

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年5月11日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007年度～2008年度
課題番号：19590881
研究課題名（和文）喫煙や加齢が骨髄幹細胞や気管支肺胞幹細胞に作用し、肺の修復に与える影響について
研究課題名（英文）Cigarette smoke and aging give influence for the reproduction of lungs
研究代表者
氏名（ローマ字）：笠原 靖紀 (Yasunori Kasahara)
所属機関・部局・職：千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60343092

研究成果の概要：

肺気腫の発症機序として、加齢や喫煙のために肺胞構造を維持するシステムが十分に機能できなくなることが重要である。そのためには傷害された肺胞が常に修復されている必要がある。喫煙が骨髄幹細胞や脂肪組織、気管支肺胞幹細胞に作用し、肺の修復に与える影響について研究した。喫煙は、肺組織や血管に酸化ストレスや炎症性変化を引き起し、骨髄や脂肪組織など全身に炎症反応を惹起して、肺の修復に影響をあたえていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

1. 研究開始当初の背景

WHO の統計によると、COPD は現在世界で第 4 位の死亡原因であり、今後数十年は、有病率・死亡率が上昇することが予測されている。

本邦においても 2001 年に施行された疫学検討では、COPD は 40 歳以上の成人の 8.5% (男性 13.1%、女性 4.4%) を占め、未治療患者を含めると、患者数 530 万人に至ると推定されている。

喫煙は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や心臓血管疾患の主要な危険因子であり、COPD 患者の約 90% が喫煙者である。

肺気腫の発症機序として従来はプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説やオキシダント・アンチオキシダント不均衡説が広く支持されてきたが、この仮説だけでは十分に発症機序を説明できないと思われる。加齢や喫煙のために肺胞構造を維持するシステムが十分に機能できなくなることも重要ではないかと考えられる。肺胞構造を維持するには、傷害された肺胞が常に修復されている必要がある。近年様々な細胞が骨髄由来幹細胞から分化しうることを示され、再生医療への応用が期待されている。また肺組織内には、骨髄由来幹細胞だけでなく、bronchioalveolar duct junction に位置する気管支肺胞幹細胞 (bronchioalveolar stem cells) が存在していることが近年明らかにされた。また脂肪組織由来の間葉系幹細胞も

再生に加わっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

COPD の主要なリスクファクターである喫煙と加齢は、肺の修復にどのような影響をおよぼして、肺の修復にあたる影響について研究した。喫煙が骨髄幹細胞や脂肪組織、気管支肺胞幹細胞に作用するかについて研究した。

3. 研究の方法

実験動物モデルの作成

喫煙吸入実験装置 (MIPS レスピー製 INH06-CIGR01 型) を用い、9 週齢の C57BL/6J 雄マウスに 1 日 20 本、週 5 日でタバコ主流煙を 1 回・1 週・4 週・36 週曝露した。同週齢の非喫煙曝露マウスを対象群とした。両群から、血液・骨髄・肺・脾臓等のサンプルを採取した。予備実験にて HbCO が 10% 程度になる吸入喫煙濃度を設定した。

検体の採取と解析

喫煙 1 回後、1 週後、1, 6 ヶ月後と経時的に sacrifice して血液、骨髄、脾臓、肺、脂肪組織から検体を得て、Ficoll 法を用いて、単核球分画を分離した。喫煙による急性と慢性の変化を調べた。単核球分画を

CD117(c-kit)+, CD34+, Stem cell antigen-1 (sca-1)などでラベルしてFACSを用いて定量した。喫煙曝露マウス肺の形態学的評価もおこなった。

急性喫煙曝露マウスおよびその対照群の骨髄細胞より比重傾斜法で単核球分画を分離した。得られた単核球細胞にCD117マイクロビーズを添加、Magnetic cell sorting (MACS)にてCD117陽性細胞(幹細胞)を回収した。RNAを抽出・精製し、Affymetrix社・GeneChip (Mouse Genome 430 2.0)を用い約39,000の転写産物について包括的に解析した。

4. 研究成果

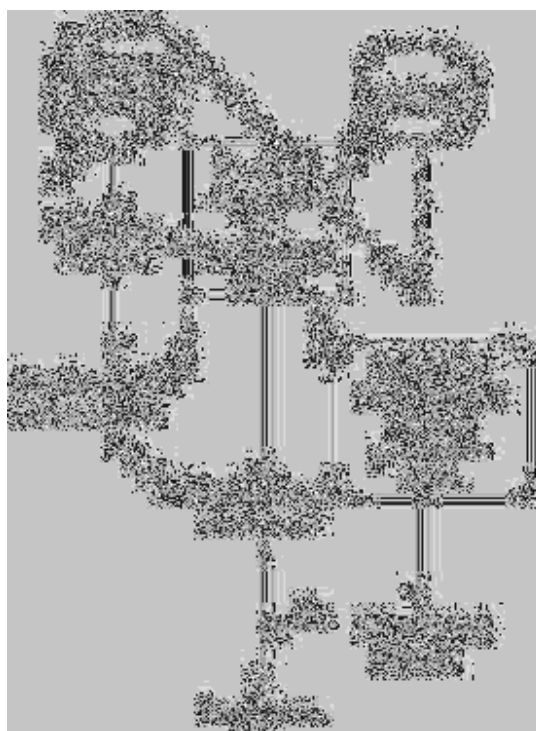
喫煙により血液に血管内皮前駆細胞は速やかに動員され、その後漸減した。また、骨髄・脾臓の血管前駆細胞数は喫煙により減少していた。一方肺組織中のVEGF発現量は喫煙で速やかに上昇し、その後減少してゆき、骨髄由来前駆細胞の動員や減少に関連があると思われた。肺組織のSDF-1 α 発現量は対照群に比し、4週曝露群で有意に減少していました。または血漿中のSDF-1 α 発現量は1週曝露群で減少していました。VEGFとSDF-1 α 発現の増減パターンは、同様の傾向を示しており、1回喫煙曝露で増加し、反対に1, 4週曝露で減少していた。

急性の喫煙曝露は肺でのVEGFの発現を増やし、骨髄や脾臓からEPCを末梢循環中に動員しているものと思われた。VEGF系シグナルなどの細胞増殖、分化促進因子の発現低

下は、骨髄幹細胞を抑制して肺の修復能を抑制している可能性が考えられた。

急性曝露群のCD117陽性骨髄細胞では、DNA修復や細胞の分化・増殖を促進する遺伝子群および抗アポトーシス作用を持つ遺伝子群の発現が低下していた。

また喫煙曝露により、体重減少がおきるが、脂肪細胞中のMCP-1mRNA発現が亢進し、脂肪組織中へのマクロファージの集積が認められ、脂肪組織へも炎症性変化を誘導する可能性があると考えられた。喫煙曝露は、肺組織や血管に酸化ストレスや炎症性変化を引き起こすと考えられているが、骨髄や脂肪組織など全身に炎症反応を惹起して、肺の修復に影響をあたえている可能性があると考えられた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

① T Yasui, Y Kasahara, et al.

Cigarette smoke induced changes in gene expression in CD117+ mononuclear cells of the bone marrow.

Annual Congress European respiratory Society 19.09.2007 Stockholm, Sweden

② H Shimizu, Y Kasahara, et al.

Cigarette Smoke altered adipose tissue function in mice

Annual Congress European respiratory Society 18.09.2007 Stockholm, Sweden

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 靖紀 (KASAHARA YASUNORI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 60343092

(2) 研究分担者

巽 浩一郎 (TATSUMI KOICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 10207061

坂尾 誠一郎 (SAKAO SEIICHIRO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80431740

(3) 連携研究者

なし