

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790806

研究課題名(和文)肺線維化進展における組織幹細胞・前駆細胞の意義の解明とその免疫学的除去の試み

研究課題名(英文)Significance of tissue progenitor cells in progression of lung fibrosis and immunological depletion of progenitor cells

研究代表者

坂上 拓郎(SAKAGAMI, TAKURO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00444159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維化の進展機序として組織幹細胞の分化異常が関与することを仮説として研究を遂行した。マウスを用いて組織幹細胞を免疫学的に除去するモデルを作成した。肺組織より組織幹細胞を抽出し、マウス骨髄より誘導した抗原提示細胞に認識させたのち投与した。その個体にブレオマイシンで間質性肺炎を惹起した。同個体では、体重減少が強くまた炎症からの回復が遅延し、個体に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This investigation was performed following the hypothesis that abnormal differentiation of tissue stem cells might be one of the development mechanisms of lung fibrosis. Creating the mice model which tissue stem cells were depleted immunologically. Extracting the tissue stem cells from lung, after apoptosis was induced, it was administered to antigen presenting cells (APC) differentiated from mice bone marrow cells. APCs were administered to mice, then interstitial pneumonia was induced by bleomysine. High mortality rate and delayed recovery from inflammation were revealed in these mice.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：組織幹細胞 間質性肺炎 線維化 分化

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF) は既存の治療に対して抵抗性であり、厚生省の調査研究班による試算では1万数千人の患者が全国に存在するとされている。緩徐進行性であり、数年の経過で末期呼吸不全に至る例が多い。強力な抗炎症療法であるステロイドホルモンを用いた治療においても反応性は乏しく、今まで考えられていたような炎症をベースとした疾患とは考えにくい側面がみられる。病因は外因論、内因論含め確定的なものは不明であり、複数の動物モデルも提唱されているがヒトの IPF 病態を忠実に再現するモデルはなく、研究ターゲットとされるべき肺内環境の詳細や細胞さえも判然としていない。

そういった知見から既に考えられていた病因ではなく、新たな病因論として、組織障害後の治癒過程の異常が提唱されてきた。一般に組織障害後の治癒・再生過程は組織発生過程を模倣するという知見が集積されており、障害組織に存在する組織幹細胞の増殖と分化、また同時に循環血液を通して骨髄より幹細胞・前駆細胞の供給がおこり、局所での終末分化を経て修復に寄与することが考えられている。その過程に何らかの障害が生じる事により、幹細胞・前駆細胞の分化異常が生じ、その帰結として線維化の進行が起こることが想定された。

実際に肺線維化に寄与することが言われている幼弱な循環血液中の線維細胞は Th1 型のサイトカイン存在下では繊維芽細胞への変化が抑制されることが報告されている (J Leukoc Biol. 2008 ;83(6):1323-33)。またブレオマイシン誘発間質性肺炎モデルでは、CD133 を表面マーカーとして発現する細胞群が、その線維化進展に抑制的な役割を果たすであろうことが報告され、CD133 が組織幹細胞の代表的な表面マーカーであることから、肺組織においてもその線維化進展に組織幹細胞・前駆細胞が重要な役割を果たす可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

背景に記したような、今までの炎症をベースとした肺線維化の進展機序では矛盾が見出される側面から、組織幹細胞からの再生・分化異常が線維化の進展に寄与するという仮説をたてた。以下の2点を主目的とした。

(1)

当施設での間質性肺炎例のデータベースを構築し、そこから症例を抽出しヒトにおける末梢血中と肺組織中の幹細胞マーカーである Prominin-1 (PROM1: CD133) 陽性細胞分画と各間質性肺炎症例での臨床病態との比較を通してその役割を明らかにすること。

(2)

マウスモデルでの同細胞群の果たす役割を検討するために、同細胞群を細胞ワクチン療

法により免疫学的除去を試みることに。

3. 研究の方法

(1) ヒト検体での観察としては、PROM1 陽性細胞の病態への寄与を検討することとした。当施設における間質性肺炎症例のデータベース化を行い、それにより以下の項目を行うこととした。各間質性肺炎病型を抽出し末梢血中の PROM1 陽性細胞数の比較を行う。病勢、臨床状況 (各種血清マーカー、呼吸機能等) との相関を検討する。肺組織型との相関を検討する。各病型における PROM1 陽性細胞の遺伝子発現様式の違い4項目を検討し、同細胞がヒトにおいて肺線維化進行に促進的、あるいは抑制的に寄与するのかを明らかにする

(2) マウスを用いた研究としては、外来性の PROM1 陽性細胞投与はブレオマイシン肺線維症モデルで線維化の抑制をもたらすことがすでに報告されている。そこで、以下の項目を検討することとした。モデルマウスで組織障害時に内因性の PROM1 陽性細胞の肺内動態を検証する。分離した PROM1 陽性細胞の抗原性分子の抽出を行う。最終的に肺内 PROM1 陽性細胞を、抗原提示細胞に認識させワクチンすることにより免疫学的除去を行う。

4. 研究成果

(1) Prominin-1 陽性細胞の肺障害からの回復過程での増殖

10 週例の雄 ICR マウスに、ブレオマイシンを肺内噴霧し炎症を惹起した。コントロールマウスには PBS を噴霧した。3 日後、7 日後、14 日後に肺を切除し、コラゲナーゼ処理による遊離細胞にした。抗マウス CD133 抗体を用いて細胞表面を染色し、フローサイトメトリーを用いて検出した。

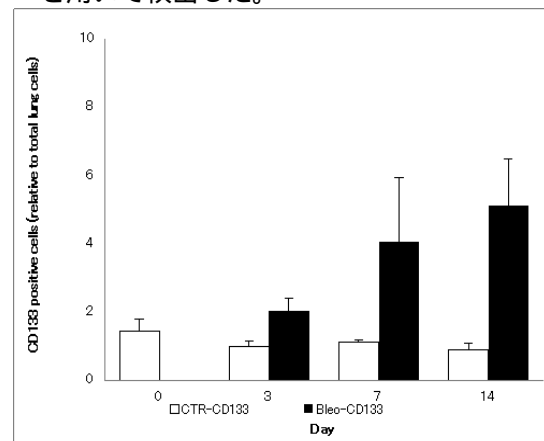


図1. 遊離肺細胞中の CD133 陽性細胞の割合

ブレオマイシン負荷後3日目には CD133 陽性細胞割合の増加がみとめられ、その増加は14日後まで続いた。炎症を惹起しないマウスでは組織幹細胞と考えられる CD133 陽性細胞の増加は認められなかった。

## (2) 磁気吸着カラムを用いた CD133 陽性細胞の分離

肺分離細胞より磁気吸着カラムを用いて CD133 陽性細胞を分離した。ビーズ附着マウス抗 CD133 抗体を反応させたのちに、吸着カラムの複数回通過させた。

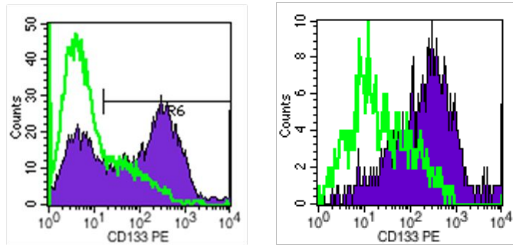


図 2 . 抽出された CD133 陽性細胞の純度

1 回のみでは純度の高い抽出は困難であり (左図)、4-5 回のカラム通過にて (右図) 純度の高い CD133 陽性細胞が抽出された。

## (3) 肺 CD133 陽性細胞の免疫学的除去

ICR マウス骨髄細胞より GM-CSF を用いて抗原提示細胞を誘導した。また、定常状態の肺およびプレオマイシンにより炎症を惹起した肺より抽出した CD133 陽性細胞に UV 照射を行いアポトーシスを誘導した。前述の抗原提示細胞とアポトーシス誘導 CD133 陽性細胞を共培養し食食させた。これは、CD133 陽性細胞中のなんらかの抗原を認識した細胞を作成することと理解できる。その抗原提示細胞を、ICR マウスへ移入したのちに、プレオマイシンにて肺炎症を惹起した。時間経過で全身状態、肺炎症状況の解析を行った。

全身状態としての各群の体重変化は、炎症を惹起した際の肺より抽出した CD133 陽性細胞を用いて抗原提示細胞を誘導した群ではコントロール群を比して変化を認めなかったが、定常状態の肺より抽出した CD133 陽性細胞を用いて高原提示細胞を誘導した群では、コントロール群に比して体重の有意な低下を認めた。

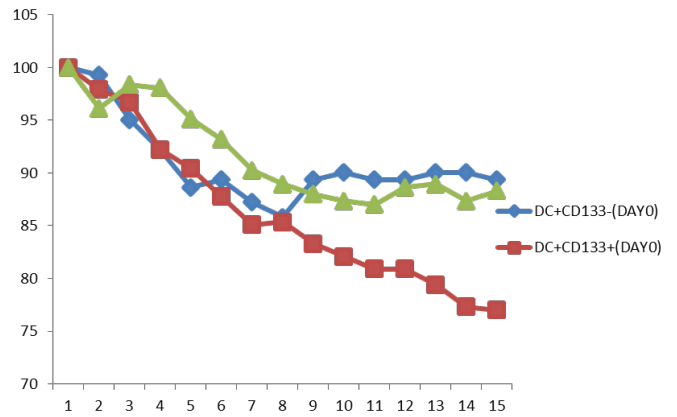
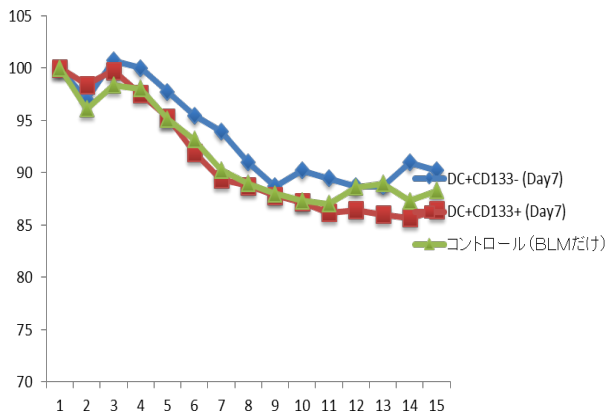


図 3 . 各状態から採取した CD133 陽性細胞で誘導した抗原提示細胞をワクチンしたマウスにおけるプレオマイシン投与後の体重変化。

上図：炎症惹起状態からの CD133 陽性細胞を用いた結果。

下図：定常状態からの CD133 陽性細胞を用いた結果。

また肺胞洗浄液を用いて肺炎症の評価を行った。しかし、肺胞洗浄液中の総細胞数とその分画には各群で差を認めなかった。

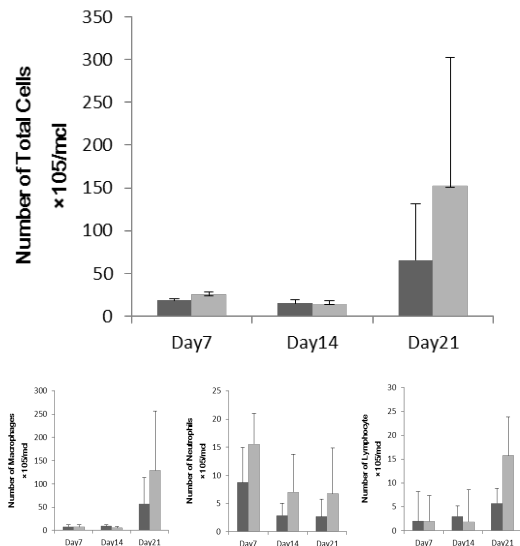


図 4 . 肺胞洗浄液中の細胞分画  
CD133 陰性細胞を用いた実験群 (濃灰色)  
CD133 陽性細胞を用いた実験群 (灰色)  
いずれの群でも肺胞洗浄液中の炎症細胞分画に差を認めなかった。

以上より、定常状態の CD133 陽性細胞を免疫学的に除去したマウスでは、プレオマイシン負荷後に炎症に間する以外の機序で全身状態に影響を与えたものと解釈でき、組織幹細胞である CD133 陽性細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### (4) 当施設における間質性肺炎例のデータベース構築

動物実験を踏まえて、ヒト検体での検討を行うために症例データベース構築を進めた。

これらの結果からは、組織幹細胞が炎症惹起後の肺からの回復過程で、重要な役割を担っており、単なる炎症を介するシステムのみで説明が困難であることを示唆している。従来概念の炎症をコントロールするコンセプトだけでは疾病の克服は困難であり、今後も組織幹細胞の果たす役割に着目した知見の集積が必要である。

#### 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 1 件)

1. ミコフェノール酸モフェチルを含む3剤併用療法を行った皮膚筋炎合併間質性肺疾患の1例

島 賢治郎, 坂上 拓郎, 市川 紘将, 穂苅諭, 朝川 勝明, 小屋 俊之, 各務 博, 高田 俊範, 成田 一衛

日呼吸誌, 4(1): 76-80, 2015

(査読あり)

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂上 拓郎 (SAKAGAMI TAKURO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 00444159