

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08912

研究課題名(和文)肺由来間葉系幹細胞と一酸化炭素による急性肺傷害に対する新規治療法創出

研究課題名(英文)Amelioration of acute lung injury by lung mesenchymal stem cell and carbon monoxide.

研究代表者

大塚 崇(Ohtsuka, Takashi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40306717

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)：マウス肺由来間葉系幹細胞の抽出、培養を行い、間葉系細胞の培養を行い、安定したモデルを作成することが可能であった。マウスの肺虚血再灌流モデルの、虚血時間、再灌流時間の最適化を行った。左肺1時間の虚血、2時間の再灌流、また左肺1時間の虚血、3時間の再灌流で検討した。マウス肺虚血再灌流モデルでは左肺1時間の虚血/2時間の再灌流と左肺1時間の虚血/3時間の再灌流で肺における炎症性サイトカインと関与するmRNAの変化は両群において大きな差や認めなかったため、左肺1時間の虚血/2時間の再灌流モデルを肺虚血再灌流モデルとして採用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺由来の間葉系幹細胞の培養に成功した。これにより肺移植、急性肺障害、などの研究に応用が可能である。動物モデルにおいて間葉系幹細胞による肺疾患の治療に関する基礎研究を行う礎が確立された。

研究成果の概要(英文)：We successfully extracted and cultured mesenchymal stem cells derived from mouse lungs, establishing a stable model for mesenchymal cell culture. The optimal ischemia and reperfusion times for a mouse lung ischemia-reperfusion model were investigated. We examined ischemia of the left lung for 1 hour followed by reperfusion for 2 hours and ischemia of the left lung for 1 hour followed by reperfusion for 3 hours. In the mouse lung ischemia-reperfusion model, no significant differences were observed in the changes in inflammatory cytokines and related mRNA in the lungs between the groups with 1 hour of ischemia/2 hours of reperfusion and 1 hour of ischemia/3 hours of reperfusion. Therefore, we adopted the 1-hour ischemia/2-hour reperfusion model as the lung ischemia-reperfusion model

研究分野：Thoracic Surgery

キーワード：acute lung injury mesenchymal stem cell lung transplantation

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ARDS は COVID-19 等の感染、手術等の侵襲、肺移植後等に起こる重大な肺障害である (Ware, N Engl J Med 2000)。虚血再灌流障害、低酸素、炎症性サイトカインの惹起、Heme oxygenase-1 (HO-1) の活性低下、matrix metalloproteinases (MMP) のバランスの欠如等による肺障害が ARDS の主な病態である (Ferguson, Intensive Care Med, 2012, Minamoto, J Exp Med. 2005, Jiang, JCI 2011)。本研究の問いは、臓器障害を抑制する可能性のある一酸化炭素と肺由来間葉系細胞、またその相乗効果により ARDS を抑制可能なのか、動物の肺虚血再灌流モデルと移植モデルで検討することである。

2. 研究の目的

①人工ガス運搬体を付加した一酸化炭素が肺虚血再灌流障害を抑制するという仮説。②肺由来間葉系幹細胞が肺虚血再灌流障害を抑制するという仮説。③一酸化炭素の投与により肺由来間葉系幹細胞を誘導し、肺虚血再灌流障害の効果を増強するという仮説。④一酸化炭素、または肺由来間葉系幹細胞により制御性 T 細胞が誘導され、肺虚血再灌流障害抑制を増強するという仮説。⑤一酸化炭素または肺由来間葉系幹細胞が MMP を抑制し、肺虚血再灌流障害を抑制するという仮説。上記の仮説を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

・ T 細胞での MMP と Heme-oxygenase (HO) 発現の誘導 (仮説①の検討)
T 細胞を C57BL/6 マウス脾臓から抽出する。一酸化炭素を付加した人工ガス運搬体を 24 時間チャンバーの中で T 細胞に接触させ、コントロールの非接触群と比較検討する。MMP ファミリーの発現 (主に MMP-2, 7, 9, 13,)、HO-1, HO-2, HO-3 の発現をそれぞれ real time PCR にて検討する。

・ T 細胞、マウス肺由来間葉系幹細胞、一酸化炭素付加した人工ガス運搬体との共培養による MMP/HO-1 の発現 (仮説②、③の検討)
C57BL/6 マウスから肺由来間葉系幹細胞を抽出する。肺由来間葉系幹細胞を T 細胞と共培養し、一酸化炭素を付加した人工ガス運搬体の添加した場合、しない場合とでのフローサイトメトリーでソートした T 細胞の MMP、HO-1、サイトカインの発現を real time PCR にて検討する。

・ 一酸化炭素付加工人工ガス運搬体と肺由来間葉系細胞を接触させた場合の肺での MMP の発現 (仮説②、③の検討)
C57BL/6 マウスから摘出した肺を一酸化炭素を付加しない臓器保存液、一酸化炭素を付加した人工ガス運搬体を含む臓器保存液、一酸化炭素を付加した人工ガス運搬体と肺由来間葉系幹細胞を含む臓器保存液それぞれ 8 時間保存し、保存後の MMP ファミリーの発現 (主に MMP-2, 7, 9, 13) と炎症性サイトカイン IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 の mRNA をそれぞれ real time PCR にて発現を検討する。HO-1, HO-2, HO-3, また低酸素状態で誘導される HIF-1 の発現も PCR で検討する。

・ In vivo study 動物モデルでの肺虚血再灌流障害の検討 (仮説④、⑤の検討)
マウス肺虚血再灌流モデルを用いて人工ガス運搬体による一酸化炭素投与による MMP 発現量の肺組織内での検討、肺由来間葉系幹細胞との接触における T 細胞の浸潤と肺障害との関係を検討する。肺虚血再灌流モデルは、マウスを麻酔、挿管の上人工呼吸器管理を開始する。左側肺門を 1 時間にわたりクロスクランプし、その後クランプを解除し 2 時間の再灌流を行う。肺門クロスクランプ前の処置を以下の群に分類する。使用するマウスは C57BL/6。C57BL/6 コントロール C57BL/6 人工ガス運搬体による一酸化炭素投与群 C57BL/6 に肺由来間葉系細胞を経気管的に投与した群 C57BL/6 に人工ガス運搬体に一酸化炭素を付加し、尚且つ肺由来間葉系細胞を経気管的に投与した群。肺虚血再灌流中の肺動脈圧の測定、肺虚血再灌流後の肺組織像、免疫染色による T 細胞の局在と数、肺組織中のサイトカイン、MMP、HO-1、HIF-1 の mRNA 発現、フローサイトメトリーによる T 細胞のサブセットを検討する。血液中、のサイトカイン、各種 MMP の mRNA 発現量、HO-1、HIF-1 の発現を測定する。病理組織では各種サイトカインの免疫染色、また肺組織の電子顕微鏡解析を行う。

4. 研究成果

マウス肺由来間葉系幹細胞の抽出、培養を行い、間葉系細胞の培養を行い、安定したモデルを作成することが可能であった。

マウスの肺虚血再灌流モデルの、虚血時間、再灌流時間の最適化を行った。左肺 1 時間の虚血、2 時間の再灌流、また左肺 1 時間の虚血、3 時間の再灌流で検討した。マウス肺虚血再灌流モデルでは左肺 1 時間の虚血/2 時間の再灌流と左肺 1 時間の虚血/3 時間の再灌流で肺における炎症性サイトカインと関与する mRNA の変化は両群において大きな差や認めなかったため、左肺 1 時間の虚血/2 時間の再灌流モデルを肺虚血再灌流モデルとして採用した。

一方、ラットでの肺障害モデルも作成し、同様に肺障害の影響を検討した。ラット急性肺障害モデルにおいて、マイクロアレイ、血中サイトカイン、肺組織における好中球の浸潤数を検討した。リポポリサッカライド (LPS) による肺障害は安定して作成することが出来た。また LPS による肺障害の程度をマイクロアレイにより肺障害により大きく変化する遺伝子を特定し、また LPS による肺障害をサーファクタントの注入により障害を軽減できるかの検討を行っている。

またラット LPS 肺障害後の人工呼吸器の条件設定を細かく行った。呼気終末陽圧 (positive end expiratory pressure: PEEP) の圧、呼吸回数、自発呼吸、等でそれぞれマイクロアレイ、血中サイトカイン、肺組織における好中球浸潤数を検討した。PEEP や呼吸器回数では血中サイトカイン、肺組織における好中球浸潤数は人工呼吸器の条件により大きく変化は認めなかった。

T 細胞と肺由来間葉系幹細胞の共培養、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現について検討した。肺由来間葉系幹細胞において培養上清における MMP の各種の経時的発現を検討した。T 細胞を C57BL/6 マウス脾臓から抽出し一酸化炭素を付加した人工ガス運搬体を 24 時間チャンバーの中で T 細胞に接触させる培養実験も同様に行った。

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
研究分担者	下田 将之 (Shimoda Masayuki) (70383734)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授 (32612)	
研究分担者	橋本 浩平 (Hashimoto Kohei) (70464964)	公益財団法人がん研究会・有明病院 呼吸器外科・医長 (72602)	

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