

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21590976

研究課題名（和文） 脂肪組織由来幹細胞を利用した肺気腫疾患に対する細胞治療

研究課題名（英文） Adipose tissue-derived stem/stromal cells (ASC) therapy to elastase-elicited pulmonary emphysema in rat model

研究代表者

武永 美津子 (TAKENAGA MITSUKO)

聖マリアンナ医科大学 医学（系）研究科（研究院） 准教授

研究者番号：10236490

研究成果の概要（和文）：

エラスターゼ (porcine pancreatic elastase ;PPE) (250U/kg)惹起肺気腫モデルラットに脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem/stromal cells; ASC) を経静脈的に移植(2.5 x 10⁶ cells/500μl/20min)すると、PPE 投与肺気腫モデルにみられる酸素分圧 (PO₂) の有意な低下および肺胞気・動脈血酸素分圧較差(A-aDO₂)の有意な上昇を、正常動物とほぼ同等な値まで有意に改善させた。PPE 投与による肺機能傷害に伴い再生修復因子である hepatocyte growth factor(HGF)産生が有意に低下したが、ASC 移植群では、呼吸機能の改善とともに HGF 産生が有意に増加した。また白血球遊走因子の 1 つである cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1(CINC-1) の低下を有意に抑えることを見出した。移植時 PPE 誘導肺では IL-1βが有意に増加しており、in vitro の培養下、ASC が HGF や CINC-1 を多く産生するだけでなく、IL-1β存在下でこれらの産生が有意に増加することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Adipose tissue-derived stem/stromal cells (ASC) transplantation (2.5×10⁶/500μl/20min) was performed through intravenous route in porcine pancreatic elastase (PPE) (250 U/kg)-induced emphysema model rats. Pulmonary function (arterial oxygen tension (PaO₂) and alveolar-arterial oxygen tension difference (A-aDO₂) was restored almost to that of normal animals. Enlargement of the alveolar airspaces was inhibited. Hepatocyte growth factor (HGF) and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1(CINC-1) levels were significantly higher in the ASC group even at 2 weeks after transplantation. Sponge implantation with CINC-1 induced neovascular formation with increased HGF. *In vitro* secretion of HGF and CINC-1 from ASC was promoted in the presence of IL-1β. Some grafted ASC was confirmed to survive at the damaged site. Therefore, not only HGF but also CINC-1 secreted from transplanted and viable ASC, presumably contributed to lung repair through angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性閉塞性肺疾患の罹患数は年々増加しており、肺気腫疾患もその1つである。これは肺胞壁の破壊を伴いガス交換能の低下を症状とする疾患で、タバコとの因果関係は明白なものの、根治療法は未だ確立されていない。

(2)本疾患に対する組織学的修復・再生の試みとして、レチノイン酸の投与や再生修復に関わる生理活性タンパク因子の投与、さらには骨髄由来間葉系幹細胞の移植によって効果がもたらされるとの研究結果が報告されるようになってきた。

(3)一方脂肪組織にも、間葉系幹細胞に類似した性質を持つ脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem/stromal cells; ASC) が存在することが、2000年～2001年に Hedrick らのグループにより報告された。以来、我々は多くの利点のあるASCによる細胞治療の可能性に着目して研究している。そのなかで肺気腫疾患へのASC移植による治療効果の検証を試みるに至った。

2. 研究の目的

脂肪組織から得られたASCを、エラス

ターゼ誘導肺気腫モデルラットに静脈内投与による移植を行い、治療効果を検証する。また機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ラット脂肪組織の採取とASCの培養

麻酔下、SDラット (♂ 約180g 6w齢、日本SLC) 鼠径部から皮下脂肪組織を採取する。Phosphate buffered saline(PBS)を用いた洗浄とハサミを用いた細切後、37°C1時間の0.1%コラゲナーゼ処理を行う。70µmフィルターを通した後、遠心操作と洗浄操作を繰り返して得られたstromal-vascular fraction (SVF)を新たな培地 (20% fetal bovine serum (FBS)を含むDMEM中に懸濁させ培養皿に播種する。培地は3日おきに交換し、培養は37°C、5%CO₂環境下で行う。コンフルエントになった細胞をトリプシン/EDTAで剥離後、新たな培地で懸濁後培養さらに播種し培養する (継代1)。継代することではほぼ均一な線維芽様接着細胞が増殖してくる。本研究では継代2代目のadipose-derived stem/stromal cells (ASC)を用いた。この細胞は、増殖能

(doubling time;23.6h)、分化能（骨芽細胞、脂肪細胞）をもつことを確認した。また間葉系幹細胞マーカーとして CD44、および CD90 を発現していた。一方、造血幹細胞マーカーとしての CD31, CD34, CD45 の発現はほとんど見られなかった。

(2) 肺気腫モデル作製

麻酔下、SD ラット (♂ 約 200g 7w 齢) を挿管台に固定し、調整したブタ膵酵素エラスターゼ溶液 (porcine pancreatic elastase (PPE) 250U/mL) を挿管チューブ経由にて経気道内投与する。

(3) 細胞移植

細胞移植はエラスターゼ投与 1 週間後に stereotaxic microinjector (model 310 室町機械) を用いて行う。麻酔下、生理食塩水に懸濁した細胞、あるいは対照群として生理食塩水を肺気腫モデルラット尾静脈に投与 (ASC; 2.5×10^6 cells/500 μ l/20min) する。

(4) 肺呼吸機能評価および病理解析

①麻酔下、経時的に動脈血を採取し、酸素分圧、肺泡気・動脈血酸素分圧較差 (A-aDO₂) を測定する。

②経時的に肺を摘出し、パラフィン切片を作製する。HE 染色を行い病理学的解析 (肺胞径・気腫化の程度など) する。

③経時的に肺を摘出し、homogenate サンプルを作製する。遠心上清を肺組織サイトカイン測定サンプルとする。

①②③いずれも正常動物群、PPE 単独投与群、PPE 投与+ASC 移植群で比較する。

(5) ASC の体内動態

①Green fluorescent protein (GFP) トランスジェニックラット (♂ 約 180g 6w 齢, 日本 SLC) 皮下脂肪組織摘出、

(1) と同様な方法で培養する。得られた GFP 発現 ASC を PPE 投与肺気腫モデルラットに (3) と同様に移植する。経時的に凍結切片を作製し蛍光タンパク GFP を指標に細胞動態を解析する。

②ASC を 24 時間 [³H]thymidine と培養し、[³H]thymidine で標識した [³H]ASC を得る。PPE 投与肺気腫モデルラットに (3) と同様な方法で調製した [³H]ASC (1,159,498 dpm) を移植する。経時的に肺、その他の臓器を摘出し、放射活性から体内動態を解析する。

(6) スポンジ埋め込み実験

ASC の血管新生作用を検証するため、スポンジ埋め込み実験を行う。8mm 径の円形に切ったスポンジ (Sponzel®, アステラス製薬) に ASC (2.5×10^6) を含浸させて、麻酔下ラット背部に埋め込む。4 日後、スポンジを摘出し血管新生を観察、およびヘモグロビン値を測定

(Hemoglobin determination kit, 和光純薬) し数値化する。対照として生理食塩水を含浸させたスポンジを埋め込み、同様の観察を行う。また ASC が産生する因子の 1 つ、CINC-1 (0.3 μ g; R&D systems) についても同様にスポンジに含浸させ実験に供する。bFGF

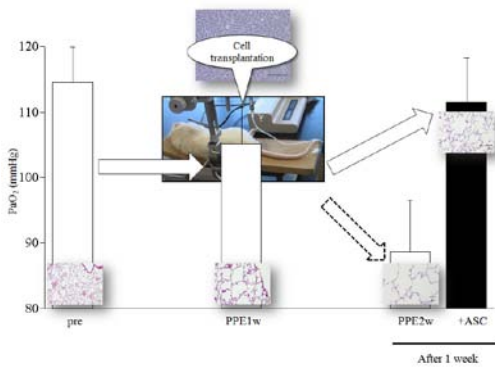
(0.5 μ g; Invitrogen) は、血管新生作用をもつ positive control として用いた。

以上は、聖マリアンナ医科大学大学院動物委員会承認を受けた後、実施した。

4. 研究成果

(1) ASC の PPE 惹起肺気腫モデル (呼吸機能および気腫化) に及ぼす作用

PPE (250U/kg) をラット気管内に投与すると、肺胞径の拡大、および呼吸機能の低下を特徴とした疾患モデルが作製できることを確認した (図・1)。



図・1

PPE 投与 1 週間後細胞(ASC) 移植を行うと、PPE 投与肺気腫モデルにみられる酸素分圧 (PO_2) の有意な低下(図・1 114.5mmHg→80.1mmHg)および肺胞気・動脈血酸素分圧較差(A-aDO₂)の有意な上昇(5.2mmHg→19.8mmHg)を、有意に改善した(PO_2 ;1171.7mmHg, A-aDO₂;6.17mmHg)。これらは、正常動物とほぼ同等の値であった。同時に ASC 移植群は、障害による肺胞径(mean linear intercept; Lm)の拡大を有意に抑えた (PPE 群; 99.6 μ m, PPE+ASC 移植群; 62.5 μ m, 正常群; 47.8 μ m)。以上の結果から、ASC 移植が肺気腫疾患に対して細胞治療効果を示すことが明らかとなった。

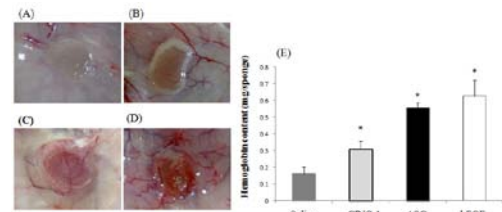
(2) ASC の PPE 惹起肺気腫モデル (肺組織サイトカイン) に及ぼす作用

呼吸機能評価後、肺組織中サイトカインを測定した。PPE 投与による肺機能傷害に伴い Hepatocyte growth factor (HGF)産生が有意に低下した (158.3ng/g→124.6ng/g)が、ASC 移植群では、呼吸機能の改善とともに HGF 産生が有意に増加した(156.1ng/g)。また PPE 誘導による肺機能傷害に伴い白血球遊走因子の 1 つである

cytokine-induced neutrophil

chemoattractant-1 (CINC-1) は一過性の上昇の後有意に低下した(3.21ng/g →1.38ng/g)。ASC 移植群でも低下がみられたものの、PPE コントロール群に比べ有意に増加することが明らかとなった(2.05ng/g)。

(3) ASC および CINC-1 による血管新生作用

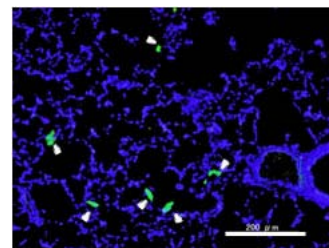


図・2

図・2 に示したスポンジ埋め込み実験の写真(左)およびヘモグロビン値(右)から、ASC だけでなく CINC-1 が、bFGF 同様に血管新生作用を示すことが明らかとなった。

(4) ASC の病変部位での生着

ASC 移植細胞が病変部位に生着することは、GFP 発現 ASC を用いて PPE 投与肺気腫モデルラットへの移植で明らかであった (図・3 矢印が生着している ASC、移植 1w 後の肺組織写真, scale bar;200 μ m, blue;DAPI(核))。



図・3

[³H]ASC を用いた細胞移植後の動態を検討したところ、肺への集積が疾患モデルでは予想外に低いことが明らかとな

った。すなわち正常動物への ASC 移植 3 時間後では、移植細胞の 30% が肺に集積するのに対し、PPE 誘導肺気腫モデル動物でのそれは、2%、高くても 5% にとどまった。他の臓器への集積も正常動物に比べ明らかに低い値を示した。これは肺傷害による肺血流の悪化が、この結果を招いた可能性がある。一方血中での ASC 動態は、比較的長時間にわたって血液中を滞留していた。したがって、疾患モデル動物では、移植後短時間では著しい肺への集積はみられないものの、徐々に病変部位へ移行し、図・3 に示したように生着したと考えられた。

(5) ASC の血管新生因子の産生

ASC は、増殖能多分化能をもつ幹細胞というだけでなく血管新生に関わる栄養因子の産生能が高いのが特徴である。とくに HGF 産生は骨髄由来間葉系幹細胞に比べて高い特長をもつ。一方、移植時 PPE 誘導肺では IL-1 β が有意に増加していた。ASC が *in vitro* 培養下 HGF や CINC-1 を多く産生するだけでなく、IL-1 β 存在下でこれらの産生が有意に増加することを本研究で見出した。

(6) 結論

PPE 誘導肺気腫モデルへの ASC 移植は、低下していた呼吸機能をほぼ正常値付近まで回復させ、また肺胞径の増大を顕著に抑制した。この静脈経由の移植法は、ヒトでの点滴移植を想定したものである。今回のラット同種移植に際し、投与細胞密度、移植速度を十分検討したうえで行われたものであり、動物に無理のないまた問題のない移植条件であった。本研究で得られた効果の機序として、ASC 移植細胞が病変部位に生着し、HGF や CINC-1 等の血管新生に関与し

ている因子を産生し続けることが、肺の再生修復、さらには呼吸機能の有意な改善を導いたと結論付けられた。一方で、病変部位に生着した ASC 自身の(*in vivo*)分化については、組織免疫染色法により血管内皮細胞や肺胞上皮細胞への分化の可能性が示唆された。しかしながら、現時点ではさらなる検証が必要であり今後の課題の 1 つとして残った。最後に、脂肪組織幹細胞は、多くの利点 (倫理的問題の克服可能、採取に伴う少ない苦痛、若年者から高齢者まで採取可能、比較的多量の採取可能など) をもっており、今回肺気腫モデルで静脈内投与による移植法で呼吸機能の改善が著明にみられたことは、将来有効な治療法となりうると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Furuya N, Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Sakamaki A, Kida H, Handa H, Nishine H, Mineshita M, Miyazawa M. Cell therapy with adipose tissue-derived stem/stromal cells (ASC) for elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Regenerative Med.* 査読有 (*in press*)
2. Furuya N, Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Sakamaki A, Kida H, Handa H, Nishine H, Mineshita M, Miyazawa T. Pulmonary functions, angiogenic growth factors and related ones, and histological changes in elastase-induced pulmonary emphysema rat model. *J. St. Marianna Univ.* 査読有 2(2):71-77,

2011.

3. 武永美津子 太田有紀: 再生医療研究に関する最近の話題 聖マリアンナ医科大学雑誌 査読無 38:161-170, 2010.

[学会発表] (計 7 件)

1. Furuya N, Takenaga M, Miyazawa T. Effects of adipose tissue-derived stromal/stem cells transplantation on elastase-induced pulmonary emphysema in rats. European Respiratory Society Annual Congress 2011. 2011.9.28. (Amsterdam RAI convention center, Amsterdam, Netherland)
2. 古屋直樹 武永美津子 太田有紀 都倉享恵 濱口明美 宮沢輝臣: エラスターゼ誘導肺気腫モデルラットにおける ASCs 移植の効果 第 10 回日本再生医療学会 2011.3.1.(京王プラザホテル、東京)
3. 古屋直樹 武永美津子 太田有紀 濱口明美 都倉 享恵 坂巻綾 宮澤輝臣: エラスターゼ誘導肺気腫モデルラットへの脂肪組織由来幹細胞移植の効果 第 7 回東京呼吸器リサーチフォーラム 2010.11.6.(帝人株式会社グループ 東京本社 会議室、東京)
4. 太田有紀 古屋直樹 都倉享恵 濱口明美 宮沢輝臣 武永美津子: エラスターゼ誘導肺気腫ラットにおける脂肪組織由来細胞移植の効果 第 31 回日本炎症再生医学会 2010.8.5.(京王プラザホテル、東京)
5. 古屋直樹 武永美津子 太田有紀 都倉享恵 濱口明美 宮沢輝臣: エラスターゼ誘導肺気腫モデルラットにおける ASCs 移植の効果 第 50 回日本呼吸器

学会 2010.4.23.(国立京都国際会館、京都)

6. 古屋直樹 武永美津子 太田有紀 都倉享恵 濱口明美 宮沢輝臣: エラスターゼ誘導肺気腫モデルラットにおける ASCs 移植の効果 第 9 回日本再生医療学会 2010.3.19.(広島国際会議場、広島)
7. 太田有紀 井上肇 古屋直樹 山野嘉久 宮沢輝臣 熊谷憲夫 武永美津子: 脂肪組織を利用した再生治療の試み 第 18 回日本形成外科学会 2009.10.1.(都市センターホテル、東京)

[その他]

ホームページ

<http://www.marianna-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武永 美津子 (TAKENAGA MITSUKO)

聖マリアンナ医科大学 医学 (系) 研究科 (研究院) 准教授

研究者番号: 10236490

(2) 研究分担者

太田 有紀 (OHTA YUKI)

聖マリアンナ医科大学 薬理学 助教

研究者番号: 60387066