

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 C  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19590878  
研究課題名（和文） 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた肺再生の試み  
研究課題名（英文） Regenerative Medicine in Pulmonary Medicine  
with Mesenchymal stem cells  
研究代表者  
辛 紅 (Xin Hong)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：70400249

### 研究成果の概要：

エラストーゼを用い作成した肺気腫モデルマウスに骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を経気道的に投与したところ、肺気腫の形成が抑制された。MSC は障害部位に到達するものの特異的肺胞上皮細胞に分化することはなく、従来言われていた直接的生着分化のメカニズムで MSC の組織修復能を説明することはできなかった。組織修復の機序解明を進めた結果、MSC は局所で抗免疫作用をもつサイトカイン、組織修復促進物質などの生理活性物質の放出を通して炎症抑制・修復促進を行うことにより障害肺組織の修復に関与していることを証明した。

### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

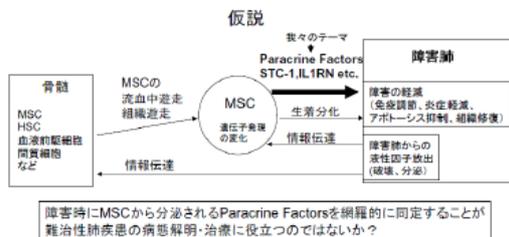
キーワード：再生医療、間葉系幹細胞、COPD

### 1. 研究開始当初の背景

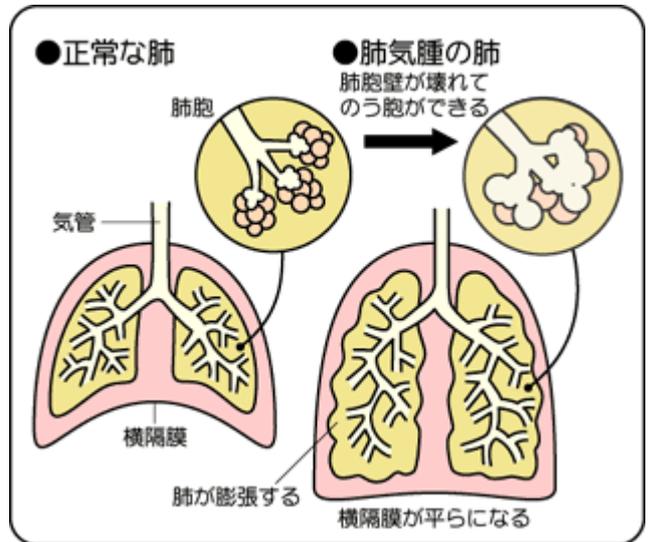
MSC (Mesenchymal stem cell, 別名 Multipotent dtromal cell; 間葉系幹細胞) は骨髄間質領域に存在する幹細胞で、骨細胞や脂肪細胞への分化能を有する。骨髄由来細胞を培養する際にプラスチック底面に付着する性質を有し、分離は容易で、培養も簡単に行える。最近の研究から骨や脂肪組織以外の組織、血管の外壁構造や筋肉、肺胞上皮細胞、神経細胞などにも分化できること、周囲組織の免疫寛容誘導、強い外分泌作用(これら MSC の作用は骨髄内を恒常的環境に保つ能力より由来しているものと思われる)により、細胞治療の有望なプレーヤーの一つとして注目されている。さらに、羊水や成人脂肪組織から MSC を分離可能であることが証明されている。

再生医療の分野では ES 細胞、iPS 細胞に注目が集まっているが、倫理的・技術的に医療への応用にむけて克服しなければいけない問題があるが、臨床応用に関しては MSC の利用は問題が少ない。すでに技術が確立され、成人から安全、大量に採取できることや拒絶反応が少ないことなどより、脳梗塞・脊髄損傷・クローン病などへの治療応用が既に始まっており、呼吸器分野においても積極的な活用が期待される場所である。

呼吸器分野では、MSC の経気道的投与がマウスブレオマイシン肺線維症モデルで肺障害を軽減したことが報告されている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8407-11)。我々は、このことに着想を得て、MSC による難治性肺疾患の治療効果を動物モデルで検証することを試みた。その中で特に年々、患者数が増え、WHO による死因統計の中でも 10 位に入る COPD (慢性肺気腫) の動物モデルを研究テーマとして選んだ。



・ 仮説



・ COPD (肺気腫) について (COPD.info.net より引用)

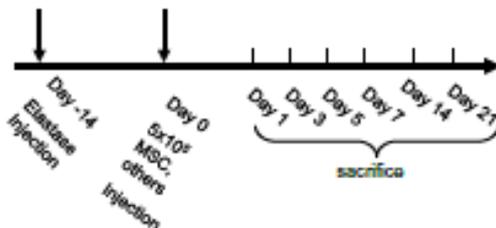
## 2. 研究の目的

難治性肺疾患で患者数も多い COPD (慢性肺気腫) の動物モデルであるエラストーゼ誘導マウス肺気腫モデルを用いて、MSC 経気道的投与の治療効果と機序を解明すること。機序の解明を通して、COPD (慢性肺気腫) に対する細胞治療・新規治療などにつなげることを目的にした。

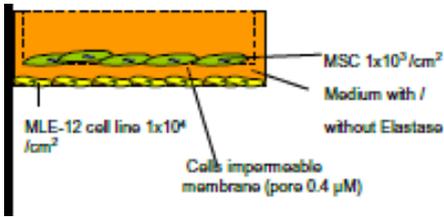
## 3. 研究の方法

エラストーゼ誘導マウス肺気腫モデルにマウス大腿骨由来 MSC を経気道的に投与する。犠死後、肺組織を病理学的手法、分子生物学的手法を用いて解析した。

その後、肺組織の BAL 検体、mRNA・タンパク抽出により MSC が投与された肺でどのような因子が誘導されるのか検討した。MSC とマウス肺胞上皮細胞株 MLE-12 を細胞非透過半透膜 (Transwell) を介して共培養することにより、MSC が放出する因子を検討した。



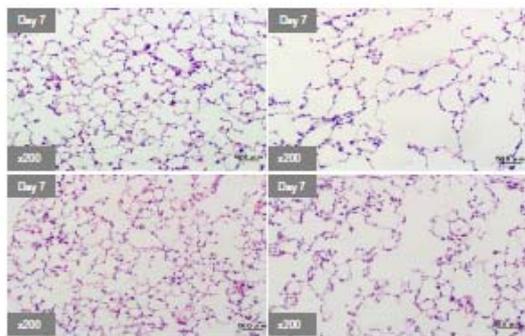
・ 細胞投与と Sacrifice の時期



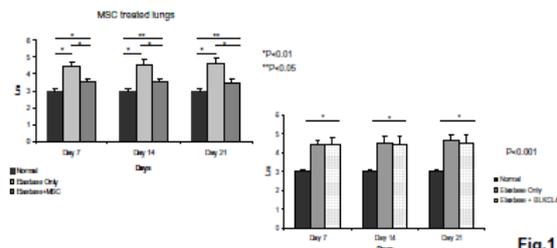
- MLE-12 と MSC の共培養

#### 4. 研究成果

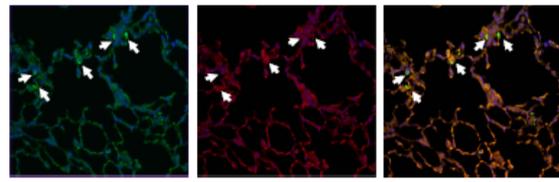
MSC は肺気腫の形成を著明に抑制した。MSC は障害を受けた組織で生着分化したがその割合は MSC の組織修復能を反映しなかった (0,001%以下)。MSC は生着後 3 週間で姿を消した。そのため、MSC が組織障害を軽減する機序の主なものとして、MSC の局所への定着および特異的細胞への文化を考えるのは無理があった。MSC は傷害局所で様々な生理活性物質 (IL1RN,EGF,HGF など) を放出し、炎症を抑え、肺保護物質 SLPI を誘導した。これらの作用が MSC の組織修復能の主たるものと考えられた。



- MSC 投与により、肺気腫の形成が抑制された。ELKCL4・・・Fibroblast

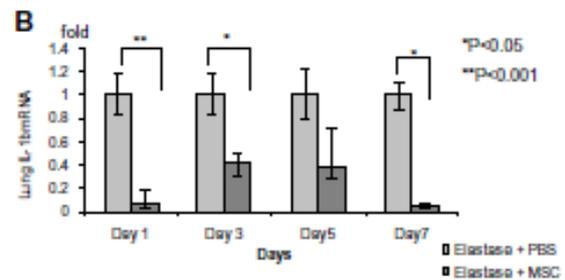
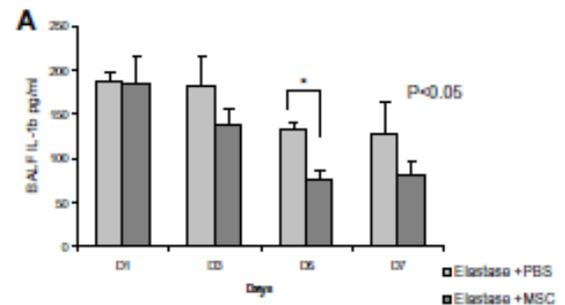


- 肺胞の直径が減弱した。

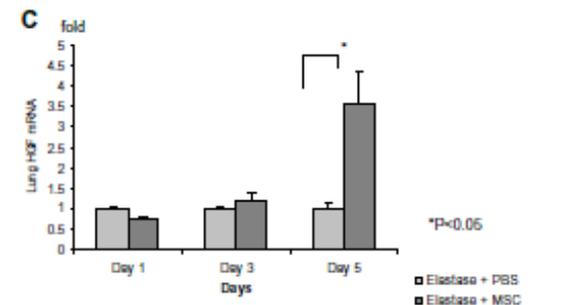


All Day 7 GFP AQP5 Merged

- GFP-MSC は肺胞上皮特異的 AQP 5 を発現しなかった。

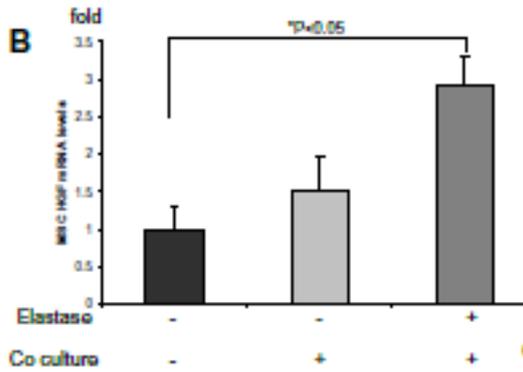


- MSC を投与された BAL, 肺組織中では炎症惹起物質 IL1B が抑制された。

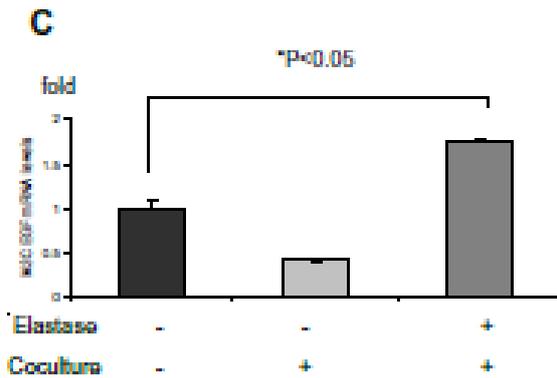


- 肺組織中では HGF が増大した。

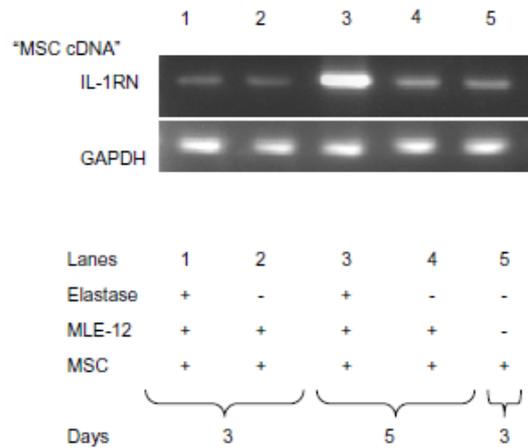
Fig.1



• MSC は共培養で HGF の分泌を増大させた



• MSC の中で EGF 発現が増大した。



• MSC の中で IL1b 抑制物質 IL1RN が誘導された (PCR)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Katsha, S. Ohkouchi, H. Xin, T. Nukiwa, Y. Saijo; MSCs ameliorate Elastase induced Emphysema by suppressing IL-1b and including growth factors. 日本呼吸器学会 東京 2009年6月12日

2. Katsha, S. Ohkouchi, H. Xin, T. Nukiwa, Y. Saijo; MSCs ameliorate Elastase induced Emphysema by suppressing IL-1b and including growth factors. American Thoracic Society Annual Meeting, San Diego, USA, May 18, 2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛 紅 (Xin Hong)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70400249

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者