

平成22年5月6日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間： 2008～2009
 課題番号：20890118
 研究課題名（和文） 重症肺気腫／呼吸不全に対するヒト脂肪幹細胞シート移植を用いた
 新たな治療法の開発
 研究課題名（英文） Novel strategy of treatment for end-stage pulmonary emphysema
 by stem cell sheet derived from human adipose tissue
 研究代表者
 重村 周文（SHIGEMURA NORIHISA）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：30505508

研究成果の概要（和文）：

イヌ肺気腫モデルを用いて、骨格筋芽細胞シートを用いた幹細胞シート移植法が気腫肺を機能的に改善し得ることが示唆された。またこの効果を高解像CT画像診断を用いて確認した。今後、病理組織像（1. 肺胞上皮細胞におけるDNA新生 2. 肺胞中隔細胞のアポトーシス抑制 3. 小肺血管における血管新生）の変化およびそれらの定量的評価の比較を行い、本効果のメカニズムを解明していく予定である。

研究成果の概要（英文）：

Through the pilot study using canine emphysema models, we successfully demonstrated that cell based therapy using myoblast cell sheet techniques improved emphysematous changes functionally and radiographically. We will continue to work on the study to figure out the mechanism involved in this improvement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,160,000	348,000	1,508,000
2009年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,320,000	696,000	3,016,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺気腫、細胞シート治療、肺の再生医学、アポトーシス、High Resolution CT

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢社会の到来に伴って喫煙を主原因とする閉塞性肺疾患、肺気腫の患者数は増加の一途をたどっている。しかしながら重症肺気腫に対する内科的治療の効果には限界があり、画期的治療法と期待された外科療法：肺容量減少手術にも急性期の安全性が確立されておらずまた効果の持続期間にも限界があることが指摘され、これらの問題点を解決する新しい治療コンセプトの確立が全世界的に急務となっている。

肺は常に呼吸を介して常に外界と接しており、感染や異物侵入によって恒常的に傷害を受けている臓器ととらえることができる。そして、恒常的に傷害を受けている肺実質は機能・形態を維持するために自己組織修復能を有しているはずであり、その駆動システムを種々の肺疾患における再生療法に応用することが立ち遅れている肺気腫に対する有効な治療戦略となり得るのではないかと我々はまず考えた。

Hepatocyte Growth Factor (HGF)は培養肝細胞の DNA 合成を指標に精製、遺伝子クローニングされた増殖因子である [1]。HGF は肝臓以外にも腎臓や消化管、皮膚等において必須の再生因子として機能する。そして肺においても極めて強力かつ多様な器官形成因子としての作用を有することが数々の報告から明らかにされている [2]。注目すべき点は HGF が傷害された肺組織において特に顕著な働きを示し、断裂した肺胞に対して肺胞ネットを再構築する役割を果たすことであり、その働きはマウスの肺切除モデル、誤嚥性肺炎のモデルを用いて明らかにされている [3]。一方 HGF は血管内皮細胞増殖による血流改善を介して組織修復を促すことが報告されており、肺においても HGF が血管床の形成を促すことがラット肺高血圧症モデルを用いて明らかとなっている [4]。肺気腫は慢性かつ進行性に肺実質及び肺血管床の傷害が進む疾患であり、私達は HGF がこのプロセスに関与し、それを解明することにより新たなアプローチで病態改善が図れるのではないかと仮説した。

そこでエラストーゼの気管内投与によって

作成したラット肺気腫モデルにおいて、内因性 HGF の産生レベルを病理組織学的変化及び呼吸機能評価による病勢の進行度と併せて経時的に観察した。その結果、気腫肺組織中の内因性 HGF 産生が肺気腫の病態進行と共に低下、枯渇していくプロセスを明らかにした [5]。HGF による肺実質の自己組織修復システムはもともと生理学的に肺に備わっており、本来、肺気腫のような慢性的な傷害肺で顕著な働きを示すはずであるが、HGF の発現は低酸素状態において著明に抑制されることから、気腫肺においては組織の低酸素血症が関与する機序により修復・再生システムが十分に働き得ていないと我々は考えた。そこでこの HGF が枯渇する時期（エラストーゼ投与後 1 週間）に合わせて、HVJ ウイルス (Hemagglutinating virus of Japan, Sendai virus としても知られる)-envelope を用いた遺伝子導入法にて HGF の外的補充を試みた。HVJ-envelope を用いた理由は、本法が他臓器に殆ど影響を及ぼさず、傷害肺に対する生着効率が極めて高いこと、免疫原性が低い為炎症を誘起しにくいことによる。実際の実験では、外的補充として Human HGF を用いたが、非常に興味深いことに治療後組織中の Human HGF の上昇に加えて、治療群の内因性 HGF (rat HGF) も直後より著明に上昇し、非治療群の約 5-8 倍の高値を約 3 週間に渡って示した。これらの現象はラットエラストーゼモデル、LVRS モデル両方で認められ、また他の報告からも HGF 産生に関する同様の現象が示されている [6]。メカニズムとして HGF 自体による HGF 産生促進の auto-induction 作用の関与が考えられるが、今後 HGF の外的補充を柱とする戦略における特異かつ重要な特徴として我々は注目している。

HGF の外的補充により、結果として気腫肺において ①肺胞上皮細胞の DNA 新生促進、②肺胞中隔細胞のアポトーシス抑制、③小肺血管の血管新生作用の促進、の 3 つの働きが誘導され、組織傷害の進行が抑制されると共に肺胞組織の組織修復が促進されることが明らかにされた。そして機能的にも改善されることを運動能・血液ガスの分析から明らかにした [5, 6]。

これまでに b-FGF や VEGF など多くの血管新

生因子が発見され、また肺胞上皮細胞の DNA 新生促進作用をもつ因子も新たに報告されているが、両方の作用を有する因子は HGF 以外に報告されていない。VEGF の組織浮腫を促進する作用や、b-FGF の繊維化を助長するという副作用も HGF にはない [7]。従来から成人においては肺再生：Alveolar septation (regeneration) の実現は難しいとされてきたが、HGF は傷害肺においてこれらの多様な生物学的作用を発揮することにより、肺実質の修復・再生を可能にすることが大きく期待されるわけである。

私達は次のステップとして、HGF の供給源としての幹細胞の利用（細胞移植治療）を考え、脂肪組織由来の間葉系幹細胞（Adipose tissue-derived stem cells: ASC）に注目した。ASC は HGF, FGF を中心とする多様な増殖因子を多量に産生する能力を有することが指摘され [8]、心血管領域で新たな治療源として注目を集めてきている。また ASC は皮下脂肪などから容易に大量採取、培養が可能であり、増殖能力も非常に高い。さらに、胸部外科領域においては古くから損傷した肺に対して内臓脂肪を利用する手技は良く知られており、膿胸術後の大網（脂肪組織）充填術や気管支断端を被覆するための心膜脂肪 flap 法として現在も臨床の現場で用いられている。そのため私達胸部外科医は、脂肪組織が肺組織の修復に役立つことを経験的に熟知している。これらのことから、私達は ASC 細胞の細胞移植治療が内因性 HGF 産生の増加を介して肺気腫の病態改善に寄与するのではないかと考え、ラットモデルを用いて新しい試みを行った。その結果、ASC 細胞を外科医療材料である接着シート上にティッシュエンジニアリング技術を用いて付着・培養させ、そのようにして作成した脂肪幹細胞シートをラット気腫肺上に移植するという方法を考案した。そして同法による細胞移植 1 週間後には気腫肺において内因性 HGF の著しい増加を伴って肺胞新生及び肺血管新生が促進され、ガス交換能・運動耐用能も著明に改善されることを明らかにし、傷害肺における再生型治療の開発に成功した [9, 10]。ASC 細胞が気腫肺において組織修復・再生を促進する細胞の供給源となり得ているかについ

ては未だ説明を必要とするが、ASC の細胞移植治療も含めて、現時点では HGF を介した自己組織修復システム駆動を柱とした治療戦略が肺再生の臨床への展開においては最も有望であることは、これまでに小動物レベルの実験でもここまで著明に肺気腫において機能改善を示し得た報告が殆どないことから理解されると考えている。

今回は、イヌ肺気腫モデルを用いて、大動物において幹細胞シート移植による治療法の効果を確認することを研究期間内の主目的とする。またラットでは認められなかった副作用の問題点が大動物でもないことを確認することを第二の目的とし、それらの結果を踏まえて、本治療法を末期重症肺気腫/呼吸不全症例に対する新しい再生医療型治療法として臨床治験段階に進めるものとする。

参考文献) *下線は研究代表者

1. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 122: 1450-1459.
2. Ohmichi H, Matsumoto K, Nakamura T. In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration. *Am J Physiol.* 1996; 270: L1031-L1039.
3. Sakamaki Y, Matsumoto K, Mizuno S, Miyoshi S, Matsuda H, Nakamura T. 2002. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26: 525-533.
4. Ono M, Sawa Y, Matsumoto K, et al. In vivo gene transfection with hepatocyte growth factor via the pulmonary artery induces angiogenesis in the rat lung. *Circulation* 2002; 106: I261-I269.
5. Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, Ono M, Ohta M, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H. Amelioration of pulmonary emphysema by in vivo gene transfection with

- hepatocyte growth factor in rats. *Circulation*. 2005; 111: 1407-1414.
6. Shigemura N, Sawa Y, Mizuno S, Ono M, Minami M, Okumura M, Nakamura T, Kaneda Y, Matsuda H. Induction of compensatory lung growth in pulmonary emphysema improves surgical outcomes in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 1237-1245.
 7. Karpaliotis D, Kosmidou I, Ingenito EP, et al. Angiogenic growth factors in the pathophysiology of a murine model of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L585-L595.
 8. Zuk PA, Ahu M, Mizuno H, et al. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7: 211-228.
 9. Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, et al. Autologous Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Ameliorates Pulmonary Emphysema. *Am J Transplant* 2006; 6(11): 2592-2600
 10. Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, et al. Lung Tissue Engineering Technique with Adipose Stromal Cells Improves Surgical Outcome for Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 1199-1205.

2. 研究の目的

イヌ肺気腫モデルに対して、ティッシュエンジニアリング技術を応用した幹細胞シート移植による治療法の効果を確認することを研究期間内の主目的とする。またラットに対して同方法を施行した実験では認められなかった副作用の問題点が大動物でもないことを確認することを第二の目的とし、それらの結果を踏まえて、本治療法を末期重症肺気腫/呼吸不全症例に対する新しい再生医療型治療法として臨床治験段階に進めるものとする。

3. 研究の方法

(1) イヌ肺気腫モデルの作成と幹細胞分離・培養

ビーグル犬肺に 25U/100g のブタ腓エラストラーゼを全身麻酔下・経気管的に投与し、イヌ肺気腫モデルを作成する。モデル作成の際にソケイ部より一定量の皮下脂肪組織を採取し、脂肪幹細胞 (Adipose tissue-derived stromal cells: ADSC) の分離・培養を行う。さらに培養した ADSC 細胞をポリグリコール酸フェルトシート上に移植・付着させ、幹細胞シートを作成する。これと並行してモデルの大腿部より骨格筋を採取し、骨格筋の中に存在する筋芽細胞 (Myoblast cells) の分離・培養を行い、温度感応性培養皿を用いて筋芽細胞シートを作成する。

(2) イヌ肺気腫モデルに対する幹細胞シート移植の効果・副作用に関する検討

エラストラーゼ投与 7 日目のイヌ肺気腫モデルに対し、気腫肺上に脂肪幹細胞及び骨格筋筋芽細胞の細胞シート移植を行う。治療効果の判定は病理組織像 (免疫組織染色等) の変化と共に呼吸機能 (血液ガス)、運動機能 (トレッドミル運動負荷テスト) の改善度で行う。治療群 5 頭, コントロール群 5 頭の比較を行う。また肺腫瘍の発現等考えられ得る副作用についての観察を移植後 6 ヶ月間に渡ってそれぞれの群で追跡調査を行うことを最終目標とするが、本年度中は移植後 3 ヶ月目までの成績を明らかにすることをまず一年目の目的とする

4. 研究成果

(1) エラストラーゼ気管内注入により作成したイヌ肺気腫モデルの病勢進行評価を、予定通りエラストラーゼ注入前, 注入後 3 ヶ月, 6 ヶ月目にそれぞれ血液ガス分析および画像診断にて行った。画像診断には大阪府立大学獣医学センターの協力の下, High Resolution CT を用いて, 詳細な検討を行った。

著明な気腫変化の進行を経時的に認め、モデルの確立を画像診断の観点から確認した。

(2) モデル確立後 1 ヶ月目に、あらかじ

め採取・作成していた骨格筋芽細胞シートを開胸後、外科的に気腫肺に移植（治療）し、その効果を治療後3ヶ月目、6ヶ月目に同様の血液ガス分析・画像診断法にて行った。

治療群(n=2; n=3で開始も1匹は評価未完遂)において、非治療群(n=2)に比し、機能(血液ガス分析)、画像診断(High Resolution CT)共に著明な改善を認めた。評価終了後、実験モデルはすべて sacrifice され、当初の予定通り、病理組織像(1. 肺胞上皮細胞におけるDNA新生 2. 肺胞中隔細胞のアポトーシス抑制 3. 小肺血管における血管新生)の変化およびそれらの定量的評価の比較を行うべく、現在進行中である。

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)

[図書] (計1件)

「肺の再生医学 ―現状と将来― THE LUNG perspective 再生医学の臨床応用 ―呼吸器外科領域における再生医療の現状と将来戦略―」メディカルレビュー社 2010: 17 (4) 55-62)

重村 周文; 奥村明之進

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重村 周文 (SHIGEMURA NORIHISA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 30505508

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: