

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659625

研究課題名（和文） 臨床応用を目指したブタ間葉系幹細胞移植による新しいSIRS制御戦略

研究課題名（英文） Transplantation of Porcine Mesenchymal Stem Cell to Regulate SIRS

研究代表者

八木 洋（YAGI HIROSHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20327547

研究成果の概要（和文）：

幹細胞移植治療の効果を大動物で示すために、我々はまず手術後や多臓器不全のきっかけとなる全身の炎症状態である SIRS をブタで再現し、その病的状態がブタの骨髄由来間葉系幹細胞を細胞移植することで、治療可能かどうかを検討した。提案通りブタに薬剤性の急性膵炎を起こし、全身状態を評価した後、ブタ骨髄由来の間葉系幹細胞を移植してその効果を検討したが、急性膵炎の状態が非常に不安定であったため結果の創出が困難だった。

研究成果の概要（英文）：

To determine if local administration of mesenchymal stem cells attenuate SIRS in porcine model, we investigate SIRS model in pig by inducing acute severe pancreatitis using inflammatory drug intake. However, this model was not stable since the strength of the inflammation was variable in each pig. Therefore, the effect of cell transplantation was not able to be standardized and we could not show the benefit of the therapeutic effect of mesenchymal stem cells in SIRS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：間葉系幹細胞、ブタ、細胞移植、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

SIRS は生体において従来備わった外的ストレスへの急性反応として位置づけられている。従って外科手術、火傷、多発外傷、重要臓器障害などにより誘発され一定期間を経て沈静化する。しかしながら一度重症化すれば更なる重要臓器障害から MOF を経て自らを死に至らしめる最悪の状態に直結している。そのためこの SIRS をいかに制御するかは重症合併症の予防に重要な役割を担っている (Heidecke CD, Am J Surg, 1999)。これに対して SIRS を惹起する一つの素因である炎症性サイトカイン、特に TNF α 等の抗体をもってこれを抑制する研究は数多く成さ

れてきた (Abraham E, Crit Care Med, 2001)。しかしむしろ敗血症の重症化などの副作用によって臨床的有意性は示されなかった。この結果は近年明らかにされてきた SIRS に続く Two Hit Theory (Lederer JA, Shock, 1999) や逆に免疫抑制状態となる Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) (Oberholzer A, Shock, 2001) などの複雑な病態に対する一元的な抗体療法の限界を示した。これに対して我々は MSC の持つ抗炎症作用・免疫制御効果に着目すると共に、細胞の持つ周辺環境に対する適合性・反応性が一元的な薬剤治療とは異なる新たな『動的治療モダリティ』として臨床応

用可能ではないかと考え、ラットの炎症モデルを用いてその有用性を明らかにした (Yagi H, Mol Ther, 2010)。この結果 MSC が環境変化に反応して速やかに抗炎症性物質を産生して臓器障害を抑制した後、炎症が軽減すればその産生を速やかに減じて定常状態に戻ることが示された。これらの結果から MSC が特異な環境順応性によって従来の治療法と比較し副作用が少なくより効果的な SIRS 制御法として臨床応用可能ではないかとの考えに至った。しかしながら齧歯類の MSC が性質上ヒトとは異なる可能性が報告されており、臨床応用を考える上で MSC の近似性と様々な手術シミュレーションの可能性を考慮し、実地臨床に則した大動物モデル、特に MSC 移植モデルが報告されているブタが最も有効であると考えた。

2. 研究の目的

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) の病態をいかに制御するかは、高浸襲外科治療の術後を含めた炎症の重症化による他臓器不全 (MOF) 等を防ぐ重要な命題である。我々は間葉系幹細胞 (MSC) の強い『抗炎症作用・臓器障害抑制効果』と共に、従来の一元的な薬物療法と異なる、細胞移植治療の持つ特有の周囲炎症環境に対する速やかな適応性をラットモデルで明らかにしてきた。この研究成果により MSC を用いた治療の新たな可能性について強い基礎的エビデンスを得たため、本研究ではこれを臨床応用に向けて発展させるために、実地臨床に則したブタの急性膵炎誘発によって惹起した SIRS モデルを用い、間葉系幹細胞移植によるその制御効果を検討し、『新たな SIRS 制御モデルのイノベーション』を目指す。

3. 研究の方法

(1) 平成 23 年度の計画

①ブタ MSC の骨髄からの分離と培養

臨床応用を踏まえた自家細胞移植を行うため、急性膵炎誘発予定のブタの骨髄からすでに報告されている方法を用いて (Comite P, Transplant Proc, 2010) MSC を穿刺吸引した後、プレート固着法によって細胞を増加させる。増殖させた細胞の一部を間葉系幹細胞特異的マーカー (CD29, CD45, CD90, CD105) によるフローサイトメーターを用いて解析し、他の骨髄細胞系が混入していないか随時検査してこれを用いる。経静脈的投与での systemic な効果を発揮する細胞数として 1×10^6 個/kg が必要とされると考えられ (Krause U, Stem Cells Dev, 2007)、その細胞数まで in vitro で十分に増加させる。MSC の培養系については代表者にヒト・ラット・マウスでの十分な経験があり、また同外科学教室内ですでにブタ MSC を用いた研究が行われている

ため、これを踏襲してスムーズなブタ MSC 分離・培養システムの構築を目指す。

②ブタ炎症性血清添加による MSC の反応性の検討

コントロール群のために急性膵炎を誘発したブタの血清を採取し、ヒト MSC において行ったものと同じ方法を用いて (Yagi H, Mol Ther, 2010) MSC の培養液中に添加する。我々は LPS による敗血症を惹起したラット血清を用いてヒト MSC の反応性を検証し、MSC が血清に対しアクティブに反応して抗炎症性物質 (可溶性 TNF 受容体) を産生することを示した。この結果を踏まえ本研究ではブタ MSC からの発現が変化すると予想される炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6、IL-8、及び発現が増強されると予想される抗炎症性サイトカイン IL-10 を測定し、またすでに報告のあるサイトカイン・ケモカインに関連した種々の遺伝子発現解析を行い、MSC が炎症性周囲環境に対して動的に反応することを示す。

(2) 平成 24 年度の計画

急性膵炎誘発ブタ SIRS モデルへの間葉系幹細胞移植とその効果の検討

①動物モデルの選択について

大動物において SIRS に近似した病態を惹起する方法はいくつか提唱されている。しかしながら細菌感染のない純粋なサイトカインストームと云われる高炎症状態を、実地臨床に近い状態で再現できるモデルは少なく、その中で薬剤性に急性膵炎を惹起しその結果として SIRS 状態を短時間で誘発するモデル (Ohnesorge H, Intensive Care Med, 2003) は、本研究目的に最も合致していると考えられる。MSC の抗炎症効果はヒト細胞をラットに用いた系では、移植後 6 時間程度の早い時期から発現されることが示されており、上述のブタを用いたモデルでは薬剤性に膵炎を誘発後 4~18 時間で SIRS を惹起すると報告されているため、発現時間の上でも非常にリーズナブルなモデルであると考えられる。また細菌感染をその方法に用いないことは実地臨床のターゲットの一つである高浸襲手術における合併症の予防という目的からも推奨される。

②投与経路の選択について

すでに MSC の移植準備が整った段階で、全身麻酔下に膵管にカテーテルを留置し、タウロコルナトリウム/エンテロキナーゼを投与すると同時に経静脈的に PBS に懸濁した 1×10^6 個/kg の MSC をゆっくりと投与する。ラットモデルでは腓腹筋へ MSC を投与したが、経静脈投与がすでに大動物モデルでその安全性と有効性が報告されている点と、臨床現場では筋中投与よりも術中静脈投与の方がより現実的な経路であると考えられる点で、今回この経静脈投与を選択した。

③術後評価方法

全身麻酔下に8時間までの臨床所見(発熱、心拍、血圧、心電図、尿量)を計時的に評価し、また血清学的検査では一般生化学に加えてIL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF α 等ブタで解析可能な炎症性サイトカイン及び当科で研究を継続している炎症性メディエーターであるHMGB1 (Takano K, Shock, 2010)を測定する。すでに我々のラットモデルを用いたプレリミナリーな実験で、MSCが高炎症の状態HMGB1を抑制する傾向が示されているため、このSIRSの病態に重要な役割を担っていると考えられるHMGB1に対するMSCの効果を本研究においても明らかにしたい。全身麻酔下から復帰した後、7日間まで計時的に血清学的所見を解析すると共に14日目以降の長期生存率についても評価し、『MSCの持つSIRSの短期的・長期的制御効果を評価する』。また術後24時間、48時間、7日間、14日間において各臓器を採取し、経静脈的に投与したMSCの局在と急性膵炎の炎症の程度について、ラットモデルで行った各種の抗体を用いた免疫染色法(CD90、CD105、好中球浸潤、単球浸潤)により評価する。ラットモデルでは筋肉中に移植したMSCが24時間後でも局所に留まっている像が認められたため、本研究では同じく24時間後に肺・肝臓・脾臓など細胞が生着しやすく、MSCの局在としてすでに報告のある臓器を中心に計時変化を評価する。このMSCの局在の評価は今後の臨床応用を考えた上で副作用や免疫反応を考える上で非常に重要な要素となると考える。

4. 研究成果

(1)ブタ膵炎モデルについて

膵炎モデル確立のため、ブタに薬剤投与を行った後、膵臓を摘出し、病理学的に膵臓の炎症状態を評価した(図1)。膵臓は全体に浮腫を呈し、赤色に炎症性変化を伴っており、薬剤性の膵炎として十分に細胞移植を評価するモデルとして有用であると考えられた。しかしながら、薬剤投与量と膵炎の程度が相関せず、またブタの全身状態の悪化が急速であることから、安定した結果が得られず、多くのブタを使用して反復評価を行ったが、そのバラつきを抑えることができなかった。このようにブタSIRSモデルの安定化に時間を費やすこととなった。

最終的に死亡率や血液データではなく、病理組織学的な評価を重要視することで、細胞移植の効果をある程度示すことができると考えられたため、薬剤投与から一定の期間を定め、その時点で膵臓を採取して、炎症の程度を細胞浸潤や組織破壊、構造の破綻などか

ら評価することとした(図2)。

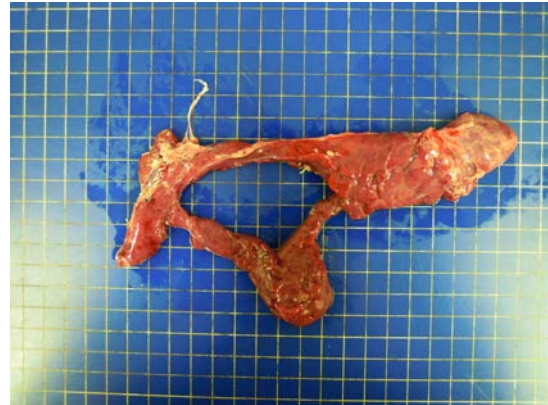


図1 (ブタ摘出膵臓)

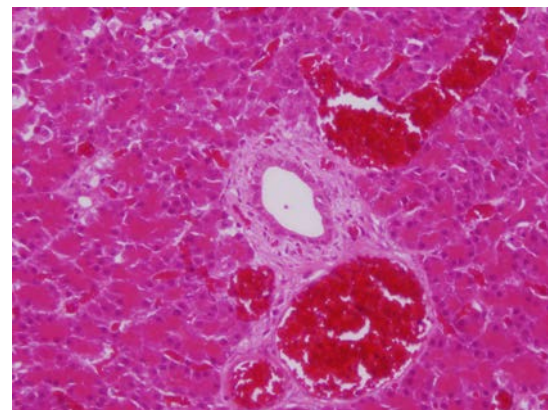


図2 (ブタ膵臓組織)

(2)細胞移植について

ブタ間葉系幹細胞の培養手法は数種類の培地を使用する中で、安定的に可能となり、大量の細胞を得ることができた。ここにGFP遺伝子を導入することによって(図3)、移植後の組織評価において、注入した細胞の局在を同定し、周囲組織との差別化を図ることが可能となった。これによって、まず正常ブタの膵臓周囲に間葉系幹細胞を移植し、7日間に組織学的に評価した。間葉系幹細胞は正常状態では、ほとんどが7日以内には消失することが判明したため、膵炎モデルの安定化を待って、細胞移植実験を開始したが、ブタSIRSモデルが不安定であったために、細胞移植のタイミングが定型化できず、本研究申請期間内で、細胞移植の効果までを判定するに至らなかった。

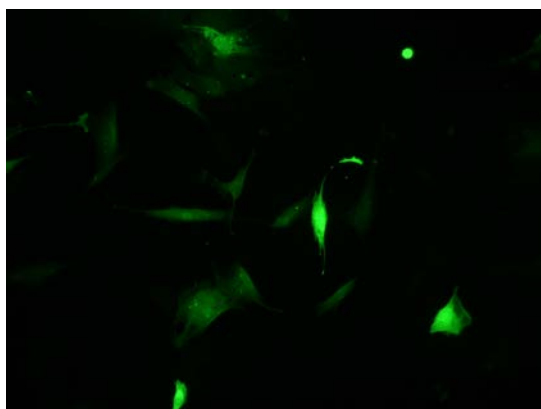


図3 (GFP 導入 間葉系幹細胞)

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)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 洋 (YAGI HIROSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20327547

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松崎 有未 (MATSUZAKI YUMI)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：50338183