

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390144

研究課題名(和文) 不可逆的組織破壊疾患の解明と多能性幹細胞による再生

研究課題名(英文) Analysis of tissue failure and treatment by iPSCs

研究代表者

磯部 健一 (Isobe, Ken-ichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20151441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：先進国においては高齢化人口の増加とともに、老化によって発生する肝硬変、肺気腫、肺線維症、強皮症、腎不全といった疾患の解明と、その治療が緊迫の課題である。急性の組織傷害からとiPSによる治療の可能性を検討した。本研究ではマウスをモデルとして、急性の組織傷害から慢性炎症を経て線維化へ進行し、組織の荒廃へと進むメカニズムを解明すること、その治療に、患者自身の細胞を使うことをめざした。私たちはミエロ系前駆細胞が骨髄で増加すること、それをGADD34が抑制することを見いだした。また、老化マウスからiPS細胞を作成することに成功し、この細胞を組織細胞に分化させ、疾患モデルマウスに移植する研究をおこなった。

研究成果の概要(英文)：In developed countries, human populations were getting progressively older. Many elderly patients are waiting for curative therapy for intractable diseases such as renal failure, liver cirrhosis and obstructive pulmonary disease. Continued tissue damaging stimuli induce immune cell infiltration to damaged tissue, which progresses to tissue fibrosis and finally tissue failure. We analyzed the mechanism of disease progression from tissue damage to chronic inflammation by cellular and molecular level. We found that by continuous stimuli, many innate immune cells migrate to damaged tissue from myeloid-precursors in bone marrow. GADD34 suppressed the myeloid differentiation of hematopoietic progenitor cells. We also succeeded to establish iPSCs from aged mice. We differentiated aged-iPSCs to tissue cells in vitro and transplanted to model mice such as diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：老化 組織傷害 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 私たちはこの数年、皮膚あるいは粘膜の創傷治癒の研究 活性酸素を産生する薬剤による組織損傷が、全身性強皮症 (Ishikawa JID 2008)、潰瘍性大腸炎を引き起こすメカニズムの研究 ES細胞、iPS 細胞の組織細胞への分化とマウスへの移植実験を行ってきた。私たちの仮説では一過性の組織傷害は好中球、マクロファージとB細胞によって産生される損傷自己抗原に対する抗体によるオプソニン化によって損傷組織が貪食され、回復に向かう(Nishio; Age 2008, Immunology in press)。その時、myofibroblast の一過性の増殖によってコラーゲン等の基質が産生され、例えば、皮膚ではケラチノサイトの増殖、分化によって再生がおこる。活性化されmyofibroblast は細胞老化により、変異した自己として貪食細胞に排除される。一方、活性酸素による組織傷害の持続が好中球、マクロファージといった自然免疫系細胞を次々に組織に呼び寄せ、myofibroblast の持続する増殖はコラーゲン等の基質を過剰に産生させる。このことが、組織の再生を妨げる。そして、線維芽細胞と基質のみが残った荒廃した組織となる。私たちは活性酸素を産生するプレオマイシン投与マウスが臓器の線維化を引き起こし、全身性強皮症を発症すること、そこに免疫系細胞、myofibroblastが産生するコラーゲン等基質が関与することを示した(Ishikawa JID 2008)。私たちは細胞老化の研究を長く行ってきた。線維芽細胞をin vitro で培養すると、ある回数分裂で分裂停止となるが、生存は長く続く。その状態ではp53 のリン酸化、p21/WAF1 の発現上昇がみられる。p53 等老化関連蛋白は組織幹細胞の維持から組織再生、組織発生に重要な役割を持つ。私たちは発生において、p53 のリン酸化が幹細胞の維持、分化に重要であることをp53 をリン酸化するZFP148 遺伝子欠損マウスで示した(Takeuchi, Nature Genetics 2003.)。これらのことからp53 等細胞老化に関与する分子は発生、再生においても重要な機能を持ち、それは生体の恒常性を保つ方に働く、すなわち、細胞が増殖しすぎないように調整し、再生や発生の暴走を防ぐ働きを持つと考えるに至った。一方、私たちは、ES細胞に細胞増殖因子を加え、コラーゲン上で培養すると、骨、軟骨、筋肉といった中胚葉前駆細胞へと分化できること(Sakurai, Stem cell, 2008, Stem cell research, in press)、内胚葉系への分化にもコラーゲン等のマトリックと細胞増殖因子が必要であることを見出した(投稿中)。さらに、老化マウスにおけるB細胞の若返りに若いマウスの幹細胞と共にそれをささえ、コラーゲン等細胞外基質を産生する骨髄ストローマ細胞が必要なことを示した(Hida, Immunology and Cell

Biology, in press)。これらの研究から、組織損傷時には、マクロファージ等自然免疫細胞が出すIL1 β , TNF α , IL-6 といったサイトカインを放出して、血管を緩め浸出液を組織に集め、これら浸出液、あるいは損傷組織から放出される組織幹細胞増殖因子がmyofibroblast が放出するコラーゲン等基質の助けを借りて組織細胞(皮膚ではケラチノサイトから皮膚上皮細胞)の再生に向かうと考えられる。一方、マクロファージ等貪食細胞の働きが傷害されると、炎症が長引き、抑制性マクロファージがmyofibroblast の増殖を長引かせ、細胞外基質を過剰産生し、組織が線維化に向かうと考えられる。不可逆的組織損傷のメカニズムの解明は高齢者の多くの疾患の予防治療に関連するため、国内外で研究が盛んになっている。

2. 研究の目的

(1) 急性の組織傷害から線維化へ進行し、組織の荒廃へと進むメカニズムの解明は肝硬変、肺気腫、肺線維症、強皮症、腎不全といった多くの老化に伴って発生する疾患の原因究明と治療に重要である。組織損傷は好中球、マクロファージが破壊細胞を貪食し、一時的にmyofibroblast が増殖し、再生の足場をつくり、組織幹細胞が再生することで治癒に向かう。一方、上記難治疾患は、貪食細胞が傷害組織を貪食処理仕切れず、抑制性マクロファージが、持続的に組織に存在し、myofibroblast の増殖が持続し、コラーゲン等細胞外基質が持続産生される。過剰産生された細胞外基質は血管新生や、組織幹細胞による組織の自己再生を抑制し、組織の線維化が進行する。本研究ではそのメカニズムの解明を免疫、老化、再生の観点から進め、自己iPSの利用による不可逆的組織破壊の回復実験を行う。

3. 研究の方法

(1) 組織傷害モデルマウスの作成; 急性組織傷害から慢性組織傷害さらに組織の線維化のモデルとして、皮膚の創傷治癒、DSS誘発潰瘍性大腸炎モデル、肺X線照射モデル、下肢血栓モデル、膵臓破壊による糖尿病性神経、血管障害モデルをマウスで作成し、一回だけの急性モデルと繰り返し損傷を与える慢性モデルマウスの組織の変化をH&E標本で計時的に観察した。組織に侵入する免疫細胞、とりわけ、好中球、マクロファージの割合や性質をFACS解析、免疫染色で測定した。傷害の各段階における遺伝子発現をReal time PCRで、組織細胞のシグナル伝達系をwestern blottingで計測した。

(2) 若齢C57BL/6 (B6)マウス、老齢B6マウスよりiPS細胞(Aged-iPSCs)を作成し、

それぞれを、組織細胞や、マクロファージに分化させ、損傷モデルマウスに細胞移入した。また、Aged-iPSCs と ICR マウス受精卵よりキメラマウスを作成し、Aged-iPS 細胞が真に若返っているか否か検討した。

4. 研究成果

(1)老齢マウスよりの iPS 細胞の樹立

2ヶ月、21ヶ月の B6 マウスの骨髄細胞を4日間 GM-CSF で培養することで、効率に iPS 細胞を樹立できることを見いだした(J Mol Cell Biol. 2011)。この21ヶ月マウス由来 iPS 細胞は MEF から作成した iPS 細胞同様 B6 の背部に接種すると奇形腫をつくり、拒絶されることはなかった。また、Aged-iPS 細胞をマクロファージに分化させ、マイクロビーズ内で3次元培養させたものを B6 の皮下に移植すると、B6 内でマクロファージが増殖し、機能することが判明した(Biomed Res Int. 2013)。このことより、老化マウスの組織から iPS 細胞を作成し、疾患組織細胞に分化させ、移植すれば、治療に使える可能性を示した。Aged-iPS と ICR マウスでキメラマウスを作成し、皮膚、心臓の組織を検索したところ、皮膚は Aged-iPS 細胞由来のものが20ヶ月でもみられた。このことは、Aged-iPS 細胞が少なくともすぐに老化してしまうことはないことを意味している。今後、Aged-iPS 細胞の個体内での老化速度を検討が必要である。

(2) 組織傷害モデルマウスの作成

皮膚の創傷治癒モデル、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルでは、急性期に好中球が浸潤し、創傷部位に存在する微生物の貪食のみならず、自己の破壊細胞も貪食する。骨髄、脾臓にはミエロ系前駆細胞が増殖し、創傷部位に次々に好中球、単球を供給することが明らかになった。単球は M1 マクロファージとなり好中球と同じような作用をする。その後、刺激が終了すると、M2 マクロファージの出す TGF β が miofibroblasts を増殖させ、コラーゲンが分泌され、皮膚の収縮から miofibroblasts の放出する上皮細胞増殖因子によって上皮が再生する。この刺激が繰り返されると、骨髄、脾臓にはミエロ系前駆細胞の増殖が続き、好中球、M1 マクロファージ、M2 マクロファージが共存し、炎症が繰り返される。皮膚では強皮症、腸管では自己免疫性大腸炎へと進展することがわかってきた。特に、GADD34 遺伝子欠損マウスではミエロ系細胞の分化がより早く進行することが判明した。GADD34 遺伝子欠損マウスにブドウ球菌感染させることで、ミエロ系細胞の分化が G-CSF によっておこり、GADD34 は G-CSF 受容体から JAK/STAT シグナルを抑制していることが明らかになった。糖尿病モデルマ

ウスを B6 マウスに streptozotocin を投与することで膵臓を破壊し、作成すると、下肢の血流傷害と神経障害が得られた。老齢マウス由来 iPS 細胞を PA6 上で培養し、神経堤細胞に分化させた後、このマウスに移植すると、神経症状、血流傷害が改善した(Cell Transplant.2013)。これらの移植実験では iPS 細胞の生着がみられたが、十分な量の iPS 細胞の生着を得ること、移植前に未分化な iPS 細胞をセルソーターで取り除く作業が必要なこと等、効率的な移植実験のためのさらなる工夫が必要である。

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 19 件)

Nishio N, Ito S, Isobe K. Loss of GADD34 induces early age-dependent deviation to the myeloid lineage. *Immunol Cell Biol.* 2013 Feb;92(2):170-80. 査読有

Ito S, Tanaka Y, Nishio N, Thanasegaran S, Isobe K. Establishment of Self-Renewable GM-CSF-Dependent Immature Macrophages In Vitro from Murine Bone Marrow. *PLoS One.* 2013 Oct 4;8(10):e76943. 査読有

Thanasegaran S, Cheng Z, Ito S, Nishio N, Isobe K. No immunogenicity of IPS cells in syngeneic host studied by in vivo injection and 3D scaffold experiments. *Biomed Res Int.* 2013;2013:378207. 査読有

Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y, Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita JK, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. *Sci Rep.* 2013;3:1418. 査読有

Cheng Z, Ito S, Nishio N, Thanasegaran S, Fang H, Isobe K. Characteristics of cardiac aging in C57BL/6 mice. *Exp Gerontol.* 2013 Mar;48(3):341-8. 査読有

Okawa T, Kamiya H, Himeno T, Kato J, Seino Y, Fujiya A, Kondo M, Tsunekawa S, Naruse K, Hamada Y, Ozaki N, Cheng Z, Kito T, Suzuki H, Ito S, Oiso Y, Nakamura J, Isobe K. Transplantation of neural crest-like cells derived from induced pluripotent stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice. *Cell Transplant.* 2013;22(10):1767-83. 査読有

Isobe K, Cheng Z, Ito S, Nishio N. Aging in the mouse and perspectives of rejuvenation

through induced pluripotent stem cells (iPSCs).
Results Probl Cell Differ. 2012;55:413-27. 査読有

Suzuki H, Shibata R, Kito T, Yamamoto T, Ishii M, Nishio N, Ito S, Isobe K, Murohara T. Comparative angiogenic activities of induced pluripotent stem cells derived from young and old mice. PLoS One. 2012;7(6):e39562. 査読有

Uddin MN, Ito S, Nishio N, Suganya T, Isobe K. Gadd34 induces autophagy through the suppression of the mTOR pathway during starvation. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Apr 22;407(4):692-8. 査読有

Zhang R, Ito S, Nishio N, Cheng Z, Suzuki H, Isobe K. Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1(+)/CD11b(+) cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. Clin Exp Immunol. 2011 Jun;164(3):417-27. 査読有

Cheng Z, Ito S, Nishio N, Xiao H, Zhang R, Suzuki H, Okawa Y, Murohara T, Isobe K. Establishment of induced pluripotent stem cells from aged mice using bone marrow-derived myeloid cells. J Mol Cell Biol. 2011 Apr;3(2):91-8. 査読有

Zhang R, Ito S, Nishio N, Cheng Z, Suzuki H, Isobe K. Up-regulation of Gr1+CD11b+ population in spleen of dextran sulfate sodium administered mice works to repair colitis. Inflamm Allergy Drug Targets. 2011 Feb;10(1):39-46. 査読有

〔学会発表〕(計 52 件)

NISHIO Naomi, ITO Sachiko, ISOBE Ken-ichi. Loss of GADD34 induces fatty liver diseases, type II Diabetes. 第 42 回日本免疫学会 2013 年 12 月 11 日~13 日 幕張メッセ(千葉市)

Lintao Liu, Naomi Nishio, Sachiko Ito, Yuriko Tanaka, Ken-ichi Isobe. Negative Regulation of GADD34 on Myofibroblasts during Cutaneous Wound Healing. 第 42 回日本免疫学会 2013 年 12 月 11 日~13 日 幕張メッセ(千葉市)

Ken-ichi Isobe, Sachiko Ito, Naomi Nishio, Yuriko Tanaka, Zhao Chang, Tetsuji Okawa, Suganya Thanasegaran. Toward personalized therapies by using aged patients own iPSCs (model experiments). 第 36 回日本基礎老化学会 2013 年 6 月 4 日~6 日 大阪国際会議場(大阪市)

Tanasegaran Suganya, Zhao Cheng, 伊藤佐知子、西尾尚美、磯部健一 Aged-iPS 細胞の免疫原性 第 36 回日本基礎老化学会 2013 年 6 月 4 日~6 日 大阪国際会議場(大阪市)

NISHIO Naomi, ITO Sachiko, ISOBE Ken-ichi. Loss of GADD34 induces early immuneaging: impact on the proliferation of neutrophil-lineage cells. 第 41 回日本免疫学会 2012 年 12 月 5 日~7 日 神戸国際会議場(神戸市)

ITO Sachiko, NISHIO Naomi, TANAKA Yuriko, ISOBE Ken-ichi. The expression of GADD34 is induced by various TLR ligands and affect the cytokine productions via TLR signaling. 第 41 回日本免疫学会 2012 年 12 月 5 日~7 日 神戸国際会議場(神戸市)

伊藤佐知子、西尾尚美、鈴木治彦、磯部健一 GADD34 は TSC-mTOR シグナルを介して LPS によるサイトカイン産生を制御する 第 40 回日本免疫学会 2011 年 11 月 27 日~29 日 幕張メッセ(千葉市)

西尾尚美、伊藤佐知子、磯部健一 GADD34 遺伝子欠損マウスは老化に伴いミエロ系細胞が異常増殖する 第 34 回日本基礎老化学会 2011 年 6 月 15 日~17 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔図書〕(計 2 件)

Isobe K, Nishio N, Thanasegaran S, Cheng Z, Ito S. INTECH "Tissue damage and repair caused by immune system and personalized therapy of failed organs by stem cells" 2013:363(207-220).

Ken-ichi Isobe, Zhao Cheng, Sachiko Ito, Naomi Nishio. Springer "Mouse Development From Oocyte to Stem Cells" 2012:438(413-427).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ミエロ系細胞を含有する抗炎症剤及びその用途

発明者: 磯部健一

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 単独

番号: 2011-246388

出願年月日: 2011/12/8

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/isobe116/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 健一 (ISOBE, Ken-ichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20151441

(2) 研究分担者

柴田 玲 (SHIBATA, Rei)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：70343689

室 慶直 (MURO, Yoshinao)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80270990