

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791325

研究課題名 (和文) ラット胎仔肺組織移植モデルを応用した移植片の再構築・融合機能

研究課題名 (英文) Histologic examinations of reconstructed and re-fused donors as for fetal rat lung implantation models

研究代表者

監崎 孝一郎 (KENZAKI KOICHIRO)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70325265

研究成果の概要 (和文)：【目的】ドナー胎仔肺として GFP (green fluorescent protein)-LEW と LEW を混合し、レシピエント成体肺として LEW を用いて、胎仔移植肺組織の再構築・融合を検討した。【結果】胎仔肺を細切し、肺実質に注入移植したにもかかわらず、移植片同士は、レシピエント肺内で生着・分化していた。レシピエント肺実質内で再構築・融合する形態が蛍光顕微鏡下に明瞭に観察できた。

研究成果の概要 (英文)：【Object】As for our fetal rat lung implantation models : We studied that the fine pieces of fetal lung tissues reconstructed and re-fused in the adult lung parenchyma using GFP (green fluorescent protein)-LEW and LEW rats. 【Result】Fluorescence microscope : We clearly observed that the pieces of fetal lung tissues re-fused and communicated each other (GFP-LEW and LEW) in the adult LEW lung parenchyma at 1-4 weeks after implantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の原因となる肺気腫・慢性気管支炎・肺線維症等の終末的肺疾患が、2020年には世界の死因の第3位になることが予想されている (Hind M et al, Eur Respir J 2004; 23: 20-27)。現在、このような終末的肺疾患に対しては、理学療法・酸素療法以外に、肺移植が有効な治療法の一手段となっているが、煩雑な免疫拒絶反応のコントロールやドナー不足は極めて深刻であ

る。世界の肺移植症例数は年間約 1300 例でほぼ横ばい状態であり、本邦に至っては 1997 年臓器移植法成立後、年間十数例と大幅な増加を示していない。その解決法として、次世代医療である人工臓器や再生医療の発展が急務である。

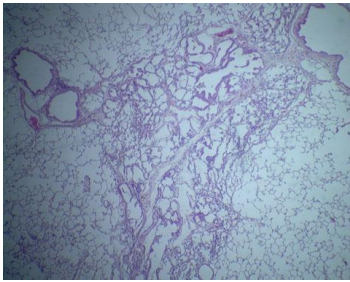
種々の臓器・組織において再生医学研究が盛んに行われ、臨床応用されつつある。また、iPS 細胞の樹立により爆発的に研究が進むと考える。しかし、呼吸器領域では、気管・声帯・反回神経等が臨床研究されているが、肺

実質に関してはその構造の複雑さから困難な状況にある。ES 細胞からの導入はもちろん、臓器としての肺全体を再生させることは現状では極めて厳しいといわざるを得ない。従って、肺を構造・機能の点からいくつかの部分に分けて考える必要があった。

これまで我々は、肺胞レベルの肺組織再生を念頭に、ラット胎仔肺組織の成体肺実質内への移植実験を行い、移植胎仔肺組織は成体肺内に生着分化する事を示した。我々が胎仔肺組織に着目した理由は、胎生期後期 (pseudoglandular stage) の胎仔肺組織は、a) 肺として分化がある程度方向付けられている、b) 増殖・分化能が旺盛な組織である、c) 足場 (scaffold) としての間葉系組織が存在する点である。(Kenzaki et al, J Thorac Cardiovasc Surg. 2006;131:1148-1153)

1) レシピエントの移植部位は肺実質内という環境が重要で、ドナー胎仔肺は、レシピエント成体肺内で生着分化する。

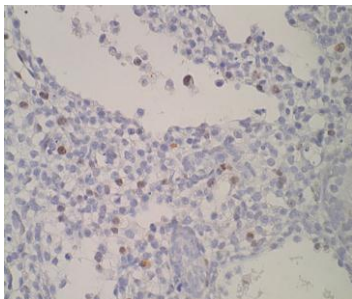
ラット胎仔肺移植モデル (H&E, 移植後 8 週)



一方で、レシピエントの皮下や体網内では、うまく生着せず、ドナー片は肺胞としての分化はしない。

2) ドナー胎仔組織移植肺は、移植早期に増殖能を所持する。

1 週目では、移植片内増殖能を持つが、2 週目以降は減弱し、分化能を持つと考える。
移植片 Ki67 染色 (移植後 1 週)

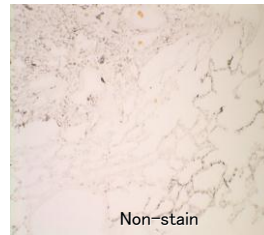


同じく成体肺を細切し、同様に移植しても生着分化はしない。これは、移植片が胎仔ということが非常に重要である点を示した。

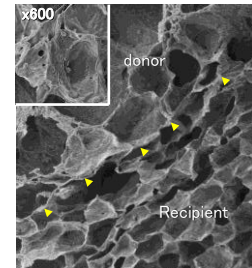
3) ドナー組織片とレシピエント肺は、血管系・気道系で交通する。移植片が、ガス交換能を持つかどうかの証明は現時点では明らかでない。

レシピエント肺の、下大静脈葉を切除した Volume Reduction を行うことにより、mechanical stretch 効果を強めた条件では、分化が促進する。また、KGF 投与下では、分化がより促進する。

墨汁染色



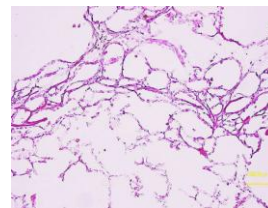
電子顕微鏡



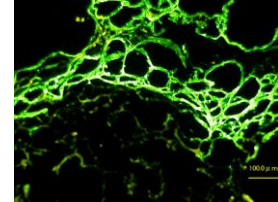
レシピエント肺動脈から注入した墨汁は、ドナー片内でも確認できた。また、電子顕微鏡レベル Kohn の小穴様の構造で、気道系も交通していることを確認した。

4) GFP ラットで容易に長期ドナー移植片を観察可能にした (1~24W)。

H&E(8W)



蛍光(8W)



移植後長期になると、ドナー移植片が十分分化し、レシピエント肺との境界・所在の鑑別が困難になるが、GFP ラットを用いてドナー移植片の所在を明確にした。

マウスでは汎用されている GFP をラットに導入したモデルを利用する。GFP-LEW ラット (CAG プロモーターを使用し、GFP 遺伝子を LEW ラット受精卵にマイクロインジェクション) を自治医科大学が開発し、共同研究により今回当教室で譲り受けている。

2. 研究の目的

1) 当教室のラット胎仔肺移植モデルを応用し、細切した移植片が成体肺の中でどのような形で再構築・再融合しているかを組織学的に検討した。

2) 細胞レベルに注目すると今まで観察した

範囲以上に、ドナーはレシピエント肺内に広がっているのではと仮説した。GFP 蛍光では、細胞レベルの観察になると、自家蛍光のバックグラウンドが高くなり、正確なドナー細胞の広がり同定は困難である。Sex-mismatch を用いてレシピエント成体肺内のドナー細胞の生着・広がりを検討した。

雄胎仔肺 (Y 染色体 SRY 遺伝子) を雌成体肺に移植することにより、レシピエントには、もともと存在しない雄存在を証明するものである。

3. 研究の方法

- 1) ドナー; 胎仔 LEW ラット (17 日齢)
+ 胎仔 GFP-LEW ラット (17 日齢)
レシピエント; 成体雄 LEW ラット (8~12 週)

移植

胎仔肺 ⇒ 成体肺実質内

組織学的検討

H&E 染色と蛍光顕微鏡による観察

- 2) ドナー; 胎仔雄&雌 LEW ラット※(17 日齢)
レシピエント;
成体雌&雄 LEW ラット (8~12 週)

移植

雄胎仔肺 ⇒ 雌成体肺実質内
雌胎仔肺 ⇒ 雄成体肺実質内

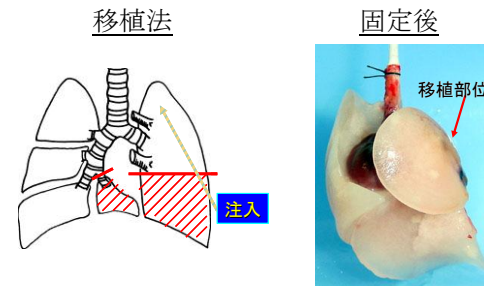
組織学的検討

H&E 染色と FISH 法による観察

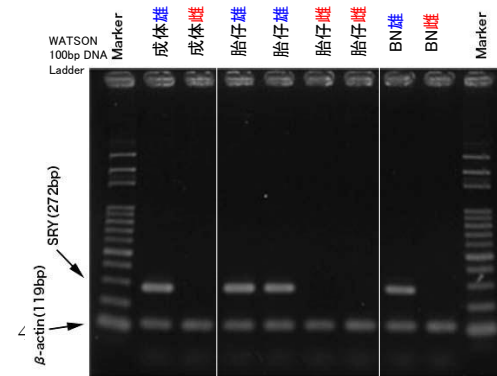
実験 1) は、SPF 成体 LEW ラット (8~12W) をレシピエント、同系胎齢 17 日の GFP-LEW と正常 LEW をドナーとする (紫外線ランプ UV-A; 360nm で GFP 蛍光を確認)。実験 2) は、LEW の雌雄を判別後移植する。

エーテル麻酔下に妊娠ラットから胎仔を取り出す。実体顕微鏡下に両肺 (GFP-LEW と LEW の同匹数から) を摘出、DMEM (10%FBS+penicillin-streptomycin) 培地内で約 0.2mm 大に細切する。レシピエントに対する一連の操作/処置は挿管 (14G) し人工呼吸器下 (SN480-7, Shinano; 70 回/min, TV 10ml/kg, PEEP 2cmH₂O)、Halothane 1.5%, N₂O:O₂=1:1 の条件で左開胸にて行う。細切した移植肺片は 0.25cc の注射器内に DMEM ごと吸引し、20G サーフロ針外筒を用いレシピエント肺に 0.1cc 注入する。左肺の左肺静脈流入部より尾側を結紮切除する。更に下大静脈葉の左胸腔内への過膨張による左肺容量減量効果を損ねない様 (同時にレシピエント肺

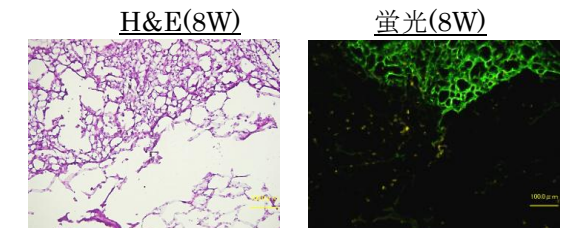
の mechanical stretch を増大) に、縦隔胸膜切開後、下大静脈葉も結紮切除する。移植後犠牲死させた摘出肺は、肺動脈より灌流後、心肺一塊切除し、気管より 15cmH₂O で 10% 中性ホルマリン固定液を注入する。



(※ラットの雌雄は、生後 1 週以前は判別不可能である。胎齢 17 日の胎仔肺を個別化しておき、成体の雄と雌に移植した。個別化しておいた胎仔肺を後日 Y 染色体 SRY 遺伝子を PCR 法で雌雄確認し、雄→雌、雌→雄の移植群のみ検討した。)



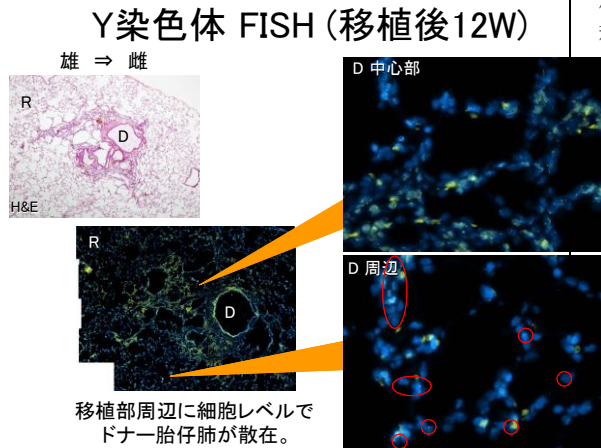
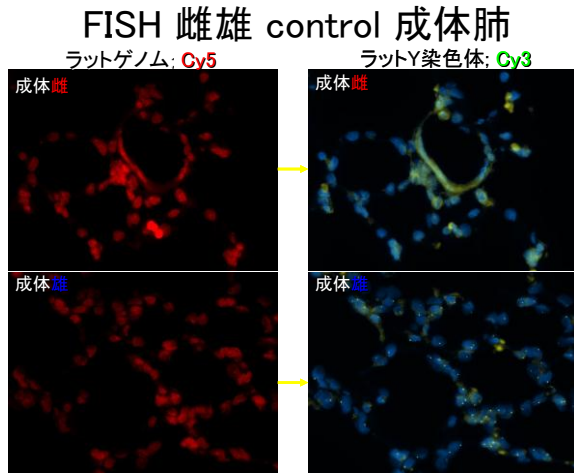
1) 移植片内に蛍光示す部位と示さない部位がパッチワーク状に確認できた。このことは、細切されははずのドナー胎仔組織片が、生着するのはもちろんのこと、胎仔組織片同士もレシピエント肺内で再構築・融合することを証明した。



移植実験後ガス麻酔人工呼吸器下に犠牲死させ、左房切除・肺動脈本幹に 22G 注射針より冷生理食塩水約 30ml 注入し肺を灌流後、心肺同時摘出し 15cmH₂O の圧で気管から固定液 (4%パラホルムアルデヒド:OCT コンパウンド=4:1) を注入する。暗室で 5 時間 (4℃) 経過

後、-80 度で保存する。クライオカットで標本切片(10 μ m)を作成し、無染色で蛍光顕微鏡(KEYENCE; Biozero, BZ-8000)で観察する。

2) Sex-mismatch を利用した FISH 法により、ドナー胎仔肺は組織としてレシピエント成体肺内に再構築されるだけでなく、移植部位近傍にも細胞レベルで散在し、経時的に広がりを見せた。



ある程度組織構築された胎仔肺だけではなく、胎仔肺の中の肺再生に関連する細胞集団が存在し、レシピエント肺を遊走し生着・分化した可能性がある。

遊走した胎仔肺細胞や関連したサイトカインなどを解析することによって、細胞レベルの肺再生のヒントにつながると思われた。

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 1 件)

1. 監崎孝一郎

Sex-mismatch を用いたラット胎仔肺移植モデルのドナー細胞の組織学的検討
第 110 回日本外科学会定期学術集会
2010 年 4 月 9 日
名古屋国際会議場 (愛知県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

<http://www.tksbizan.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

監崎 孝一郎 (KENZAKI KOICHIRO)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：70325265

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：