

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591149

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞由来液性因子の代謝変容作用を用いた呼吸器難治病態の制御

研究課題名(英文) New Therapy for Intractable Pulmonary Fibrosis using Humoral Factors released from Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

大河内 眞也 (Ohkouchi, Shinya)

東北大学・環境・安全推進センター・講師

研究者番号：40375035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- $\beta$ 1や過酸化物質などの炎症惹起物質が、骨髄間葉系幹細胞からの大量のStanniocalcin-1分泌を誘導することを発見した。以上より間葉系幹細胞の特発性肺線維症に対する線維化抑制作用にはSTC1が重要と仮説を立て検証を行った。薬剤(プレオマイシン)によりマウスに誘導した肺線維症において、STC1は肺胞上皮細胞の小胞体ストレスを軽減することにより、肺胞上皮細胞のTGF- $\beta$ 1産生・分泌を抑制し、その結果、肺の線維化を抑えることを明らかにした。本研究成果を米国遺伝子治療学会の機関誌Molecular therapyに掲載した(Molecular Therapy 2015, 23, 549)。

研究成果の概要(英文)：Continuous ER-stress changes the secretory status of AECs and increase the synthesis, and secretion of pro-fibrotic humoral factors including TGF-beta 1 from AECs. TGF-beta 1 promotes the change from fibroblasts to myo-fibroblasts which is essential for the formation of fibrosis. Recent studies show that Mesenchymal stem cells (MSCs) ameliorate fibrosis in bleomycin inhalation mice (IPF model mice). MSCs can reduce ER-stress of cells in microenvironment under harmful conditions however that mechanism is still unknown. We has shown that protein hormone STC1 reduce endothelium reticulum stress (ER-stress) pulmonary fibrosis in Bleomycin-induced fibrosis mice. We published our work in Molecular Therapy, 2015, 23, 549.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：間葉系幹細胞 特発性肺線維症 間質性肺炎 小胞体ストレス 過酸化ストレス

#### 1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞の経静脈投与が、特発性肺線維症の動物モデルであるマウスのプレオミシン誘導肺障害を軽減することは既知である。過去の我々の研究により骨髄間葉系幹細胞は Stanniocalcin-1 (STC1) を分泌することにより肺胞上皮を保護することがわかってきたが、STC1 が肺線維症を治癒させるかどうかはわかっていなかった。

#### 2. 研究の目的

STC1 が難治性である特発性肺線維症に対する治療効果を持ち得る階中、メカニズムを含めて解明すること。

#### 3. 研究の方法

マウスのプレオマイシン誘導肺線維症モデルに STC1 を投与することにより効果とメカニズムについて検討した。

#### 4. 研究成果

TGF- $\beta$ 1 や過酸化物質などの炎症惹起物質が、骨髄間葉系幹細胞からの大量の Stanniocalcin-1 分泌を誘導することを発見した。以上より間葉系幹細胞の特発性肺線維症に対する線維化抑制作用には STC1 が重要と仮説を立て検証を行った。薬剤(プレオマイシン)によりマウスに誘導した肺線維症において、STC1 は肺胞上皮細胞の小胞体ストレスを軽減することにより、肺胞上皮細胞の TGF- $\beta$ 1 産生・分泌を抑制し、その結果、肺の線維化を抑えることを明らかにした。本研究成果を米国遺伝子治療学会の機関誌 Molecular therapy に掲載した (Molecular Therapy 2015, 23, 549)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Manabu Ono, \*[Shinya Ohkouchi](#), [Masahiko Kanehira](#), Naoki Tode, Makoto Kobayashi, [Masahito Ebina](#), Toshihiro Nukiwa, Toshiya Irokawa, Hiromasa Ogawa, Takaaki Akaike, Yoshinori Okada, Hajime Kurosawa, Toshiaki Kikuchi and Masakazu Ichinose. Mesenchymal Stem Cells Correct Inappropriate Epithelial–mesenchyme Relation in Pulmonary Fibrosis Using Stanniocalcin-1. Molecular Therapy. 23, 549–560; 2015. \*Corresponding Author, 査読有り。
2. Keiichi Akasaka, Takahiro Tanaka, Takashi

Maruyama, Nobutaka Kitamura, Atsushi Hashimoto, Yuko Ito, Hiroyoshi Watanabe, Tomoshige Wakayama, Takero Arai, Masachika Hayashi, Hiroshi Moriyama, Kanji Uchida, [Shinya Ohkouchi](#), Ryushi Tazawa, Toshinori Takada, Etsuro Yamaguchi, Toshiro Ichiwata, Masaki Hirose, Toru Arai, Yoshikazu Inoue, Hirosuke Kobayashi, Koh Nakata. A mathematical model to predict protein wash out kinetics during whole-lung lavage in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 308, 105-117; 2015. , 査読有り。

3. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, Kim DS, Kolb M, Nicholson AG, Noble PW, Selman M, Taniguchi H, Brun M, Le Maulf F, Girard M, Stowasser S, Schlenker-Herceg R, Disse B, Collard HR; INPULSIS Trial Investigators including Corte T, Davies H, Glaspole I, Mulder J, Veitch E, De Vuyst P, Liistro G, Sibille Y, Vincken W, Wuyts W, Fell C, Hernandez P, Kolb M, Undurraga A, Bai C, Chen P, Gao Z, Kang J, Li H, Li Z, Wan H, Wang H, Wen F, Xiao Q, Xu Z, Zhang W, Zheng X, Zhu H, Pauk N, Reiterer P, Vasakova M, Hodgson U, Bourdin A, Cadranel J, Camus P, Chanez P, Cottin V, Crestani B, Israel-Biet D, Jouneau S, Lebargy F, Marquette C, Prévot G, Valeyre D, Wallaert B, Bonnet R, Costabel U, Gläser S, Grohé C, Guenther A, Hammerl P, Höffken G, Karagiannidis C, Kirschner J, Kirsten A, Korn S, Kreuter M, Müller-Quernheim J, Neurohr C, Pfeifer M, Schönfeld N, Wiewrodt R, Antoniou K, Daniil Z, Diamantea F, Koulouris

- N, Mathioudakis G, Ghosal A, Kadappa Shivappa S, Kawedia M, Khatavkar P, Kumar A, Mehta P, Singh V, Srikanth K, Thakker H, Udwadia Z, Egan J, Fink G, Kramer M, Yigla M, Agostini C, De Benedetto F, Harari S, Luppi F, Paggiaro P, Tavanti L, Pesci A, Poletti V, Rottoli P, Saltini C, Sanduzzi Zamparelli A, Vancheri C, Bando M, Hasegawa Y, Hashimoto K, Homma S, Inase N, Inoue Y, Arai T, Izumi S, Kawamura T, Kishi K, Kondo Y, Kuwano K, Miura Y, Nishioka Y, Nishiyama O, Ogura T, [Ohkouchi S](#), Saito T, Setoguchi Y, Shindoh J, Taguchi Y, Tanakadate M, Tomii K, Sugita Y, Yamaguchi T, Yoshimori K, Jeong S, Kim D, Kim Y, Park C, Song J, Uh S, Selman M, Bresser P, Grutters J, Wijssenbeek M, Arrobas A, Cardoso J, Costa R, Morais A, Neves S, Serrado M, Ilkovick M, Vizel A, Alfageme Michavila I, Ancochea J, Castillo Villegas D, Molina-Molina M, Morell F, Xaubet A, Aktogu Ozkan S, Kayacan O, Ongen G, Mogulkoc N, Tuncay E, Beirne P, Bettinson H, Burge P, Dempsey O, Maher T, Millar A, Spencer L, Thickett D, Alvarez J, Andrews C, Bajwa O, Baker A, Baughman R, Belperio J, Bradley J, Collard H, Cordova F, Daniels C, de Andrade J, Dushay K, Enelow R, Ettinger N, Gibson K, Gotfried M, Hajari Case A, Hotchkin D, Huggins J, Kaye M, Kershaw C, Kureishy S, Lancaster L, Lederer D, Mageto Y, Masson J, Meyer K, Mohabir P, Morrison L, Nathan S, Noth I, Oelberg D, Rahaghi F, Riley D, Rizzo A, Rossman M, Ruzi J, Sachs P, Schaumberg T, Scholand M, Schroeder C, Seifer F, Shea J, Sinkowitz D, Tabak J, Taylor J, Thompson J, Thurm C, Tita J, Wencel M, Westerman J, Lasky J, Demedts M, Casteels M, Loddenkemper R, Michaelis J, Lasky J, Demedts M, Roman J, Tino G, Luisetti M. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 370, 2071-82; 2014. , 査読有り。
4. [Kanehira M](#), Kikuchi T, Santoso A, Tode N, Hirano T, [Ohkouchi S](#), Tamada T, Sugiura H, Harigae H, Ichinose M. Human marrow stromal cells downsize the stem cell fraction of lung cancers by fibroblast growth factor 10. *MOL CELL BIOL.* 34, 2848-56; 2014. , 査読有り。
  5. Hisata S, Moriyama H, Tazawa R, [Ohkouchi S](#), Ichinose M, [Ebina M](#). Development of pulmonary alveolar proteinosis following exposure to dust after the Great East Japan Earthquake. *Respir Investig.* 51, 212-6; 2013. , 査読有り。
  6. Tazawa R, Inoue Y, Arai T, Takada T, Kasahara Y, Hojo M, [Ohkouchi S](#), Tsuchihashi Y, Yokoba M, Eda R, Nakayama H, Ishii H, Nei T, Morimoto K, Nasuhara Y, [Ebina M](#), Akira M, Ichiwata T, Tatsumi K, Yamaguchi E, Nakata K. Duration of benefit in patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis after inhaled GM-CSF therapy. *Chest.* 145, 729-37; 2013. , 査読有り。
  7. [Ohkouchi S](#), Shibuya R, Yanai M, Kikuchi Y, Ichinose M, Nukiwa T. Deterioration in regional health status after the acute phase of a great disaster: respiratory physicians' experiences of the Great East Japan Earthquake. *Respir Investig.* 51, 50-5; 2013. , 査読有り。
  8. Satoh H, Tazawa R, Sakakibara T, [Ohkouchi S](#), Ebina M, Miki M, Nakata K, Nukiwa T. Bilateral peripheral infiltrates

refractory to immunosuppressants were diagnosed as autoimmune pulmonary alveolar proteinosis and improved by inhalation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor. Intern Med. 51, 1737-42; 2012. , 査読有り。

9. Chiba S, Ohta H, Abe K, Hisata S, Ohkouchi S, Hoshikawa Y, Kondo T, Ebina M. The Diagnostic Value of the Interstitial Biomarkers KL-6 and SP-D for the Degree of Fibrosis in Combined Pulmonary Fibrosis and Emphysema. Pulm Med. 2012-492960, 2012 (Epub). , 査読有り。
10. Kanehira M, Kikuchi T, Ohkouchi S, Shibahara T, Tode N, Santoso A, Daito H, Ohta H, Tamada T, Nukiwa T. Targeting lysophosphatidic acid signaling retards culture-associated senescence of human marrow stromal cells. PLoS One. 7: e32185, 2012. , 査読有り。
11. Ohkouchi S, Block GJ, Katsha AM, Kanehira M, Ebina M, Kikuchi T, Saijo Y, Nukiwa T, Prockop DJ. Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1. Mol Ther. 20, 417-23, 2012. , 査読有り。

〔学会発表〕(計3件)

1. Shinya Ohkouchi, Manabu Ono and Masakazu Ichinose: The enhancement of Stanniocalcin-1 (STC1) secretion increases the ability of mesenchymal stem cells (MSCs) to reduce bleomycin-induced lung fibrosis in a mouse model through inhibition of endoplasmic reticulum stress (ER-stress)/TGFbeta1 pathway. European Respiratory Society 年次総会; 2014.9.6-10, ミュンヘン・ドイツ

2. Manabu O, Shinya O, Masahiko K, Naoki T, Toshiaki K, Masakazu I: The Enhancement Of Stanniocalcin-1 (STC1) Secretion Increases The Ability Of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Reducing Bleomycin-Induced Lung Fibrosis In Mice Model Through Inhibition Of ROS/Endoplasmic Reticulum Stress (ER-Stress)/TGFbeta1 Pathway. In: C108 IS THERE ANYTHING THEY CAN'T DO? DIVERSE FUNCTIONAL ACTIVITIES OF MESENCHYMAL STEM AND STROMAL CELLS. edn.: American Thoracic Society 年次総会; 2014.5.16-21, サンディエゴ、アメリカ
3. Manabu Ono\*, Shinya Ohkouchi, Masahiko Kanehira, Naoki Tode, Makoto Kobayashi, Tadahisa Numakura, Toshiaki Kikuchi and Masakazu Ichinose. The enhancement of Stanniocalcin-1 (STC1) secretion of Multipotent-Stromal-Cells (MSCs) increases the ability to reduce bleomycin-induced lung injuries. アジア太平洋呼吸器学会 2013. 11.11-14, 横浜

〔図書〕(計8件)

1. 大河内眞也, 一ノ瀬正和: 呼吸器系薬(間質性肺炎治療薬、去痰薬、気管支拡張薬). 治療薬 up-to-date2014 : 357-392, メディカルビュー社, 2014.1
2. 海老名雅仁、久田修、大河内眞也、田澤立之: 血液疾患を基礎疾患としない続発性肺胞蛋白症の解析. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難治性稀少肺疾患(肺胞蛋白症、先天性間質性肺疾患、オスラー病)に関する調査研究班」平成24年度分担研究報告書: 137-142, 2013.5
3. 玉田勉, 大河内眞也, 一ノ瀬正和: 肺胞蛋白症における呼吸機能異常. 呼吸(12): 1117-1123, 2012.12 一般社団法人呼吸研究

4. 大河内眞也、海老名雅仁、貫和敏博：自己免疫性肺胞蛋白症 GM-CSF 吸入療法後の長期経過の検討。厚生労働省難治性疾患克服研究事業「肺胞蛋白症の難治化要因の解明と診断、治療、管理の標準化と指針の確立に関する研究班」平成 23 年度分担研究報告書：70-78, 2012.5

5. 大河内眞也、海老名雅仁、貫和敏博：重症自己免疫性肺胞蛋白症症例の明確化に関する研究。厚生労働省難治性疾患克服研究事業「肺胞蛋白症の難治化要因の解明と診断、治療、管理の標準化と指針の確立に関する研究班」平成 22-23 年度総合研究報告書：70-78, 2012.5

6. 阿部恭子, 千葉茂樹, 伊藤貴文, 廣田直, 久田修, 太田洋充, 大河内眞也, 貫和敏博, 海老名雅仁：筋線維芽細胞に於ける pirfenidone と cyclosporine の抗線維化作用の併用効果の検討。難治性肺疾患克服研究事業「びまん性肺疾患に関する調査研究」平成 23 年度報告書：261-264, 2012.3

7. 土橋佳子、貫和敏博、杉山幸比古、田澤立之、大河内眞也、井上義一：自己免疫性肺胞蛋白症の症例。「肺胞蛋白症の診断、治療、管理の標準化と指針」平成 22-23 年度厚生労働省難治性疾患克服研究事業研究班編：72-84, 2012.3

8. 久田修, 千葉茂樹, 阿部恭子, 太田洋充, 大河内眞也, 海老名雅仁：in vitro での LXR アゴニストの抗線維化作用, 難治性肺疾患克服研究事業「びまん性肺疾患に関する調査研究」平成 23 年度報告書：265-269, 2012.3

#### 〔産業財産権〕

出願状況（計 3 件）

出願：2012.7.3、出願番号：20140135266、出願の名称：「Pharmaceutical composition for preventing or treating fibrosis」、その他 WO2013008681 A1、EP2730288A1、EP2730288A4、「線維症予防又は治療用医薬組成物」、「Pharmaceutical composition for preventing or treating fibrosis」として日米欧で公開中。

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大河内 眞也 (Shinya Ohkouchi)  
東北大学・環境・安全推進センター・講師  
研究者番号：40375035

##### (2) 研究分担者

海老名 雅仁 (Masahito Ebina)  
東北薬科大学・病院・教授  
研究者番号：10280885

##### (3) 連携研究者

兼平 雅彦 (Masahiko Kanehira)  
東北大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90374941