

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790569
 研究課題名（和文）肺気腫と肺線維症に対する肺再生因子の胸腔内投与による肺再生効果の検討
 研究課題名（英文）The effect of intra-thoracic injection of HGF in the animal model of pulmonary emphysema and pulmonary fibrosis.
 研究代表者
 横堀 直子（YOKOHORI NAOKO）
 東京女子医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20439805

研究成果の概要：肺気腫や肺線維症は、進行すると呼吸不全に陥る疾患であり現在根本的な治療がない。肺気腫や肺線維症により臓器不全に陥った肺を修復する治療法として肺の再生治療の可能性が期待されている。本研究では、肺気腫モデルマウスと肺線維症モデルマウスに肺再生因子である HGF の胸腔内投与を行い、その再生効果について検討した。その結果、肺気腫の改善効果は認められなかったが、肺の線維化の抑制は認められ、肺線維症の改善に有効である可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	900,000	120,000	1,020,000

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：肺気腫、肺線維症、肺再生因子

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は慢性閉塞性肺疾患（COPD）の主疾患であり、肺胞の破壊と消失をきたす疾患である。COPD において、肺気腫の重症度は呼吸状態に強く関与しておりその進行に伴い呼吸不全へと進行する。今後、COPD から呼吸不全に至る患者数の増加が見込まれるが、未だ根本的な治療はない。一方、特発性肺繊維症

（IPF）は、慢性進行性に高度の線維化と肺胞構築の改変を呈し、不可逆的な蜂巣肺の形成をきたす原因の特定できない予後不良の疾患である。その死因は急性増悪、肺癌、慢性不全、感染である。5 年生存率は 38.3%、生存平均期間 3.1 年であり予後不良な疾患である。ステロイドや免疫抑制剤が治療に用いられているが予後の改善には至っていない。

このような、肺気腫や肺線維症により臓器不全に陥った肺を修復する治療法として再生治療の可能性があると着想するに至った。

2. 研究の目的

肺の再生には、肺の構造である肺胞を形成する必要がある。再生医療へのアプローチとしては、第一に細胞工学による生体外での臓器の再生を促す方法、第二に再生を促す因子にて組織幹細胞から生体内で組織の再生を促す方法、第三に幹細胞移植により生体内での細胞の分化による組織の再生を促す方法がある。第一の方法は、肺が約200 μ mの肺胞が約3億個からなる微細構造である為、体外での肺の再生は現在難しいと考えられている。第二の方法として、肺気腫モデルに対する再生因子の全身投与試験の報告がある。肺気腫モデルラットにレチノイン酸を腹腔内投与し肺気腫が改善した報告があり、臨床実験が行われたがヒトでは有効性は認められなかった。また、肺気腫モデルに対して骨髄幹細胞を末梢血に誘導し組織再生をはかる目的で、G-CSFの投与された報告では肺気腫の改善が認められたが、私共のG-CSF, M-CSFを用いた実験結果では肺気腫の悪化が認められ臨床応用にはまだ多くの研究を要する段階である。第3の方法としては、2001年より骨髄幹細胞を用いた肺再生実験が試みられているが、近年では移植した幹細胞が肺胞細胞に分化していなかったとの報告もあり論争を呼んでいる。このような肺の再生治療における最近の研究動向を踏まえると、新しいアプローチ方法が期待される。

肺の発生分化には、様々な肺の分化成長因子が経時的かつ継続的に発現することが必要と考えられている。しかし、肺の複雑な構造から局所へこれらの因子を経気道的に投与するのは非常に困難であり、この分野の研究の発展を阻んでいると言わざるを得ない。

肺胞形成のメカニズムは十分に解明されてはいないが、胸膜側からの関与もあることが推測されている。これまで、肺再生因子の胸腔内投与による投与をみる実験は試みられていない。従って、本研究では臓器移植に比較して手技が容易である胸腔内投与を用いて、肺気腫モデルと肺線維症モデルマウスに対して肺の再生因子を投与しその効果について検討する。また、投与する肺再生因子にはHGF: Hepatocyte Growth Factorを用いる。HGFは、肺の発生分化に関与している因子の一つである。また、骨髄幹細胞のなかで間葉系幹細胞が肺に分化することが報告されており、HGFは間葉系細胞より分泌されるため、二次的に肺再生を促進する可能性が推測される。

以上より、本研究では肺の再生因子の胸腔内投与による、肺気腫、肺線維症に対して生じる効果について検討する。

3. 研究の方法

始めに、正常マウスにHGFの胸腔内投与を行い、胸膜の増殖効果について検討した。対照として生食を、またHGFは50ng/bodyまたは100ng/bodyを胸腔内投与し、投与後24時間後の胸膜の細胞増殖促進効果について検討した。肺摘出前BrdUを腹腔内投与し、増殖細胞のラベリングを行った。HGFを胸腔内投与24時間後に肺を摘出し、20cm水柱でホルマリン拡張固定した後、3 μ mの組織切片を作成しBrdU免疫染色を試行した。BrdU陽性細胞数/全胸膜細胞数より増殖細胞の割合を計測した結果、HGF投与群では胸膜の増殖細胞の割合が非投与群より増加していた。一方、50ng/body群と100ng/body群においては、その効果に容量依存性の効果は認められなかった。これらの結果より、以降の実験においては、HGFを50ng/bodyとして胸腔

内投与した。

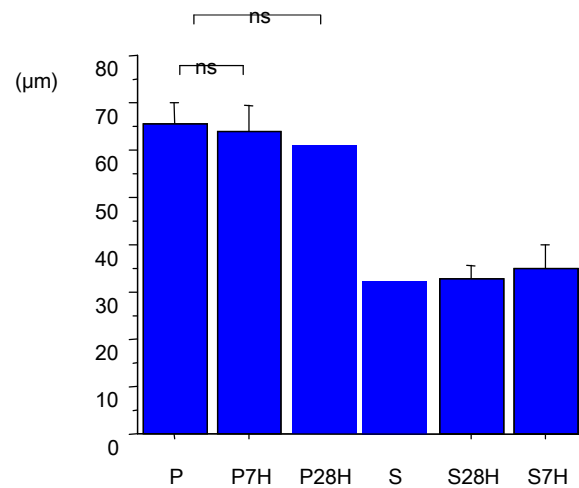
肺気腫モデルとして、C57BL6J マウスに豚膵エラスターゼ (PPE 3U/body: Sigma) を気管内注入し肺気腫モデルマウスを作成した。肺気腫モデルマウスを作成し、1週間後に HGF を胸腔内投与する群と4週間後に HGF を胸腔内投与する群を作成し、エラスターゼ投与から8週間後に肺を摘出し、左肺を20cm水柱でホルマリン拡張固定した後、3μmの組織切片を作成した。肺気腫の重症度の評価として、肺組織切片の HE 染色標本を用いて、肺の形態計測により平均肺胞間距離を求めた。肺の形態計測(平均肺胞間距離 mean chord length : MCL)については東京女子医大呼吸器内科形態研究室が所有する画像解析ソフト(winRoof)を使用し、顕微鏡下200倍にて各マウスにつき左肺の20視野においてMCLを計測し肺気腫の組織学的重症度を定量化した。また、肺線維症モデルとしては、C57BL6J マウスに塩酸プレオマイシン(5U/kg)を気管内注入し肺線維症モデルマウスを作成した。塩酸プレオマイシンを気管内注入した4週間後に HGF を胸腔内投与し、投与から4週間後に肺を摘出し、左肺を20cm水柱でホルマリン拡張固定した後、3μmの組織切片を作成し、HE染色標本における肺の形態計測(Aschoff's score)について画像解析し、線維化の組織学的重症度の定量化を行った。

4. 研究成果

豚膵エラスターゼを気管内注入した群では、生食を気管内注入した生食群と比較して明らかにMCLの増大を認め肺気腫の所見が得られた(PPE群 vs 生食群: $63.4 \pm 4.6 \mu\text{m}$ vs $32 \pm 3.3 \mu\text{m}$, $p < 0.001$ 、PPE + HGF(1週間後)群 vs 生食 + HGF(1週間後)群: $63.9 \pm 5.3 \mu\text{m}$ vs $35 \pm 4.8 \mu\text{m}$, $p < 0.05$ 、PPE + HGF(4週間後)

群 vs 生食 + HGF(4週間後)群: $60.8 \pm 8.3 \mu\text{m}$ vs $33 \pm 2.5 \mu\text{m}$, $p < 0.05$)。

平均肺胞間距離



P: PPE群

S: 生食群

P7H: PPE+HGF(1w後)群

S7H: 生食+HGF(1w後)群

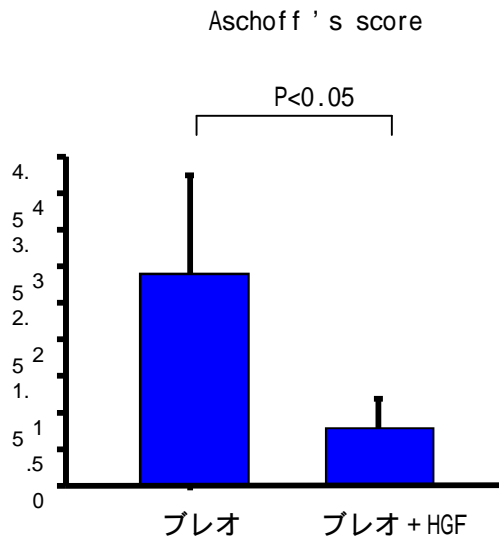
P28H: PPE+HGF(4w後)群

S28H: 生食+HGF(4w後)群

しかし、豚膵エラスターゼを気管内注入後、1週間後と4週間後に HGF を胸腔内投与した両群における MCL は、HGF を投与しなかった群と有意差を認めず(PPE群 vs PPE+HGF(1週間後)群: $p = 0.72$; ns、PPE群 vs PPE + HGF(4週間後)群: $p = 0.27$; ns、PPE+HGF(1週間後)群 vs PPE + HGF(4週間後)群: $p = 0.27$; ns)、HGF の胸内投与による肺気腫の改善効果は認められなかった。

一方、塩酸プレオマイシンを気管内注入した群では、生食を投与した群では投与8週間後に肺に線維化の所見認められなかったのに比較して、明らかに線維化の所見が認められた。プレオマイシン投与後4週間後に HGF を胸腔内投与した群では、投与しなかった群と比較して、Aschoff's score の改善が認めら

れ(プレオマイシン群 VS プレオマイシン + HGF 群: 2.8 ± 1.4 vs 0.79 ± 0.4 , $p < 0.05$)、HGF の胸内投与は肺の線維化を抑制する可能性が示唆された。



以上の結果より、肺再生因子であるHGFの胸内投与は肺線維症の治療となる可能性がある。今後、臨床応用を考慮し、投与時期や用量依存性効果などにつき、さらなる検討が必要であると思われた。

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)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

横堀 直子 (NAOKO YOKOHORI)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 20439805