

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10786

研究課題名(和文) マウス肺移植による肺再生医療研究の可能性

研究課題名(英文) The possibility of lung regenerative medicine using the mouse orthotopic lung transplantation.

研究代表者

吉田 光輝 (YOSHIDA, Mitsuteru)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：30403710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肺移植による肺再生医療研究を探索する研究を施行した。肺移植の手技に関わる小動物用麻酔器機のマウスの人工呼吸に必要な至適な情報を確立し、手術の過程での麻酔の安定を確認。挿管から開胸、閉胸に至る手技の安定性をマウス実験で確保。マウスへの全身麻酔下での胎児肺移植や細胞移植の訓練も同時に行い、開胸にて安定した移植手技を肺移植とともに行うことができるよう実験し手技を確立。気管切開挿管での犠牲死と、サンプル採取の訓練も行った。組織をホモジェナイズする(サイトカイン測定のため)ために、凍結保存する方法を確立。サンプル採取(肺の採取とパラフィン包埋、右心室からの採血方法)を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺気腫や肺線維症などの終末期肺疾患に対しては、現在、肺移植が有用な治療手段として確立されているが、肺移植に使用できる健常なドナー不足は深刻な問題である。再生医療が必要とされるが、肺の再生の複雑なメカニズムを研究し、障害肺を再生へ導く細胞の由来、分化の仕方、必要な蛋白、時間的経過などのより詳しい機序を探索し、肺の再生医療を実現することを目標にする研究である。

研究成果の概要(英文)：We examined the Possibility of Pulmonary Regenerative Medicine Research using the mouse fetal lung tissue, ips cell and lung disease model. We established the stability of respiration and the surgery of mouse transplantation. (ventilation, depth of anesthesia, frequency of ventilation, pressure, optimal premedication dosage etc). We trained the stability of thoracotomy of mouse and the fetal lung sampling and cell transplantation. We established the methods of the homogenize of the tissue (cytokine analysis) and the tissue sampling of the lung (lung sampling, Paraffin embedded and blood sampling from the right ventricle).

研究分野：医歯薬学 呼吸器外科学

キーワード：肺再生 マウス肺移植 ips細胞 GFPマウス 胎児肺

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺気腫や肺線維症などの終末期肺疾患にて対しては、現在、肺移植が有用な治療手段として確立されているが、肺移植に使用できる健常なドナー不足は深刻な問題である。それに替わる治療法として、再生医学的な側面からの取り組みが候補となるが、現在のところ肺の再生は他の組織と比べその構造の複雑さと構成細胞が多いことなど、肺は再生医療への取り組みが困難な臓器である。

我々のグループは、胎生期肺組織の(1)肺への分化の方向付けがなされている点、(2)増殖能が旺盛である点、(3)“足場”となる間質組織が含まれている点、に注目し、胎生期肺組織移植による、特に肺胞レベルでの組織再生・修復について検討し、胎生17日齢ラット胎仔肺を細切し naïve な成体ラット左肺に移植することにより、次の点を明らかにした(J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 131:1148-53)。胎仔肺組織が成体肺内に生着し、分化する。移植場所として肺という環境が増殖、分化には重要である。レシピエント肺と移植肺組織は肺胞レベルで気道、血管系の連絡を有する。胎仔肺は成体自己肺に比し、成体肺内に生着しやすい。換気による mechanical stretch が強く加わる環境においては、移植胎仔肺の分化が促進される。ラットブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて、病的肺においても移植胎仔肺は生着し分化することを示した(J Thorac Cardiovasc Surg 2012; 143:1429-1435)。また機能的評価に関して、遺伝的肺気腫モデルマウス(1 アンチトリプシン低値のマウス- pallid mouse を2年にわたり飼育し、呼吸機能と耐運動能をプレスモグラフ(Baxco 社)の装置を使用した呼吸機能解析装置で詳細に検討し、またトレッドミルにて耐運動能を評価した申請者の研究があり、機能評価の準備も施行してきた。(Lab Invest. 2009 ; 89 :760-768.)未解決な部分は、どのような因子が胎児肺の生着と分化に寄与し、どのような因子の関与で、機能的な働きを持つに至るかということである。

この研究の強みは、マウスは様々なノックアウトマウスの作成技術の進歩により実験系の多様性に関して優れていることと肺の再生研究をすすめるにあたり、肺移植の実験手技は非常に有用性が高いことである。2012年 マウス肺移植手技に関する論文が掲載(Nat Protoc.2009 Orthotopic Mouse Lung Transplantation as Experimental Methodology to Study Transplant and Tumor Biology)された。ただし、マイクロ顕微鏡を使用してマウスの繊細な血管を取り扱う手技であり、経験のある施設で、一定期間の訓練が必要である。研究代表者(吉田光輝)は、2014-2015年の2年間、カナダ-トロント大学(Toronto General Hospital) Latner Thoracic Surgery Research Laboratory にて肺移植の慢性拒絶反応に関する研究に従事し、マウス肺移植手技を習得した。日本、また世界においてこのマウス肺移植手技を施行できる研究者は非常に少なく、貴重な手技であることを強調したい。この移植手技を利用した移植、再生医療研究が、肺の再生の複雑なメカニズムにもう一步、踏み込むことができると考えている。

2. 研究の目的

肺は多くの気管分岐からなり、気道から肺胞にかけて上皮系と間葉系細胞が精細な細胞外マトリックス上に配置された複雑な臓器である。肺の再生医療への取り組みは、その構造と修復機序の複雑さ故に研究デザインに関しては工夫が必要である。申請者が習得したマウス肺移植手技を使用し、これまで我々が研究してきた胎児肺組織と、肺気腫モデルを使用し、障害肺を再生へ導く細胞の由来、分化の仕方、必要な蛋白、時間的経過などのより詳しい機序を探求し、肺の再生医療へさらに踏み込むことを目標にする、マウス肺移植といった新しい手技を使用する研究である。

3. 研究の方法

(1)肺気腫マウスドナー肺を GFP マウスに移植し、移植された気腫肺の再生状況を調べる。

レシピエント自身の骨髄由来幹細胞や肺組織幹細胞の肺気腫修復の可能性を GFP 蛍光を利用して追跡したい。上皮細胞マーカーとしての Cytokeratin、内皮細胞マーカーとしての CD34、血球系マーカーである CD45 の蛍光免疫染色により骨髄由来幹細胞の動員を調べる。SP-C、TTF-1 にて肺胞 型上皮細胞、クラブ細胞を確認。肺組織幹細胞を SP-C/CD90 陽性細胞にてフローサイトメトリーで検討したい。

(2)胎児肺組織細胞をドナー肺に播種し GFP レシピエントに移植。

胎生期肺組織由来の single cell ペレット作成の確立(昨年の研究分担者の科研採択内容にもあり、この年度には直ちに使用できる予定である。)

胎生期肺由来 sing cell ペレットをドナーへ播種させ、GFP レシピエントへ移植。その修復過程を観察 組織学的検討:成体肺内での移植肺細胞の生着状態について組織学的(H&E,Elastica van Gieson, CCSP,TTF-1,SP-C,GFP 蛍光)に検討する。胎児肺組織細胞がどのような組織体へ分化できるのかを検討。誘導されるサイトカインをマイクロビーズ法にて確認する。

胎齢17日のマウス肺をDMEM培養液中で細切しコラゲナーゼ処理後200µm ナイロンメッシュと40µm cell strainer を通し回収。胎児肺由来のsingle cell suspension を作成。遠沈し single cell ペレット(2×10^6 個)を得る(4 保存)。肺気腫ドナー左肺にsingle cell ペレ

ットを播種させ、GFP レシピエント左肺に移植。移植後7,14,28 日にCT 撮影し経時的変化を観察。同日に犠牲死させ、上記サンプルを採取。

(3) iPS 細胞の可能性を検討する

腹側前方前腸レベルまで培養分化させたiPS 細胞を肺気腫ドナーの気管支より播種させ、GFP レシピエントへ移植。iPS の分化誘導は QILIANG ZHO らSTEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE 2014;3:675-685) のMouse iPSC Differentiation の方法方法を引用し培養する。後藤らの報告によるNKX2.1 陽性細胞とCPM (carboxypeptidase M) 陽性細胞にも着目し、分化の指標とした。

各年度にて、組織学的評価を免疫染色にて施行、経時的な呼吸機能評価、誘導されるサイトカイン、ケモカイン蛋白の同定。当科で所有している小動物用プレチスモグラフにて呼吸機能評価、トレッドミルでの運動能の評価を予定しており、機能的な情報も得たい。

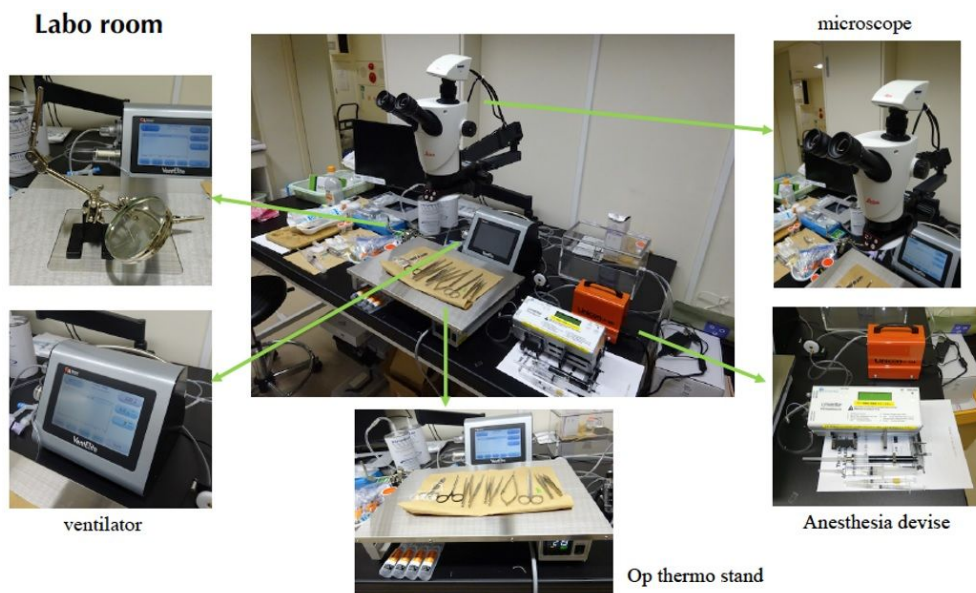
同系の B6 マウス間の移植ではほぼ拒絶反応はおこらず、移植後の肺の状態は良好であることを、申請者はトロント大学にて検討済みである。移植実験では GFP 蛋白質が弱いながらも異種抗原となる点は顧慮しておく。

[研究が計画通りに進まなかった時の対応] 速やかに共同研究者とともにカンファレンスを行い、どの点が実験の進行に不具合であるのかを十分に検討する。移植後の組織が想定外の結果であった時；まずは移植手技をしない方法で、GFP レシピエントを肺気腫モデルへ誘導し、同マウスの気道内に直接、胎児肺組織細胞を注入する方法をとる。iPS 細胞移植も同様の方法を試みる。

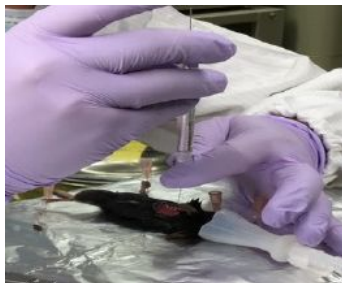
4. 研究成果

肺移植の手技に関わる小動物用麻酔器機のマウスの人工呼吸に必要な至適な換気量、麻酔深度、換気回数、重圧式、重量式換気などを確立し、左開胸にて肺門部を操作する状況で、麻酔の安定を確認した。胎児肺組織をマイクロスコープにて取り出し、それをペレットにする訓練をした。マウスの胎児肺は大変小さく、これをマイクロスコープにて取り出す手技を訓練し確立してきた。マイクロスコープ、気管切開挿管での犠牲死と、サンプル採取の訓練も同時に行った。組織をホモジェナイズする(サイトカイン測定のため)のために、凍結保存する方法を確立し、小さなマウスサンプルから十分な情報を得るためのサンプル採取(右肺、左肺の採取とパラフィン包埋、右心室からの採血を気管切開挿管管理下で 0.5ml から 1.0ml の十分な量の血液を採取する方法、左肺の一部を生標本で切除し、OCT コンパウンドに入れて液体窒素内へ保存する方法、ホモジェナイズの手技など、今後のサンプル採取に必要な手技を当該年度に確立してきた。このような工程が予想していた以上に繊細な技術が必要で、その確率に時間を要した。コロナ禍において十分な時間が取れなかったことも要因となる。また、GFP マウスの獲得が困難であり、胎児肺ペレットからの GFP マウス使用の段階でやや遅れてはいるが、その間はしっかりと、主にマウスの麻酔手技や安定したサンプル採取の手技に関して上記訓練をして、シミュレーションしてきた。

重量式、重圧式が選択できる小動物用人工呼吸器を設置し、マイクロスコープ下で、マウスに負担をかけない麻酔下での処置を確立してきた。

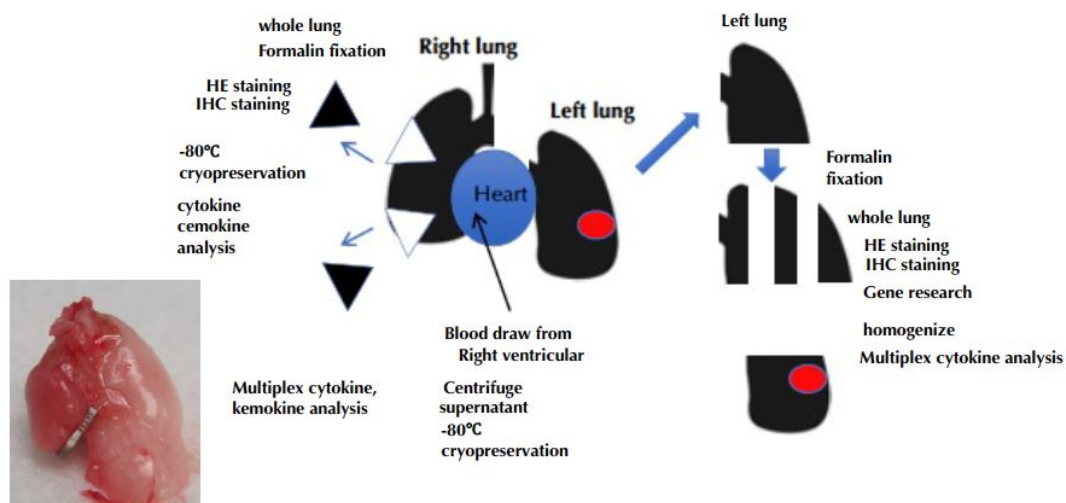


マウス肺へ細胞を注入する手技をトレーニングした。



マウス肺のサンプルを無駄なく検体として採取する手技を確立してきた。

Sampling technique



マウスへの全身麻酔下，開胸手技をトレーニングしてきた。

Mouse LTx recipient Surgery



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 和也 (KONDO Kazuya) (10263815)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	
研究分担者	川上 行奎 (KAWAKAMI Yukikiyo) (00596249)	徳島大学・病院・特任講師 (16101)	
研究分担者	鳥羽 博明 (TOBA Hiroaki) (40403745)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	河北 直也 (KAWAKITA Naoya) (60522266)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関