

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08215

研究課題名（和文）特発性肺線維症に対する脱分化脂肪細胞静脈内投与による治療効果の検討

研究課題名（英文）Therapeutic efficacy of intravenous administration of dedifferentiated fat cells for idiopathic pulmonary fibrosis.

研究代表者

風間 智彦（KAZAMA, Tomohiko）

日本大学・医学部・助教

研究者番号：80525668

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）：C57BL/6マウスにブレオマイシン（BLM）を経気道投与して作製した肺線維症モデルマウスに対してマウスならびにヒト由来DFATを尾静脈内に投与した結果、肺線維症モデル群のマウス肺組織では広範な炎症浸潤と膠原繊維の沈着が観察され、肺組織線維化の進行が認められたが、DFAT投与によってBLMが誘発した肺線維化の進行は抑制された。また、M1またはM2マクロファージに分化させたヒト単球由来細胞株THP-1をヒトDFATと非接触型共培養を行なった結果、THP-1由来M1マクロファージではTNF、IL-6ならびにIL-1の発現が減少し、M2マクロファージではIL-10の発現が増加することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において肺線維症モデルマウスに対するDFAT静脈内投与による治療有効性を検討するとともに、その作用メカニズムを明らかにするための解析を行なった。本研究成果は、治療法が乏しい特発性肺線維症（IPF）に対する新たな治療法の開発に結びつく見識を深めることにつながる。DFATは少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞を大量製造可能で、先行するMSCによる細胞治療をより安全安価なものとして広く普及させる可能性がある。本研究は、IPFに対する細胞治療の普及において、患者を選ばず安定した性能を示し、簡便・安価に大量調製可能な細胞源の確立を目指すものとして学術的・社会的意義のあるものとする。

研究成果の概要（英文）：Mouse models of pulmonary fibrosis (C57BL/6) injected with bleomycin (BLM) via the airway were treated with DFAT of mouse and human origin intravenously via the tail vein. Extensive inflammatory infiltrates and collagen deposition were observed in the lung tissue of the pulmonary fibrosis model mice, indicating progressive fibrosis of the lung tissue. However, DFAT administration prevented the progression of BLM-induced pulmonary fibrosis. Furthermore, contactless co-culture of THP-1, a human monocyte-derived cell line differentiated into M1 or M2 macrophages, with human DFAT showed that the expression of TNF, IL-6 and IL-1 was reduced in THP-1-derived M1 macrophages and IL-10 was increased in M2 macrophages.

研究分野：再生医学

キーワード：脱分化脂肪細胞 DFAT 特発性肺線維症 成熟脂肪細胞 間葉系幹細胞 脂肪組織由来幹細胞 マクロファージ 脱分化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は原因不明の間質性肺炎の中の約半数を占める頻度の高い疾患であり、しばしば線維化が進行して不可逆性の蜂巣肺を形成する。その有病率は、10万人あたり495件であり¹⁾、平均生存期間3~5年と多くの悪性腫瘍よりも悪い²⁾。IPF治療薬として、ピルフェニドンとニンテダニブが承認済みで、死亡率を低下させる効果を示すが^{3,4)}、症状の根本的な克服には至らない。近年、骨髄や脂肪組織等に存在する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) は、多分化能のみならず液性因子の分泌を介した抗炎症・免疫制御作用を有し、様々な疾患に対し治療効果を発揮することが明らかになっている。IPFに関しても、肺線維症モデル動物へのMSC投与実験にて肺の炎症や線維化の抑制効果を示すほか、IPF患者に対するMSC細胞治療の臨床試験も行われ一定の有効性と安全性が報告されている⁵⁾。一方で、MSCはヘテロな細胞集団であり培養に伴い治療効果が低下するといった報告や⁶⁾、患者年齢や基礎疾患に影響を受け細胞の性能が低下するといった問題点が指摘されている。したがってIPFに対する細胞治療の普及には、患者を選ばず安定した性能を示し、簡便・安価に大量調製可能な細胞源の確立が望まれる。

我々は成熟脂肪細胞を天井培養という方法で培養することにより得られる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) が、MSCに類似する高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした⁷⁾。現在までに70例以上のヒト検体にて検討した結果、DFATはドナー年齢や基礎疾患に影響されず、均質なMSC様細胞を再現性よく調製できることを確認している。我々は最近、T細胞との共培養実験により、DFATがT細胞の増殖を抑制すること⁸⁾や、細胞数依存性に制御性T細胞への分化促進作用やTh17細胞への分化抑制作用を示すことを明らかにした。これらの知見は、免疫細胞の病的活性化を主病因とするIPFに対するDFATの有効性を示唆するものである。

2. 研究の目的

我々は、成熟脂肪細胞に由来するDFATがMSCと同様に抗炎症効果や免疫制御作用を有することを明らかにした。本研究では肺線維症モデルマウスに対するDFAT静脈内投与による治療有効性ならびにマクロファージの活性化に対するDFATの影響を明らかにする目的で行なった。DFATは少量の脂肪組織から均質なMSC様細胞を大量製造可能で、先行するMSCによる細胞治療をより安全安価なものとして広く普及させる可能性がある。DFAT研究は国内外の多施設で行われているが、IPFを対象とした研究報告はなく、有効性が示せればIPFに対する新たな治療法の開発につながる。

3. 研究の方法

(1) 肺線維症モデルマウスに対するDFAT移植実験

C57BL/6マウスに対しPBSに溶解させたブレオマイシン (BLM) (2mg/kg)を経気管内投与し、肺線維症モデルを作製した。BLM投与7日後にラクテック注に懸濁したマウスDFATまたはヒトDFAT (3×10^5 個/100 μ L)を尾静脈より投与した。細胞投与3週間後に肺組織を摘出し、ヒドロキシプロリンアッセイによりコラーゲン量を定量化した。また組織切片標本作製後、ヘマトキシリン・エオジン (HE)染色、マッソントリクローム染色ならびに抗ヒトビメンチン抗体を用いた免疫染色を行なった。さらに、Ashcroftスコアを用いて線維化の程度を定量化した。実験群として正常マウスとしてのBLMと同量のPBSを経気管内投与したマウスに対してDFATまたはラクテック注を静脈内投与した群と、肺線維症モデルとしてのBLMを経気管内投与したマウスに対してDFATまたはラクテック注を静脈内投与した群の全4群で比較解析を行なった (図1)。

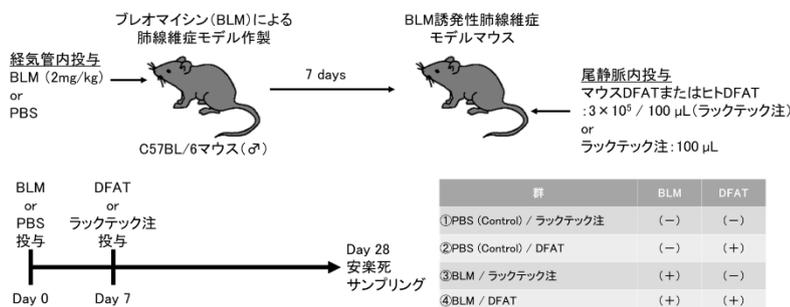


図1 肺線維症モデルマウスに対するDFAT移植実験方法

(2) THP-1 とヒト DFAT の共培養実験

肺線維化に係わる免疫細胞に対してDFATがどのような作用を示すか *in vitro* で解析を行なうために、急性単球性白血病患者より樹立されたヒト単球由来細胞株 THP-1 を、PMA 刺激によりマクロファージへ分化誘導後に LPS と INF- γ 刺激により M1 マクロファージへ分化誘導したものの、IL-4 刺激により M2 マクロファージへ分化誘導したものをそれぞれヒト DFAT とトランスウ

エルを用いた非接触型共培養を行なった(図2)。共培養24時間ならびに48時間後に、各 THP-1 誘導群より RNA 抽出と培養上清の回収を行ない、共培養後の各誘導群の THP-1 における M1 マクロファージで高発現し炎症性サイトカインとして知られる TNF α 、IL6 そして IL1 β や M2 マクロファージで高発現する TGM2 と IL10 の発現量をリアルタイム PCR や ELISA にて解析を行なった。

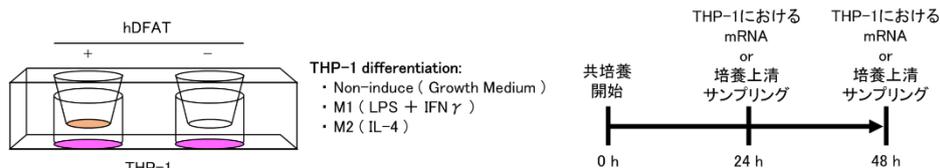


図2 THP-1とヒトDFATの共培養実験方法

4. 研究成果

(1) 各実験群においてマウス DFAT 投与3週間後にマウス肺組織を摘出し、組織切片標本作製後、HE染色を行なった。PBS投与の対照群では正常な肺構造を示したが、BLM投与の肺線維症モデル群では広範な炎症浸潤が観察され、肺構造の歪みと線維化病巣の形成がみられた。このBLMが誘発した肺構造の変化は、マウス DFAT 投与によって抑制することが示された(図3)。

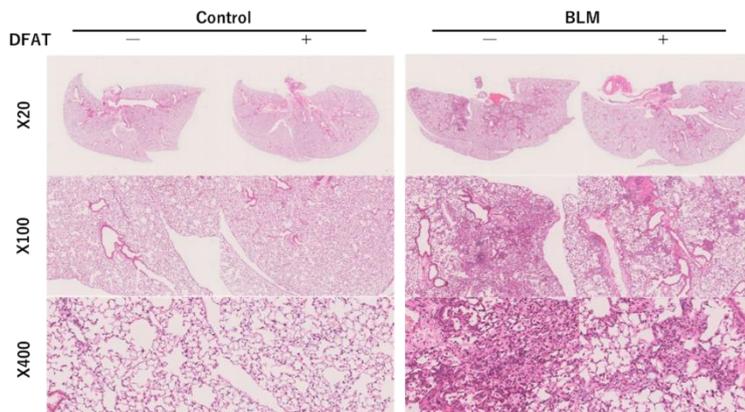


図3 マウスDFAT投与後の各群におけるマウス肺組織の病理組織学的検査 (HE染色)

(2) マウス DFAT 投与後における肺組織のコラーゲン量を Hydroxyproline assay kit を用いて測定した結果、肺組織中のコラーゲン量は、BLM 投与肺線維症モデルマウスに対するマウス DFAT 未投与群と比較して、マウス DFAT 投与群において有意に減少した(図4)。また、マウス DFAT 投与後における肺組織の線維性変化を、Ashcroft スコアに基づいて病理組織学的に定量化した。1群につき5頭のマウスを使用し、マウス1頭について約20視野中10視野を無作為に選んで検査した結果、BLM 投与肺線維症モデルマウスに対するマウス DFAT 未投与群と比較して、マウス DFAT 投与群において有意に減少した(図5)。

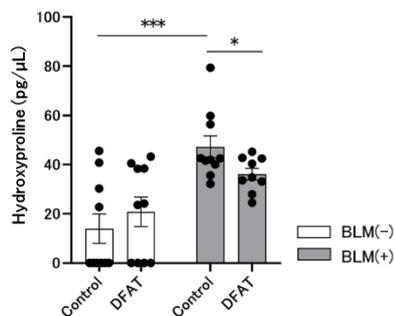


図4 マウスDFAT投与後の肺組織中コラーゲン量測定結果

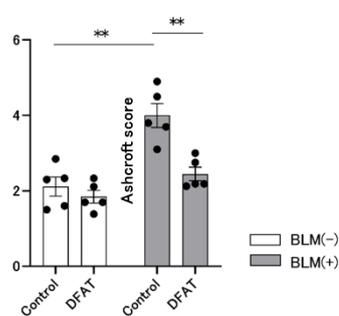


図5 マウスDFAT投与後の肺組織中コラーゲン量測定結果

(3) 各実験群においてヒト DFAT 投与3週間後にマウス肺組織を摘出し、組織切片標本作製後、HE染色を行なった。図1と同様にPBS投与の対照群では正常な肺構造を示したが、BLM投与の肺線維症モデル群では広範な炎症浸潤が観察され、肺構造の歪みと線維化病巣の形成がみられた。このBLMが誘発した肺構造の変化は、マウス DFAT 投与と同様にヒト DFAT 投与によっても抑制することが示された(図6)。

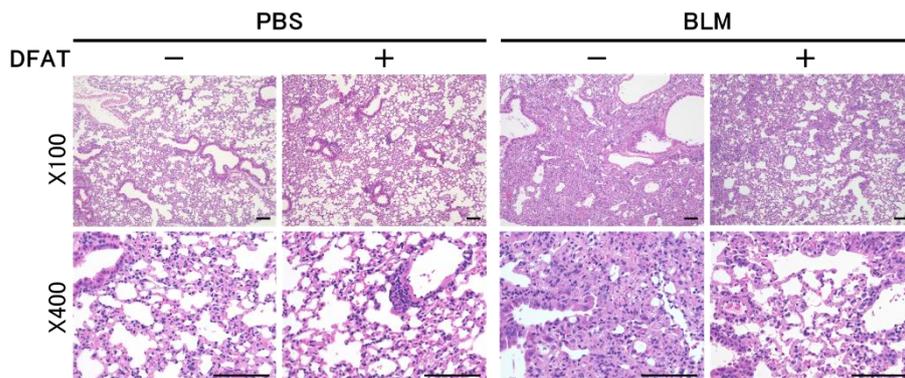


図6 ヒトDFAT投与後の各群におけるマウス肺組織の病理組織学的検査 (HE染色)

(scale:100 μm)

(4) 各実験群においてヒト DFAT 投与 3 週間後にマウス肺組織を摘出し、組織切片標本を作製後、マッソントリクローム染色を行なった。PBS 投与の対照群と比較して、BLM 投与の肺線維症モデル群では広範に膠原繊維の沈着が観察され、肺組織の線維化が進行している様子が認められたが、この BLM 投与群で認められた過剰な膠原繊維の蓄積は、ヒト DFAT 投与によって抑制することが示された(図 7)。

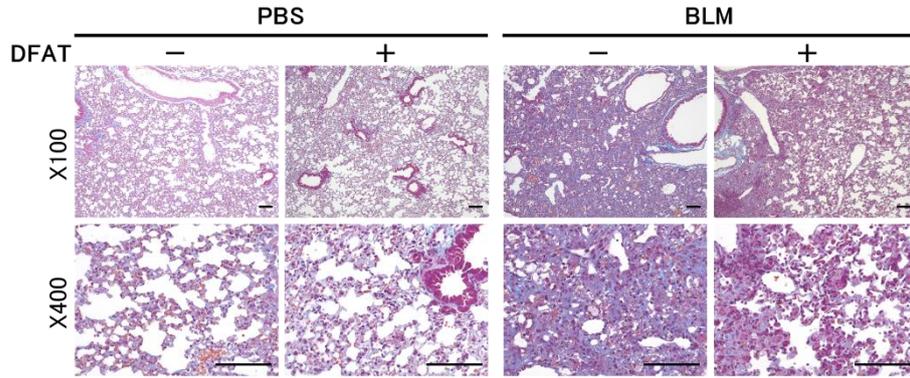


図7 ヒトDFAT投与後の各群におけるマウス肺組織の病理組織学的検査 (マッソントリクローム染色)

(scale:100 μm)

(5) ヒト DFAT 投与 3 週間後における各群肺組織のコラーゲン量を Hydroxyproline assay kit を用いて測定した結果、肺組織中のコラーゲン量は、BLM 投与肺線維症モデルマウスのヒト DFAT 未投与群と比較して、ヒト DFAT 投与群において有意に減少した(図 8)。また、各群のマウス肺組織において移植したヒト DFAT の生着や局在を調べた結果、移植 3 週間後のマウス肺組織においてヒト DFAT は全ての群において生着を認められなかった(図 9)。(scale:100 μm)

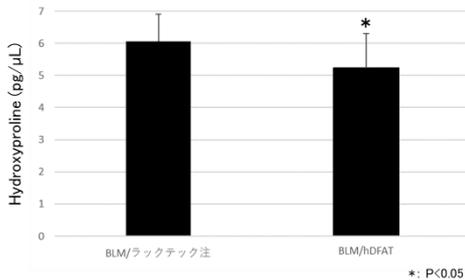


図8 ヒトDFAT投与後の肺組織中コラーゲン量測定結果

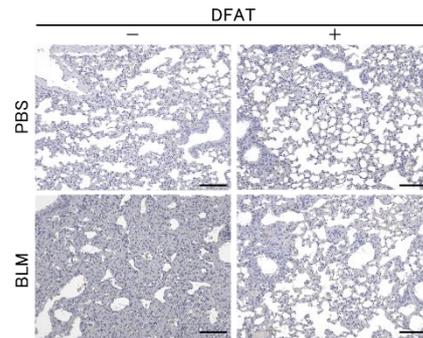


図9 ヒトDFAT投与後におけるマウス肺組織の抗ヒトメンチン抗体免疫組織染色結果

(6) M1 誘導群における THP-1 において、THP-1 単独培養と比較して TNFA や IL6 の遺伝子発現量はヒト DFAT との共培養によって有意に減少した。また、M2 誘導群における THP-1 において、THP-1 単独培養と比較して IL10 や TGM2 の遺伝子発現量はヒト DFAT との共培養によって有意に増加した(図 10)。

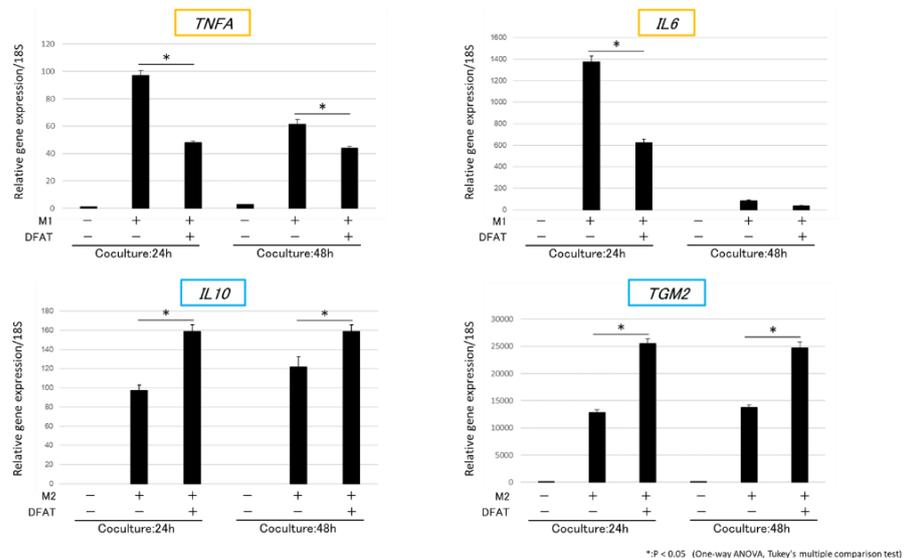


図10 ヒトDFAT共培養後のTHP-1における遺伝子発現解析

*P < 0.05 (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test)

(7) M1 誘導群における THP-1 培養上清中において、THP-1 単独培養と比較して TNF α のサイトカイン発現量はヒト DFAT との共培養によって有意に減少した。また、THP-1 単独培養と比較して IL1 β のサイトカイン発現量はヒト DFAT との共培養によって有意な差は認められなかったが減少傾向にあることを示した(図 11)。

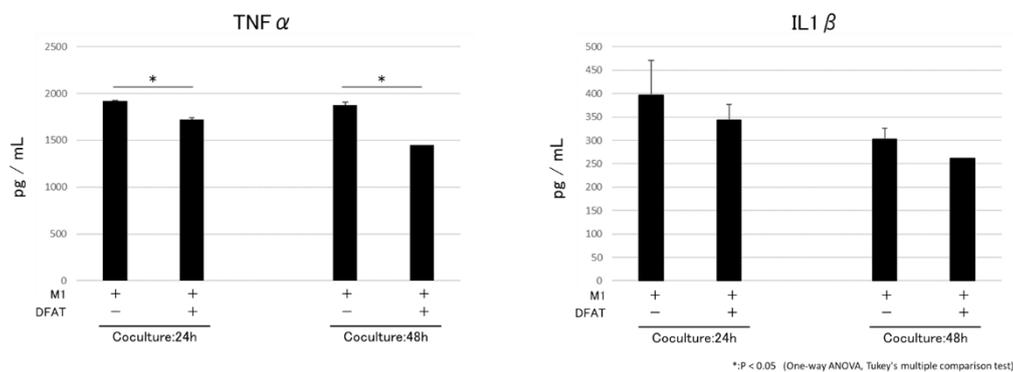


図11 ヒトDFAT共培養後のTHP-1におけるサイトカイン発現解析

以上の結果より、DFAT は肺線維化に係わる免疫細胞の抗炎症作用を増進させ、肺線維症モデルマウスに対する DFAT 静脈内投与の有効性が示された。

<引用文献>

- 1) Raghu G, et al. Lancet Respir Med. (2014) 2(7):566-72.
- 2) Tzouvelekis A, et al. Ther Clin Risk Manag. (2015) 11:359-370.
- 3) King TE Jr, et al. N Engl J Med. (2014) 370:2083-2092.
- 4) Richeldi I, et al. N Engl J Med. (2014) 370:2071-2082.
- 5) Srour N, Thebaud B. Stem Cells Transl Med. (2015) 4(12):1500-1510.
- 6) Muraglia A, et al. J Cell Sci. (2000) 113:1161-1166
- 7) Matsumoto T, et al. J Cell Physiol. (2008) 215:210-222
- 8) Ishioka S, Matsumoto T, et al. Pediatr Surg Int. (2020) 36(7):799-807

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sawada Hirokatsu, Kazama Tomohiko, Nagaoka Yuki, Arai Yoshinori, Kano Koichiro, Uei Hiroshi, Tokuhashi Yasuaki, Nakanishi Kazuyoshi, Matsumoto Taro	4. 巻 18
2. 論文標題 Bone marrow-derived dedifferentiated fat cells exhibit similar phenotype as bone marrow mesenchymal stem cells with high osteogenic differentiation and bone regeneration ability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Surgery and Research	6. 最初と最後の頁 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13018-023-03678-9	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 -
1. 著者名 Mimatsu Haruka, Onoda Atsuto, Kazama Tomohiko, Nishijima Koji, Shimoyama Yoshie, Go Shoji, Ueda Kazuto, Takahashi Yoshiyuki, Matsumoto Taro, Hayakawa Masahiro, Sato Yoshiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Dedifferentiated fat cells administration ameliorates abnormal expressions of fatty acids metabolism-related protein expressions and intestinal tissue damage in experimental necrotizing enterocolitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-34156-1	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 -
1. 著者名 Oyama Takayuki, Matsumoto Taro, Miyakata Hiroyuki, Kazama Tomohiko, Uei Hiroshi, Tokuhashi Yasuaki, Nakanishi Kazuyoshi	4. 巻 81
2. 論文標題 The Therapeutic Effect of Intravenous Injection of Dedifferentiated Fat Cells for Needle Puncture-Induced Intravertebral Disc Degeneration in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nihon University Medical Association	6. 最初と最後の頁 273～281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4264/numa.81.5_273	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 -
1. 著者名 Hidaka Ayano, Uekusa Shota, Hosokawa Takashi, Kaneda Hide, Kazama Tomohiko, Hagikura Kazuhiro, Uehara Shuichiro, Koshinaga Tsugumichi, Matsumoto Taro	4. 巻 39
2. 論文標題 Effects of dedifferentiated fat cells on neurogenic differentiation and cell proliferation in neuroblastoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-022-05304-x	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 -

1. 著者名 Tanimoto Koji, Matsumoto Taro, Nagaoka Yuki, Kazama Tomohiko, Yamamoto Chii, Kano Koichiro, Nagaoka Masahiro, Saito Shu, Tokuhashi Yasuaki, Nakanishi Kazuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Phenotypic and functional properties of dedifferentiated fat cells derived from infrapatellar fat pad	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 35 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.12.006	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 -

1. 著者名 Akita Daisuke, Kazama Tomohiko, Tsukimura Naoki, Taniguchi Yoshiki, Takahashi Rie, Arai Yoshinori, Tsurumachi-Iwasaki Niina, Yasuda Hiroyasu, Okubo Takahisa, Kano Koichiro, Matsumoto Taro, Honda Masaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Transplantation of Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells Facilitates Periodontal Tissue Regeneration of Class II Furcation Defects in Miniature Pigs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15041311	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 風間智彦、萩倉一博、山元智衣、李予昕、松本太郎
2. 発表標題 特発性肺線維症に対する脱分化脂肪細胞静脈内投与による治療効果の検討
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024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
研究分担者	水村 賢司 (MIZUMURA Kenji) (20761688)	日本大学・医学部・兼任講師 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	松本 太郎 (MATSUMOTO Taro) (50366580)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

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