上皮細胞への分化誘導効率の改善は、肺の細胞治療における基盤技術の構築へ繋がる。

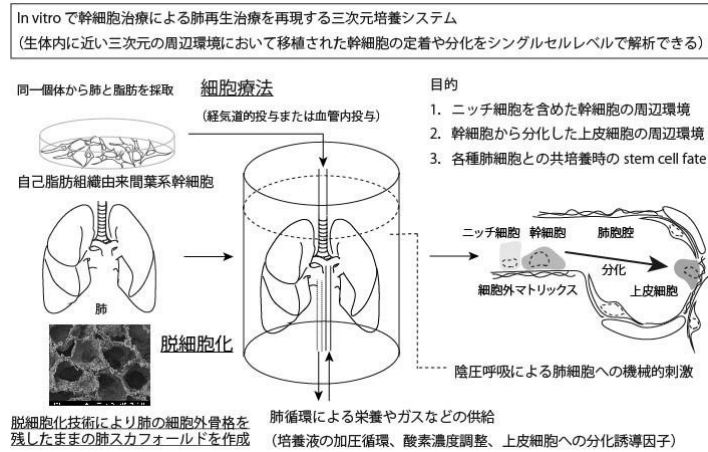
2. 研究の目的

本研究の目的は、将来的に細胞源として有望な脂肪組織由来の幹細胞を用いた肺再生医療を実現するために、上記実験系を用いて、脂肪組織由来の幹細胞の、肺組織への定着率改善を図る技術を開発する、肺胞上皮細胞等への分化誘導法を確立する。将来的には、これらの研究成果によって、脂肪由来間葉系幹細胞の肺組織への生着率改善の重要な手掛かりとなる接着因子やニッチ細胞が解明され、また各種肺細胞への分化誘導因子が同定された場合は、これらの因子を含むバイオマテリアルなどを用いて肺への新規の幹細胞デリバリーシステムの開発が可能となり、COPDへの自己細胞治療による肺再生治療の実現が期待される。

3. 研究の方法

(1) 脱細胞化マトリックス上における脂肪組織由来の幹細胞の定着性と時空間的動態の評価

8~12 週齢の F344 ラットから肺を摘出し、アニオン界面活性剤 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) を使った Yale 大学方式の脱細胞化プロトコルで、肺骨格を残した脱細胞化細胞外マトリックスを作製する。また、肺を摘出した F344 ラットの単径部の皮下組織を摘出し、コラゲナーゼを用いた酵素法で、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AD-MSC) の初代培養を専用培地で行う。初代培養の AD-MSC に量子ドット QD655 でラベリングを行う。3 次元培養については、脱細胞化細胞外マトリックス上において、血管網を通じた灌流刺激、および気道からの換気刺激が可能となる培養装置 (図示) を用いる。QD655 でラベリングした 5×10^6 個の AD-MSC を経気道の投与または血管内投与し、専用培地灌流下に、8 日間培養、16 日間培養、30 日間培養モデルを作製し、経時的な細胞動態を観察する。AD-MSC を投与した細胞外マトリックスを、二光子顕微鏡で観察し、AD-MSC の空間的な動態を観察する。同時に、パラフォルムアルデヒド固定後の薄切切片において免疫組織化学染色を行い、幹細胞の細胞極性やマトリックスへの接着性に関する解析を行い、細胞外マトリックス単独が誘導する AD-MSC の定着性について評価する。



(2) 脱細胞化マトリックス上における多細胞共培養による脂肪組織由来の幹細胞の時空間的動態と肺細胞への分化誘導性の評価

つぎに、AD-MSC と他細胞との共培養条件下において、細胞間相互作用における細胞外マトリックスへの定着性の改善、肺細胞への分化誘導性について解析する。量子ドット QD655 でラベリングした 5×10^6 個の AD-MSC、 20×10^6 個の肺胞上皮細胞 (Alveolar epithelial cell type 2, AT-2)、 20×10^6 個のラット微小血管内皮細胞 (RLMVEC) を組み合わせ、経気道の投与または血管内投与し、上述の 3 次元培養装置を用いて、専用培地灌流下に、8 日間培養、16 日間培養、30 日間培養モデルを作製し、経時的な細胞動態を観察する。(1) と同様に AD-MSC の定着性の改善についてのデータを得る。また、1 型肺胞上皮細胞マーカー (Aquaporin 5, AQ5) と 2 型肺胞上皮細胞マーカー (Surfactant protein C, SPC) を中心とする各種肺細胞マーカーについての免疫組織化学染色を行い、AD-MSC の肺細胞への分化傾向について探索する。

(3) 多細胞共培養時の脂肪組織由来の幹細胞による空気血液関門のバリア機能の強化とパラクライン効果の in vitro 解析

AD-MSC の肺細胞への分化誘導が確立できない場合の次善策として、AD-MSC を用いた難治性肺疾患に対する細胞治療法の開発が目的であることを鑑み、AD-MSC による他の肺細胞間との間の細胞間相互作用、およびパラクライン効果に注目した細胞治療の可能性について探索することとする。AD-MSC が定着したマトリックス上で期待しうる肺胞上皮機能の補完効果について、空気血液関門のバリア機能の強化という点から評価を行う。Transwell 間接共培養系上で AD-MSC と肺胞上皮細胞 (肺胞上皮細胞群、もしくは Sorting した 2 型肺胞上皮細胞)、RLMVEC の複合培養系を用いて構築した空気血液関門の in vitro 評価系を用いる。Trans-epithelial electrical resistance (経上皮電気抵抗、TEER) の測定によって空気血管関門のバリアの強度に関する解析データを得る。また、メンブランの免疫組織化学染色により細胞間接合に関する蛋白発現と遺伝子発現に関する解析データを得る。AD-MSC の細胞間相互作用もしくはパラクライン効果による細胞治療の効果を探索する。

(4) 脂肪組織由来の高純度幹細胞の Muse 細胞 (Multilineage differentiating stress enduring cell) を用いた脱細胞化細胞外マトリックス三次元培養系上における肺細胞への分化誘導実験

AD-MSC の肺細胞への分化誘導が確立できない場合の次善策として、AT-MSC より単離できるとされる Muse 細胞 (Multilineage differentiating stress enduring cell) を用いて、3 次元培養系における肺細胞等への分化誘導実験を行う。Sorting で Muse 細胞を単離したのち、研究の方法 (1) と同じ工程で、細胞外マトリックス単独による分化誘導効果について解析を進める。

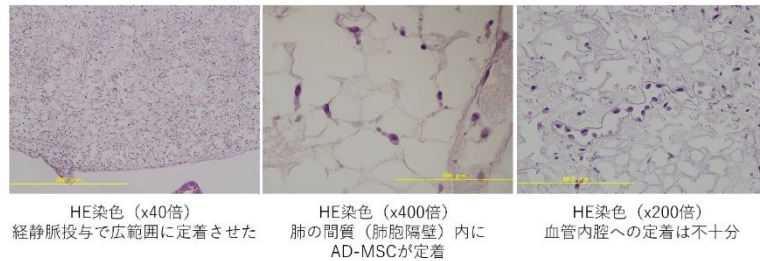
4. 研究成果

(1) AD-MSC は初代培養で細胞外マトリックスへ経静脈的に投与することで、単独投与で肺間質

(肺胞隔壁)へ遊走・定着する(図1)

パイロット試験として、市販のラット ADSC 細胞株 (Cyagen 社、ADSC) 単独を用いて脱細胞化マトリックス内で専用培地の灌流・換気による伸展刺激下での 3 次元培養では、細胞の定着がほぼ得られなかった。8x10⁶個の ADSC (Viability 75%) を肺動脈経路から脱細胞化マトリックス内へ播種し、8 日間培養したが、HE 染色において血管腔内や間質へ定着した像は得られなかった。肺胞上皮細胞原因のひとつとして、市販の ADSC 細胞株の増殖能の低さが考えられた。そのため、市販のラット ADSC 細胞株に代えて、F344 ラットの鼠径部皮下脂肪から採取した初代培養の 4x10⁶ 個の AD-MSC 単独を肺静脈経路から逆行性に脱細胞化マトリックス内に播種し 8 日間 3 次元培養を行い、AD-MSC 単独播種にて比較的広範囲における肺胞間質への定着を認めた。以上より、脂肪組織由来の間葉系幹細胞については、増殖能の高い初代培養の細胞を用いること、そして単独で肺胞間質へ遊走・定着すること、血管内への定着は不十分であることが示唆された。(採取した AD-MSC における CD90 などのマーカー発現はこれまでの研究で解析済みである。)

図1 AD-MSC (初代培養) 単独の経静脈的投与による脱細胞化肺細胞外マトリックスへの定着

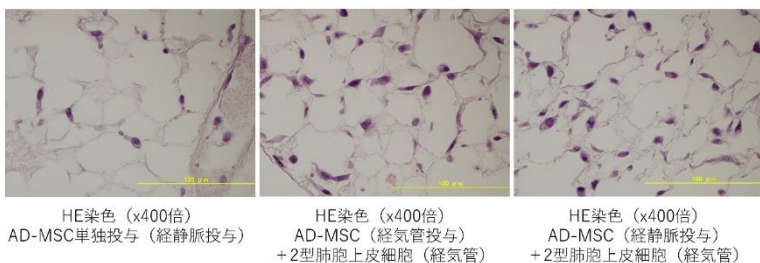


一方で、脱細胞肺マトリックスにおいて肺胞隔壁を中心とした分布・定着した AD-MSC に関して、8 日間培養モデルでは Aquaporin5 (AQ5)、Surfactant Protein C (SPC) の肺細胞マーカーの発現を認めず、16 日、30 日モデルにおいても発現を認めず、細胞外マトリックスに定着後の灌流・換気による伸展刺激のみでは、AD-MSC の肺細胞への分化誘導は生じないことが分かった。MSC 専用培地から肺胞上皮専用培地への培地条件を変更しても同様で、分化誘導は生じなかった。分化誘導のために、iPS 細胞の 2 型肺胞上皮細胞への分化誘導に用いられる Stepwise protocol を併施することを検討したが、時期を同じくして、国内の他グループが同様の実験を行い、肺胞上皮細胞へ分化し得るといった報告があった³⁾。しかし、ごく少量の集団(0.3%)のみ分化誘導が可能とされていた。同報告を踏まえると、誘導効率を改善するための培養条件の探索的な実験が必要である。

(2) AD-MSC は 2 型肺胞上皮細胞との共培養において、経気道的・経静脈的投与のいずれによっても、肺の間質(肺胞隔壁)へ遊走・分布する(図2)

そこで、AD-MSC を肺胞上皮細胞と組み合わせで投与する方法で細胞間相互作用やパラクライン効果での細胞治療を想定し、共培養条件下での AD-MSC のマトリックス上での時空間的動態を評価する実験を追加した。市販の不活化したラット 2 型肺胞上皮細胞株 RLE-6TN (ATCC) 3x10⁶ 個、F344 ラットの鼠径部皮下脂肪から採取した初代培養の 3x10⁶ 個の AD-MSC、3x10⁶ 個の RLMVEC を用いた 3 次元培養を行い、肺胞腔領域において AD-MSC は肺胞隔壁へ遊走・定着し、肺胞腔側に定着した肺胞上皮細胞と隣接する領域を散在性に観察され、AD-MSC と肺胞上皮細胞との細胞接着が起きている可能性が示唆された。

図2 AD-MSC と 2 型肺胞上皮細胞 との共培養による脱細胞化肺細胞外マトリックスへの定着



→ 2 型肺胞上皮細胞との共培養下において、AD-MSC は 経気管・経静脈投与のいずれにおいても、主に肺の間質(肺胞隔壁)に遊走・分布した。

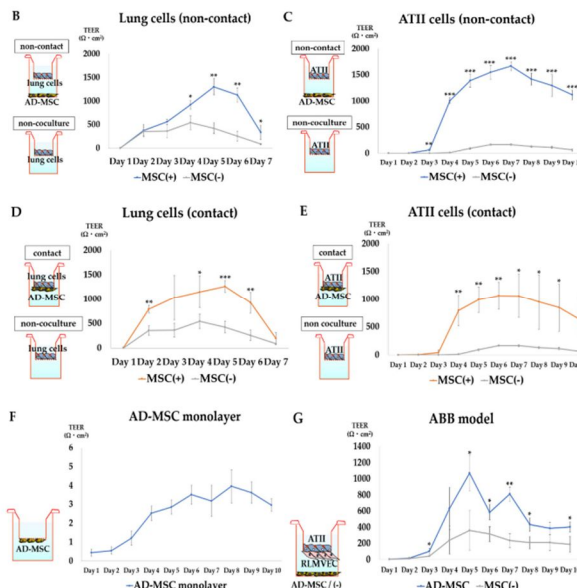


図3 AD-MSCと肺胞上皮細胞との *in vitro* 複合共培養系における経上皮電気抵抗 (TEER) の測定

(B) 肺細胞単層における非接触型AD-MSC共培養群と非共培養群とのTEER値の比較。(C) A111細胞単層膜における非接触型AD-MSC共培養群と非共培養群とのTEER値の比較。単層培養。(D) 肺細胞単層培養における接触型AD-MSC共培養群と非共培養群とのTEER値の比較。肺細胞単層培養における接触型AD-MSC共培養群と非共培養群とのTEER値の比較。(E) 接触型AD-MSC共培養群と非共有培養群とのTEER値の比較。(F) TEER測定 AD-MSC単層膜の (G)非接触型AD-MSC共培養群と非共培養群とのTEER値の比較 (ABB)。すべてのデータは p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001。

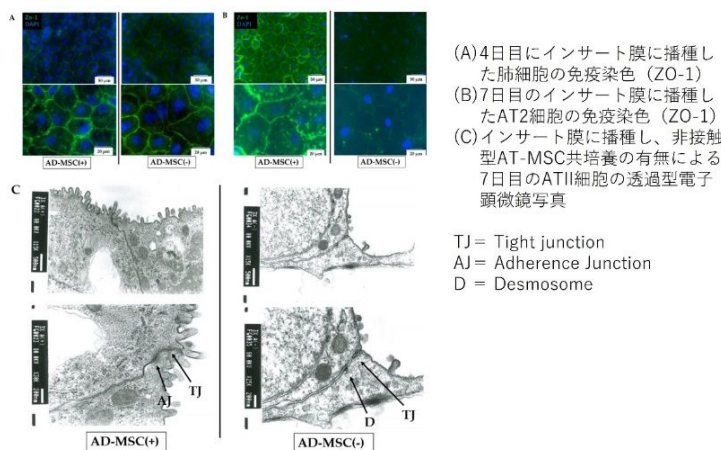
また、肺胞腔内では扁平な 1 層の 1 型肺胞上皮細胞と丸く盛り上がった 2 型肺胞上皮細胞と思

われる構造を認め、細胞外マトリックス上で2型細胞の維持と1型細胞への分化が起きている可能性が示唆された。その他の要因として、AT-MSCとの共培養による細胞接着やパラクライン効果の可能性も示唆された。2型肺泡娘細胞株との共培養によるAD-MSCの細胞外マトリックスへの定着率の改善を認めた。

(3) AD-MSCは、肺泡上皮細胞との複合培養下の環境において zonula occludens-1 の発現によって細胞間接合と肺胞透過性を改善させ、空気血管関門のバリア機能を強化する (図3、図4)

AD-MSC、RLMVECを用いた脱細胞化マトリックスにおける3次元培養では周囲細胞に裏打ちされた血管網の再構築が起こり、肺血管網の血管透過性が改善されることをこれまでに示してきた¹⁾が、3次元培養内において *in vitro* で定量データを得ることが容易ではなかった。今回、AT-MSCと肺泡上皮細胞との3次元共培養環境下における肺胞透過性と空気血管関門のバリア機能の解析について、Transwell共培養系を用いて評価した。経上皮電気抵抗 (TEER) 測定の結果、TEERのピーク値はAD-MSC共培養群でAD-MSC非共培養群に比べ有意に高いことが明らかになった。同様に、AD-MSC共培養群では、AD-MSC非培養群に比べ、透過係数が有意に減少していた。インサートメンブレンの免疫染色により、AD-MSC共培養群では、zonula occludens-1の発現が細胞接合部で有意に高いことが示された。さらに、細胞接合部関連遺伝子プロファイリングにより、AD-MSC共培養群で claudin-4 を含むいくつかの claudin 遺伝子の発現が上昇することが示された。これらの結果を総合すると、AD-MSCは空気血管関門のバリア機能を強化することが示され、直接的な接着効果と間接的なパラクライン効果の両方が *in vitro* での肺泡上皮のバリア機能を強化することが示唆された。

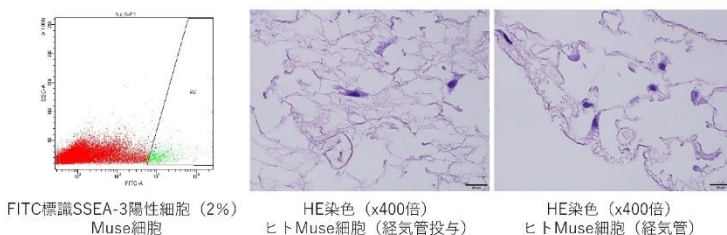
図4 AD-MSCと肺泡上皮細胞との *in vitro* 複合共培養系における細胞接合部の免疫染色と透過型電子顕微鏡による観察



(4) Muse 細胞単独投与による脱細胞化スカフォールド上への定着の可能性を示し、Muse 細胞を用いた難治性呼吸器領域における細胞治療の実験系として活用できる可能性を示した

これまでの実験結果によって上記の成果を得たと同時に、ADSC中の幹細胞の分化解析が明快ではなく、ヘテロな細胞集団であるADSCを肺細胞治療へ用いることの弊害が示唆された。そこで、より高純度な幹細胞の利用を意図して、Muse細胞をSortingしたが、ヒトADSC細胞株からのSortingでは細胞収率が悪くほぼ採取できなかった。Alternativeとして、市販のヒト皮膚線維芽細胞NHDFからAnti-SSEA3抗体を用いてMuse細胞 1.7×10^5 個をSorting単離したのち、脱細胞肺マトリックス上に経気道的投与して三次元培養を行い、わずかであるがMuse細胞の定着を認め、Muse細胞を肺細胞治療へ用いる実験系としての可能性が示唆された。一方で、Muse細胞は大量培養技術が確率されていないため、細胞数の確保が今後の本実験系における課題である。

図5 ヒトMuse細胞 (初代培養) の脱細胞化肺細胞外マトリックスへの定着



→ Muse細胞単独投与による脱細胞化スカフォールド上への定着の可能性を示した。今後、Muse細胞を用いた難治性呼吸器領域における細胞治療の実験系として活用できる可能性がある。

<引用文献>

1) Doi, R. *et al.* Transplantation of bioengineered rat lungs recellularized with endothelial and adipose-derived stromal cells. *Sci. Rep.* **7**, 8447 (2017).
 2) Mendez, J. J., Ghaedi, M. & Steinbacher, D. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized lung scaffolds. *Tissue Eng.* (2014).
 3) Fukui, Funaki, Kimura & Momozane. Adipose tissue-derived stem cells have the ability to differentiate into alveolar epithelial cells and ameliorate lung injury caused by elastase-induced *Stem Cells* (2019).

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 1件）

1. 著者名 Ishii Mitsutoshi, Tsuchiya Tomoshi, Doi Ryoichiro, Morofuji Yoichi, Fujimoto Takashi, Muto Hideki, Suematsu Takashi, Mori Ryoichi, Matsumoto Keitaro, Miyazaki Takuro, Tomoshige Koichi, Watanabe Hironosuke, Iwatake Mayumi, Nagayasu Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased In Vitro Intercellular Barrier Function of Lung Epithelial Cells Using Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081264	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土谷 智史、土肥 良一郎、溝口 聡、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、朝重 耕一、町野 隆介、永安 武
2. 発表標題 脱細胞化臓器骨格を利用した肺再生研究の10年の歩み
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土谷 智史、土肥 良一郎、溝口 聡、石井 光寿、小畑 智裕、畑地 豪、酒井 宏水、田中 義正、池田 裕明、Laura Niklason、永安 武
2. 発表標題 人工臓器の現状と展開-外科治療のコベルニクス的大転換・再建から再生へ- 肺再生研究の現状と展開 臓器構造を再現する過程で見えてきた課題
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 光寿、土谷 智史、土肥 良一郎、溝口 聡、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、畑地 豪、渡邊 洋之助、永安 武
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞によるin vitro肺細胞間バリア機能増強効果
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井 光寿、土谷 智史、土肥 良一郎、溝口 聡、松本 桂太郎、宮崎 拓郎、畑地 豪、渡邊 洋之助、永安 武
2. 発表標題 脂肪組織由来間葉系幹細胞による肺細胞間バリア機能増強効果の解析
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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

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