

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591825

研究課題名（和文）種々の生体適合性ゲル化物質を足場材料に用いたマウス肺組織移植モデル

研究課題名（英文）A mouse model of lung tissue transplantation with biocompatible scaffold materials

研究代表者

澤藤 誠 (SAWAFUJI MAKOTO)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：10226079

研究成果の概要（和文）：種々の生体適合性ゲル化物質を scaffold（足場材料）として用いるマウス胎仔肺組織移植モデルを確立した。全身が緑の蛍光を発する GFP マウスの胎仔を摘出し、解剖して肺組織を採取する。細切した GFP マウス胎仔肺組織を混じたゲル化物質を、レシピエント左肺の胸膜下肺実質内 4～5 ヶ所に 50 μ l ずつ、先端が鈍な注射針(28 ゲージ)にて血管内に入らないように注入する。組織学的検討により、GFP 蛍光を有する移植片を 3 日目まで確認することが出来た。

研究成果の概要（英文）：We developed a mouse model of lung tissue transplantation using biocompatible scaffold materials. Fragments of fetal lung tissue taking from GFP mice were infused with biocompatible materials into the lungs of wild type recipient mice. Grafts expressing GFP were observed for three days after transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

肺気腫や特発性肺線維症、気管支拡張症など、治療に反応しない慢性進行性で正常肺組織が不可逆的に破壊される肺疾患に対する根治的治療は、現在では肺移植に限られているとよい。しかしながら、解剖学的特徴による易感染性や高い抗原性のため、他臓器の移植と比較して肺は移植の難しい臓器である。その上ドナーは不足している。そこで新しい治療法の1つとして肺組織移植が期待されるが、その研究は他臓器と比較して非

常に遅れている。肺は(1)気管上皮、肺胞上皮、血管内皮など多岐にわたる細胞を有し分化誘導が困難なこと、(2)様々な成長因子が関与している可能性があり調整が困難なこと、(3)肺胞の構造は細胞外器質が乏しく移植片の生着が困難なことなどにより再生が難しいのである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスを用い、種々の生体適合性ゲル化物質を scaffold（足場）とし

て用いる生着率の高い肺組織移植の技術を確認することである。scaffoldに必要な性質は、生体適合性、移植片が生着するまでの体内残留性、注入時は肺胞内への浸透性するように液状であり肺内では空気漏れを停止できる様ゲル状となること、注入時に中枢気道へ流出しないある程度の粘性を有すること等であると考えられる。これらの性質を備える物質には、コラーゲン溶液やヒアルロン酸、フィブリン糊、自己脂肪織、生体親和性の合成高分子化合物等がある。それぞれの特徴を明らかにし、最適な物質を見つけ出すことが本研究の目的に含まれる。

3. 研究の方法

種々の生体適合性ゲル化物質を scaffold (足場材料) として用いるマウス胎仔肺組織移植モデルを確立する。

【ドナー肺組織】

妊娠 17 日目の雌性 GFP マウス (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C15-001-FJ001 Osb) をエーテル麻酔後に犠牲死させ、胎仔を摘出する。顕微鏡下に解剖して胎仔肺組織を採取し細切する。組織片は培養液(DMEM)で一時的に保存する。その後、種々の生体適合性ゲル化物質に混ぜる。

(1) アテロコラーゲン注入材

(アテロコラーゲンインプラント、コーケン)

(2) フィブリン糊

(フィブリノーゲン+トロンビン) (ボルヒール、化学及血清療法研究所)

(3) Thermo-reversible gelation polymer (TGP)

(メビオール)

を使用した。

(1)は形成外科領域で軟組織の陥凹部補正修復用に開発され精製されたコラーゲンである。(2)フィブリン糊は粘性の高いフィブリノーゲンを先に肺実質内に注入し、その後トロンビンを血管内に入らないように注意して注入する。(3)は新規医療用ハイドロゲルで、低温でゾル状態、高温でゲル状態を示す昇温時ゲル化型熱可逆性ハイドロゲルである。注入時はゾル上であるため肺組織内に浸透し、その後速やかにゲル化して空気のもれを閉鎖することが期待される。その後は生体内で吸収される。

【レシピエント手術】レシピエントマウス (野生型 C57BL/6) に麻酔後に経口挿管し、人工呼吸器管理下に左開胸する。肺門をクリップにてクランプした後、細切した GFP マウス胎仔肺組織を混じたゲル化物質を、レシピエント左肺の胸膜下肺実質内 4~5ヶ所に 50 μ l ずつ、先端が鈍な注射針(28ゲージ)にて

血管内に入らないように注入する。(図1) クランプを解除して空気もれや出血がないことを確認した後、閉胸して手術を終了する。



図1 生体適合性ゲル化物質の肺充填

移植後レシピエントを犠牲死させ、肺を取り出して組織学的検討を行う。蛍光顕微鏡や GFP 蛍光を有する移植片を観察、カウントして、各ゲル化物質ごとに生着率を算出する。また、ゲル化物質の残留状況や、レシピエントとドナーの肺組織の癒合への影響も評価する。注入する肺組織の濃度や注入する深さ、ゲル化物質の量も変化させ、至適な条件を決定する。移植片を構成する細胞のフェノタイプごとに、レシピエント肺中での動態を種々の細胞表面マーカーを使用した蛍光免疫組織学的手法やフローサイトメトリーによって解析する。ゲル化物質に種々の成長因子を溶解させて徐放キャリアーとして用い、生着率等に効果を及ぼすか否かを検討する。ブレオマイシンを用いた肺線維症モデルも作製し、肺組織移植を行い、呼吸機能の回復に関しての検討も行う。

4. 研究成果

肺実質内にフィブリン糊を注入すると、注入時には肺実質内に浸透し、その後はゲル化し瘻孔を止めさせて空気もれが止まる。(図2)

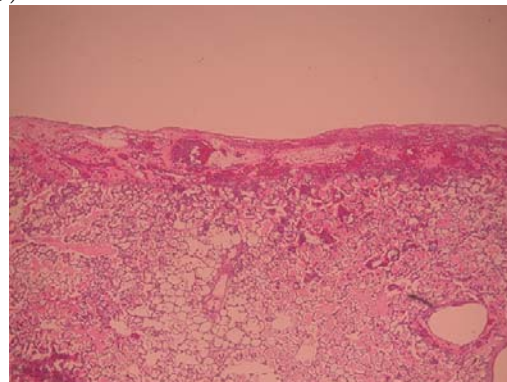


図2 肺内に充填されたフィブリン糊；肺胞内にフィブリンが浸透するのが確認できる。

また、充填直後で気道内圧 45 ± 5 cm 水柱の耐圧が確認できた。(図 3)

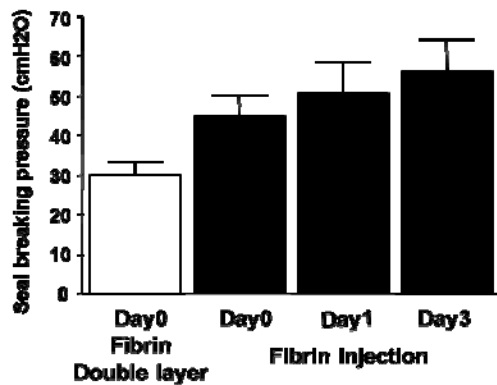


図 3 Seal breaking pressure after fibrin injection

また、フィブリン糊注入後 48 時間までに、胸膜の欠損部に 1 層の中皮細胞が出現し、その後の胸膜の修復も確認できた。フィブリン糊が肺内に注入に適していることが確認できた。(図 3)

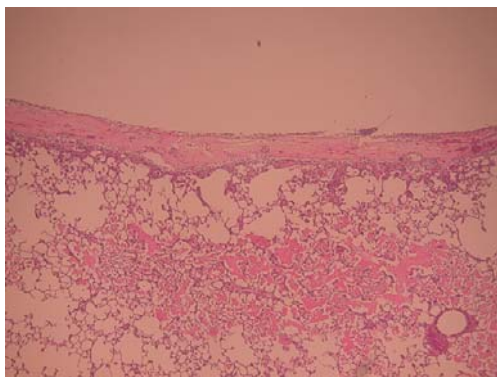


図 3 フィブリン糊充填後の胸膜修復；胸膜欠損部に中皮細胞が出現している。

濃度 1%のアテロコラーゲンでは、肺からコラーゲンが漏出しやすかったが、2%及び 3%コラーゲンの胸膜欠損部直下への注入ではフィブリン糊を用いたフィブリン糊と同等の耐圧能を示した。(図 4)

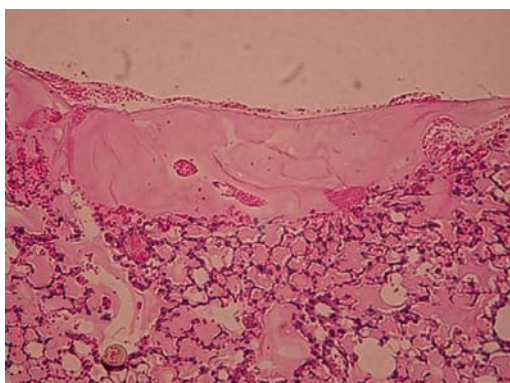


図 4 肺内に充填されたアテロコラーゲ

ン；肺胞内にコラーゲンが浸透するのが確認できる。

またその後の胸膜の修復も確認できた。(図 5)

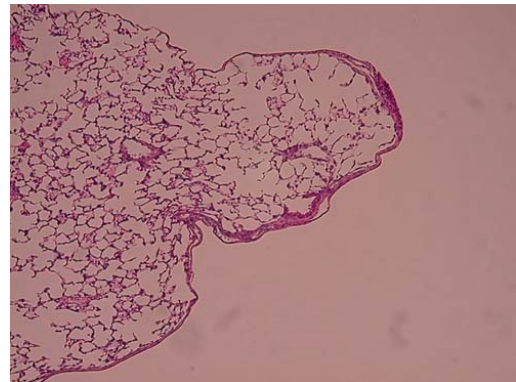


図 5 アテロコラーゲン充填後の胸膜修復；胸膜が肥厚し修復されている。

昇温時ゲル化型熱可逆性ハイドロゲル(メビオールゲル)でも肺瘻閉鎖効果が得られたが、限局して留まり、肺内への浸透が不良で、長期間肺内に残存した(図 6)

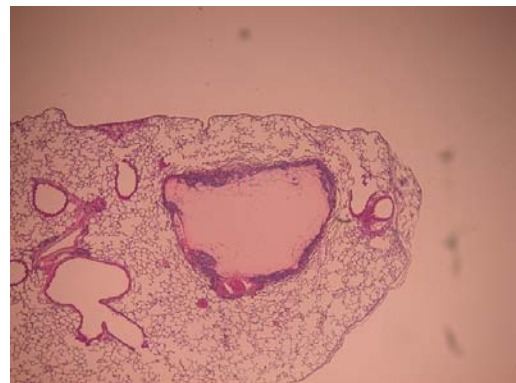


図 6 肺内に充填された昇温時ゲル化型熱可逆性ハイドロゲル

移植後 24 時間、3 日、5 日後でレシピエントを犠牲死させ、肺を取り出して組織学的検討を行った。(1)、(2)、(3)のいずれのゲルを使用しても GFP 蛍光を有する移植片を 3 日目まで確認することが出来たが、5 日目には移植編を確認できなかった。3 日目のレシピエント肺を用いて、残存するドナー肺組織を解析した。しかしながら GFP 蛍光を有するドナー由来の細胞数は少なく、移植片を構成する細胞のフェノタイプごとに、レシピエント肺中での動態を種々の細胞表面マーカーを使用した蛍光免疫組織学的手法やフローサイトメトリーによる解析を試みようとしたが、十分なドナー肺組織を得ることが出来ず、解析は困難であった。免疫抑制剤を併用しても著効を認めなかった。

別の実験では、ブレオマイシンやエンドトキシンを気管内投与して肺損傷を生じさせた。その後、マウスが長期間生存できるよう、また組織移植手術に耐えられるようブレオマイシン或いはエンドトキシンの投与量を通常の投与量より減量して調整した。しかしながら、ゲル化物質の注入は更なる侵襲をマウスに与えることとなり、マウスの長期生存を得ることが出来なかった。

Scaffoldとして適当な生体適合性ゲル化物質の探索を推進する必要がある。また、肺内に移植する肺組織として、胎仔肺組織が適当なのか、未分化な細胞などがよいのかなど、検討を継続する必要があると思われた。

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3件)

- ① Kohno M, Watanabe M, Izumi Y, Tasaka S, Kitagawa Y, Maruyama I, Kobayashi K. Mitigation of occult lung injury by pneumonectomy via minithoracotomy in mice. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Mar; 60(2):124-30. 査読有
- ② Kohno M, Perch M, Andersen E, Carlsen J, Andersen CB, Iversen M. Treatment of intractable interstitial lung injury with alemtuzumab after lung transplantation. *Transplant Proc*. 2011 Jun; 43(5):1868-70. 査読有
- ③ Takahashi Y, Izumi Y, Kohno M, Kawamura M, Ikeda E, Nomori H. Airway administration of dexamethasone, 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate, and isobutylmethylxanthine facilitates compensatory lung growth in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Mar; 300(3):L453-61. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 江間俊哉、河野光智、儀賀理暁、田島敦志、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、堀之内宏久、小林紘一. ラット肺癭モデルにおけるフィブリン糊肺実質内充填による肺癭閉鎖.
第26回日本呼吸器外科学会総会
2009年5月14,15日
- ② 河野光智、江間俊哉、儀賀理暁、泉陽太郎、渡辺真純、堀之内宏久、川村雅文、小林紘一. 生体適合性ゲル化物質の肺実質内充填による肺癭閉鎖の実験的検

討.

第26回日本呼吸器外科学会総会.
2009年5月14,15日

[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]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤藤 誠 (SAWAFUJI MAKOTO)

慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)

研究者番号: 10226079

(2) 研究分担者

渡辺 真純 (WATANABE MASAZUMI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 90201227

泉 陽太郎 (IZUMI YOTARO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 90245506

河野 光智 (KOHNO MITSUTOMO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 10276272

(3) 連携研究者

なし