

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591810

研究課題名（和文）2型肺上皮再生と肺胞マクロファージ抑制を介した新しい急性肺障害治療法の開発

研究課題名（英文）A novel approach to treat acute respiratory failure by combination of type 2 alveolar epithelial regeneration and alveolar macrophage inhibition

研究代表者

土田 正則（TSUCHIDA MASANORI）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60293221

研究成果の概要（和文）：

ラット気道上皮細胞を用いた培養実験でサイトカイン添加により細胞の増殖、成長が促進可能なことを、またエレクトロポレーションによりマーカー遺伝子が効率よく気道上皮細胞に導入できる事を確認した。さらにリポーター遺伝子 DNA を正常ラットの気道内にネブライザーで肺胞内に投与し加圧する方法で肺局所に遺伝子を発現できることを確認した。しかし、加圧による肺障害が問題となることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

In vitro cell culture experiment demonstrated that airway epithelial cell growth was improved by adding cytokines in the culture medium. Electroporation also improved efficacy of gene introduction into culture cells of airway epithelium. Gene expression was observed in the alveolar epithelium by intratracheal administration of naked gene. However, lung injury due to pressure to epithelium was observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：胸部外科

キーワード：肺障害・気道上皮再生・サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群は色々な原因による急性肺障害を包括した病態で、その致死率は高く予後不良である。その病態としては好中球の肺胞内への集積と過剰に集積した好中球が肺障害を惹起することが考えられ、好中球を制御することに治療の主眼が置かれてきた。しかし肺障害の修復過程で肺胞間質に線維化が起り不可逆性変化に陥ることが予後を著しく不良としている。肺胞は1型肺胞

上皮と2型肺胞上皮の2種類の細胞で構成されており、大型の薄い1型肺胞上皮が肺胞の97%をカバーしている。近年肺障害の際には肺胞でこの1型肺胞上皮が脱落すること、それを修復するためにII型肺胞上皮が腫大、1型肺胞細胞に変化することが判明してきた。1型肺胞上皮細胞が変性脱落し肺胞基底膜が露出すると、線維芽細胞が遊走し肺胞内線維化が進行すると考えられている。従ってこの肺胞リモデリングの過程でタイミング

よく2型肺胞上皮細胞を誘導し線維芽細胞の遊走を抑制できれば重症呼吸不全を可逆性の病態として治療する可能性がある。Hepatocyte Growth Factor (HGF), Epidermal Growth Factor (EGF)などが2型肺胞上皮の増殖を誘導、促進することが明らかになってきた。一方、肺胞マクロファージから産生される Transforming Growth Factor (TGF)- β , Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)などが線維芽細胞を増殖させ線維化を促進することも明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究では

- (1) 2型肺胞上皮細胞の早期誘導により線維芽細胞の遊走を阻止し線維化を抑制すること、
- (2) マクロファージの線維化に関わる機能を抑制することで線維芽細胞増殖を抑制すること

以上の2点から間質の線維化を制御する新たな治療法を確立することを目指す。

3. 研究の方法

2型肺胞上皮細胞の早期誘導の検討

in vitroにおける増殖因子の効果確認

セルライン化された商業的のラット気道上皮細胞を用いて Hepatocyte growth factor (HGF), Epidermal Growth Factor (EGF) の増殖促進因子の存在下に細胞培養し気道上皮の増殖、成長が促進可能か否かを細胞増殖能、形態学的検討した。

用いた培養液は RPMI1640 で HGF, EGF の添加濃度は 0.5、1.0、2.5、5、10ng/ml とした。増殖能の評価は培養開始 8 時間、16 時間、24 時間の3点で細胞数、生細胞割合、BRDU 取り込み率を測定した。

Nucleofector を用いた気道上皮細胞への遺伝子導入の検討

気道上皮細胞：ロンザ社から購入した3種の気道上皮細胞（ヒト気管気管支上皮細胞、小気道上皮細胞、ブタ気道上皮細胞）を使用した。

細胞培養：上記細胞を専用の培養液（BEGM BulleKit および BEGM SingleQuots）中で 37°C、5% CO₂ の条件下に培養した。生細胞割合の計算は（全細胞数×生存率）/100 で行った。

遺伝子導入：Nucleofector 社製の電圧ポレーション遺伝子導入システムによって GFP 遺伝子を導入し導入効率を検討した。

導入効率の確認は GFP 陽性細胞および生細胞

の計測で評価した。

In vivo での肺胞局所への遺伝子導入条件の検討

リポーター遺伝子 DNA を正常ラット気道内にネブライザーで霧状に注入し人工呼吸器による加圧で肺胞内に遺伝子の発現が可能か否かを検討した。遺伝子導入、人工呼吸による加圧後経時的にラットの肺組織を採取し導入した遺伝子の発現程度と発現期間を検討した。リポーター遺伝子としては大腸菌 β ガラクトシダーゼ遺伝子を用い、導入細胞を染色する方法で (X-gal 染色) 導入の有無を確認した。

動物：体重は 250g 前後の雄の SD ラット
プライスミド:pCAGGS-luciferase、
pCAGGS-lucZ をエンドフリープラスミドギガキット (Qiagen 社製) で作成

人工呼吸器：高島商会社製ボリュウムコントロール式小動物用呼吸器を使用

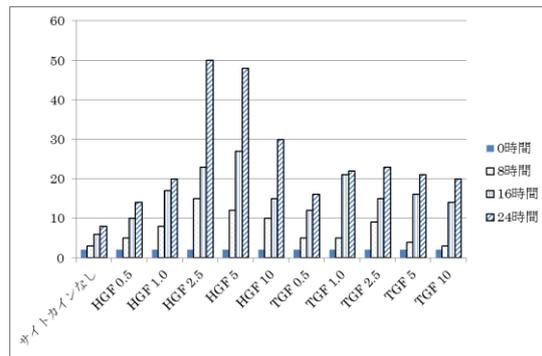
呼吸器の設定：一回換気量は 10、30ml / Kg、終末呼気内圧 (PEEP) は 0、5、10、20 mmH₂O、呼吸回数 20、40、60、90 / 分、呼吸時間 0.5、2、5、10 分で設定した。

確認アッセイ：Promega Luciferase Assay System を用い Monolight 2010 ルミノメーターで吸光度を測定した。

4. 研究成果

in vitroにおける増殖因子の効果結果

HGF 添加群、EGF 添加群、サイトカイン不添加群の順に BRDU 取り込みが高値であった。各群とも 24 時間での取り込みが最大であり、使用したサイトカインでは HGF が TGF に比べて増殖作用が強く、濃度は HGF, TGF とも 2.5ng/ml が至適であった。



電圧ポレーションによる気道上皮細胞への遺伝子導入効率の検討結果

CMP プロモーターに組み込まれた GFP をヒト気管気管支上皮細胞、小気道上皮細胞、ブタ

気道上皮細胞に各々エレクトロポレーションあり/なしで投与し発現効率を 2 群間で比較した。

下記に導入効率と生細胞割合の平均を記載したが、いずれの細胞においてもエレクトロポレーションを用いることで導入効率、生細胞割合が有意に上昇することが示された。

導入効率および生細胞割合の平均

培養細胞	導入効率	生細胞割合
ヒト気管支上皮細胞	80/20%	50/30%
ヒト小気道上皮細胞	65/18%	86/70%
ブタ気道上皮細胞	80/30%	80/60%

ラット肺局所における遺伝子導入検討結果

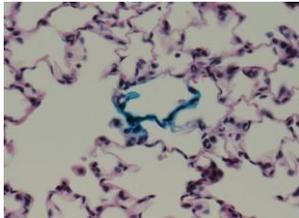
X-gal 染色による遺伝子発現の局在確認

導入後の肺の肉眼像



まばらにマーカースの色素が確認できる

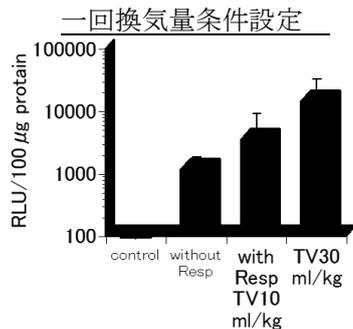
導入後の肺組織像



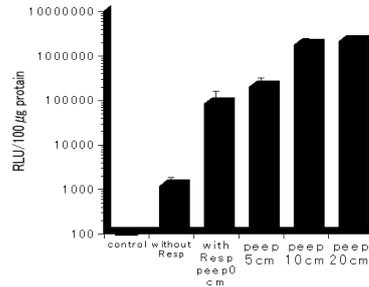
マーカー遺伝子は肺胞に導入されていることが確認できる。

導入条件の検討

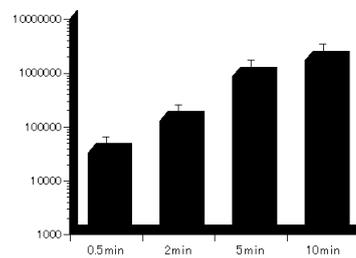
換気量、終末呼気圧、呼吸回数、呼吸時間に関して変化させ導入効率を測定した。



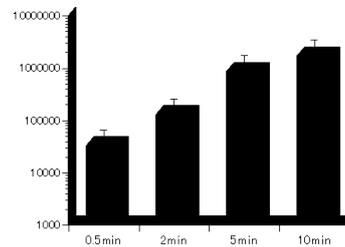
終末呼気圧条件設定



換気回数条件設定



呼吸時間の条件設定



上記の結果から換気量 20 ml /Kg, 終末呼気圧 10 cmH₂O, 呼吸回数 50 回/分, 呼吸時間 5 分という至適条件を決定した。

遺伝子導入に伴う有害事象の発生

人工呼吸による肺へのストレスが原因と考えられる肺障害のためラットの生存率が 8 割と有害事象が問題となることが判明した。

有害事象発生に対する改善策

気道内投与と加圧による遺伝子導入方法では肺障害の発生が避けられないことから、肺動脈、肺静脈の血管系からの投与、発現の可能性を検討した。予備実験であるが下記のように肺静脈経路での導入効率の向上が認められた。

今後は投与経路を変更して安全な導入効率の向上と治療を目指す。

臓器別、投与経路別の吸光度平均値

臓器発現	肺動脈経路	肺静脈経路
右肺	6429	3396
左肺	4682	447588
心臓	2436	2396

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)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土田 正則 (TSUCHIDA MASANORI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60293221

(2) 研究分担者

篠原 博彦 (SHINOHARA HIROHIKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40463071

(3) 連携研究者

なし