

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592067

研究課題名(和文) GFPラット移植肺モデルにおける Stem cell の新たな役割

研究課題名(英文) New role of stem cells in the GFP-rat lung transplantation model

研究代表者

山崎 直哉 (Yamasaki, Naoya)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70404217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ラット肺移植モデルで脂肪幹細胞の拒絶抑制効果を調べた。肺移植の2週間前にレシピエントの腹部脂肪から脂肪幹細胞を採取・培養した。移植直後に脂肪幹細胞を経静脈的に投与した群(AD)、移植後から連日タクロリムス(0.5mg/kg)を投与した群(F)、移植直後に脂肪幹細胞を投与し、タクロリムスを連日投与した群(AF)、移植後無治療群(C)の、4群を作成した。結果、F群に比してAF群は病理組織学的に拒絶のGradeが低い傾向にあった。また、AF群では血清学的にも拒絶が抑制されていた。さらに量子ドットを用いた脂肪幹細胞の蛍光染色から、投与後の脂肪幹細胞が移植肺に残存していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We established rat lung transplantation model. 2 weeks before the lung transplantation, we harvested abdominal adipose tissue from recipients, extracted adipose tissue stromal cells (ADSCs) and cultivated. We divided groups into AD (Intravenous administration of cultivated ADSCs), F (Tacrolimus administration after lung transplantation), D (ADSCs and tacrolimus intravenously after lung transplantation), and C (control). In the results, the rejection grade of AF group was lower than that of F group. The PCNA labeling index was low in AF group. In AF group, serum HGF and IL-10 were high and serum IL-2 was low, suggesting rejection of AF was low serologically. Further, Dot blot was used instead of GFP and we could observe Dot blot stained adipose stem cell in the lung in AD and D groups.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺移植 脂肪幹細胞 免疫寛容 拒絶 量子ドット

### 1. 研究開始当初の背景

肺気腫や間質性肺炎、嚢胞性肺線維症等のびまん性肺疾患は、進行的で不可逆的であり、重症化した場合、肺移植が唯一の治療法と考えられている。しかしそのドナー数は限られており、たとえ移植が行われたとしても、拒絶反応のコントロールのため、生涯にわたって免疫抑制剤を使用しなければならない。

幹細胞治療は、このような疾患に有効ではないかとの報告がなされてきた。stem cellは炎症のある部位に取り込まれやすい性質があり、組織内で血管内皮細胞や肺胞上皮細胞に分化し、肺の再生や組織障害の抑制に働く。しかし、肺に関しては技術的、倫理的な問題から臨床応用はなされておらず、未だ動物実験レベルである。

これらの幹細胞の中で、自己脂肪由来幹細胞は、倫理的、技術的問題が少なく、最も有望視されている。幹細胞治療を行う場合、多量に採取出来る。最小の侵襲で採取出来る。安全に移植できる、等の条件が報告されているが(Gimble et al Circ Res 2007)、脂肪由来幹細胞(adipose-derived stem cell; ADMSC)は、皮下脂肪から安全に採取でき、骨髄の500倍の幹細胞を含有し(Fraser et al. Trends Biotechnol 2006)、乳房再建や形成でその再生効果が実証されている。

同時に脂肪由来幹細胞は、障害肺に臓器特異的に働く有力なツールと分かってきた。ラットモデルでは、脂肪由来幹細胞を静脈投与すると、気腫肺に特異的に生着し、持続的に多量のhepatocyte growth factor(HGF)を産生して、その働きによって肺が再生する(Shigemura et al. Am J Transplant 2006)。また、脂肪由来幹細胞を細胞シートとして、気腫肺を被覆すると、肺が再生する。HGF自体の静脈内投与でも、短期的にはあるが、げっ歯類の肺の気腫化、線維化を抑制し、肺での虚血再還流障害を抑制することが報告されている(Makiuchi et al. J Heart Lung Transplant 2006)。

これらの結果より、我々は、数種の幹細胞治療の中で、脂肪由来幹細胞に着目し、肺の疾患への治療効果を検討することとした。

### 2. 研究の目的

仮説：脂肪由来幹細胞は、肺移植の分野に応用すれば、移植肺にも生着してキメラ化を促進できる可能性がある。

この研究では、脂肪由来幹細胞が肺障害を抑制するか、移植肺に生着してキメラ化を促すかを、肺移植モデルを使用して検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ラット肺移植モデルにおける幹細胞の働きの解明を目的とし、GFPラットを用いての実

験を当初予定していたが、GFPラットはSDラット由来で抗原性が強く、拒絶抑制が容易ではなかったため、ラットの種類の変更を余儀なくされた。このため、Brown Norwayラットをドナー、Lewisラットをレシピエントとして、同所性アロ左肺移植を行った。また、骨髄幹細胞を使用する予定であったが、骨髄の採取は大腿骨離断が必要であり致死的であるため、自己移植・投与が不可能であった。このため、脂肪幹細胞を使用する方針に変更した。

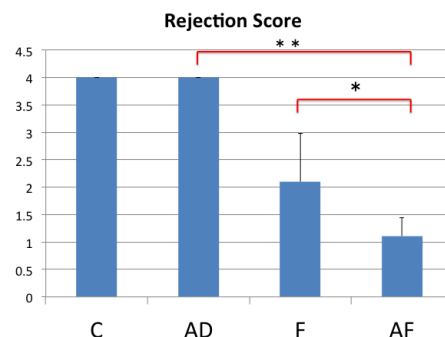
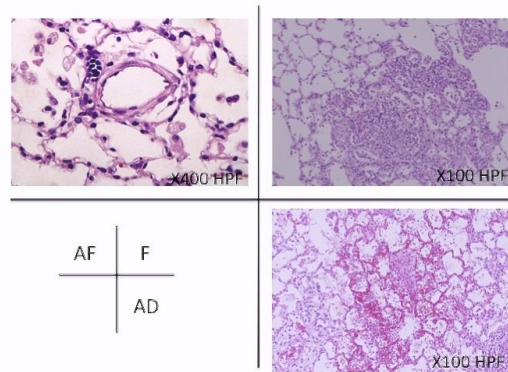
#### ラット肺移植モデル

Brown Norwayラットをドナー、Lewisラットをレシピエントとして、同所性アロ左肺移植を行った。移植の2週間前にレシピエントの腹部脂肪から脂肪幹細胞を採取・培養した。移植直後に脂肪幹細胞( $1.0 \times 10^6$ )を経静脈的に投与した群(AD)、移植後から連日タクロリムス( $0.5\text{mg/kg}$ )を投与した群(F)、移植直後に脂肪幹細胞を投与し、タクロリムスを連日投与した群(AF)、コントロールとして移植後無治療群(C)の、4群を作成した。移植1、3、7日目に犠牲死させ、病理学的評価やELISAによる血清学的評価を行った。幹細胞の局在を把握するための、GFPに変わる蛍光物質として量子ドットを用いることとした。

### 4. 研究成果

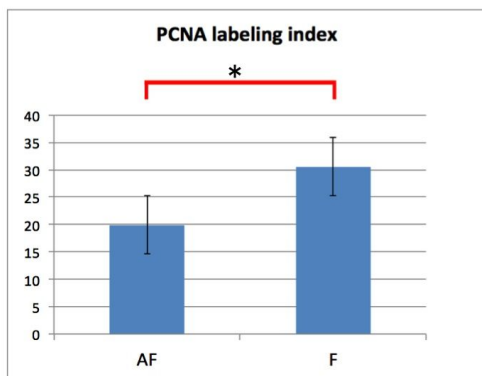
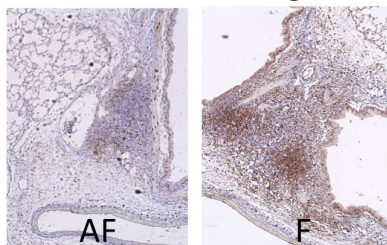
#### ラット肺移植モデル

C群とAD群の拒絶Gradeに有意差は認められなかったが、F群に比してAF群は拒絶のGradeが低い傾向にあった( $p=0.043$ )。

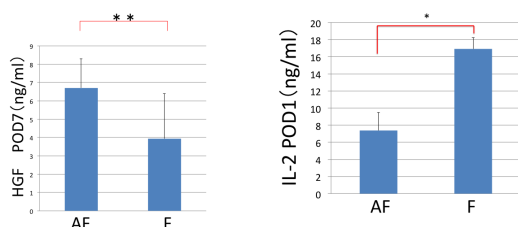


拒絶の程度の指標とされる気管支周囲リンパ節における PCNA labeling index が、AF 群において有意に低かった(p=0.03)。

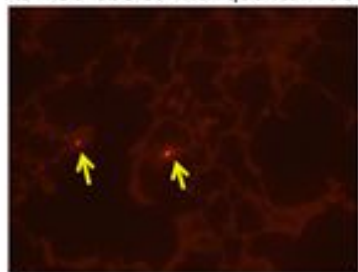
PCNA staining



また、AF 群では血中の HGF が経時的に上昇し、F 群よりも有意に高値であった。また、移植翌日の IL-2 が AF 群で有意に低値を示したことから、血清学的にも拒絶が抑制されていることが確認された。



ADMSC labeled with quantum dots



さらに量子ドットを用いた脂肪幹細胞の蛍光染色から、投与後の脂肪幹細胞が移植 7 日目の時点でもドナー肺に残存していることが確認された。以上から脂肪幹細胞による拒絶抑制の機序として、HGF 分泌による免疫

寛容が考えられた。現在発表及び投稿準備中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山崎 直哉 (YAMASAKI, Naoya)  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：70404217

##### (2) 研究分担者

土谷 智史 (TSUCHIYA, Tomoshi)  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：30437884

永安 武 (NAGAYASU, Takeshi)  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：80284686

松本 桂太郎 (MATSUMOTO, Keitaro)  
長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：80404268

宮崎 拓郎 (Miyazaki Takuro)  
長崎大学・大学病院・助教  
研究者番号：00584749