

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591558

研究課題名（和文） II型肺胞上皮細胞を用いたドナー拡大に向けて
—再生技術による死体肺移植の可能性

研究課題名（英文） Possibility of cadaver lung transplantation by the regenerative
medicine using type II alveolar epithelial cells

研究代表者

吉田 成利 (YOSHIDA SHIGETOSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90334200

研究成果の概要（和文）：II型肺胞上皮細胞(AT-II)の単離培養を確立し、左肺全摘後の右肺にAT-IIを経気管移入し、肺胞への生着を確認した。また外科的切除肺から得られたヒトAT-IIの機能解析とヒトAT-IIの免疫不全ラットへの移入実験を行い、生着を確認した。さらに虚血再灌流傷害肺モデルを確立した。その傷害肺モデルにAT-IIを移入することで傷害肺を再生させる可能性を求め、死体ドナー肺の適応拡大を目指した。

研究成果の概要（英文）：We established isolation of the type II alveolar epithelial cells (AT-II). We confirmed the engraftment of the transplanted AT-II cells to the right lung after left pneumonectomized rats. Human AT-II cells functions were analyzed and the engraftment of transferred human AT-II cells to immunodeficient rats were confirmed. And we established the ischemia-reperfusion injury lung model in rat. To investigate the potential to regenerate lung injury by transferred AT-II cells in the lung injury model, aimed at indications of cadaveric donor lung.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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、移植・再生

1. 研究開始当初の背景

慢性進行性肺疾患に対する唯一の根治的治療は移植しかないが、世界規模で脳死ドナー不足が問題となっている。この問題はWHOでも議題となり、渡航移植を制限される勧告がなされた。日本では1997年に臓器移植法が公布されたものの、脳死肺移植例は年間に多くて10数例程度にとどまっていた。肺移植希望登録患者数の増加に対し、ドナー臓器提供は限られており、移植を受けられずに死亡される待機患者数も

年々増加傾向である。本邦における脳死ドナーからの肺の利用率は30~40%であるが、この数字は世界の水準(20~25%)よりも高いとは言え、十分なものではない。ドナー不足を解決する方法としてマージナルなドナー肺を使用する臨床報告やドナープールを広げるために死体肺を利用した移植研究が行われてきた。近年、世界的に死体肺移植の長期生存例が報告されて以来、欧米を中心として徐々に広がりつつある。しかしながら、安定した実績が得られているとは言えず、

保存方法のみならず新たな死体肺移植の方法について研究を深める必要があると考えられる。

一方、近年目覚しく発展している研究として再生医療がある。移植医療に代わる医療として注目されている研究分野である。肺再生に関しても種々の機関で研究が行われており、再生促進因子や肺幹細胞について研究報告例が増加している状況である。再生医療が末期状態の慢性肺疾患を寛解させる可能性に関してはさらに追求されるべきであるが、現状では困難であると考えられる。肺再生に関わる肺幹細胞 (Brochoalveolar stem cell; BASC) / II 型肺胞上皮細胞 (type II alveolar epithelial cell; AT-II) を死体肺に投与し肺移植を行う研究の報告例はなく、研究価値はあるものと考えられる。

2. 研究の目的

ドナー不足を解決する一法として再生医療技術に着目し、単離・培養した肺再生に関わる BASC/AT-II を死体肺やマージナルな症例に投与することで傷害肺を再生させ、生着・機能させることを研究の骨子とし、移植医療に貢献することを主たる目的とする。具体的な目的として、① BASC/AT-II の単離培養技術の確立を行い、ドナー肺に投与する前に左肺全摘後の右肺に単離した AT-II を経気管移入を行い、肺胞への生着の確認。②外科的切除肺から得られたヒト材料を用いてヒト II 型肺胞上皮細胞細胞 (hAT-II) の機能解析および hAT-II の免疫不全ラットへの移入実験を行い、傷害肺モデルの確立。③虚血再灌流傷害 (IRI: ischemic reperfusion injury) 肺モデルの確立。④死体肺移植モデルの確立と BASC/AT-II の移入、とした。

3. 研究の方法

①単離技術は Richard RJ らが報告した方法を modify した形で行う。7-8 週齢の Wister rat (雄性) より両側肺および気管を一塊として摘出し、気管支支洗浄後、マクロファージを除去する。0.25%トリプシンにて蛋白分解した後に細かく分割し、DNase (7500U/100ml) に溶解し、フィルターにかけた後、濾過液を遠心する。ペレットを DNase で溶解し再度同条件で遠心する。残ったペレットを培養液で懸濁し、40 μ m のフィルターにかけた後、2 時間培養を行い浮遊している細胞を得る。得られた細胞は、AT-II の特異的マーカーである Surfactant protein C (SP-C) による蛍光染色と、透過性電子顕微鏡所見により、AT-II であること確認する。

②同意を得たヒト患者の手術による新鮮切除肺 (倫理審査認可済み) より hAT-II を採取・短期培養し、ラットに対して行った方法と同様の手法で単離・培養を行い、 2.5×10^6 cells を左肺全摘した F344/NJcl-rnu/rnu rat (免疫不全ラット) に気管内移入し術後 1 ヶ月で犠牲死させ、肺胞への生着の有無を確認する。また培養における細胞の分化を確認した。

③肺移植手技に伴う虚血再灌流傷害を調べ

る目的で Iwata らが作成した肺門クランプモデルを利用し、マージナルドナー肺モデルとしての再現性を求めた。

④ラットの同所性の死体肺移植を行なう。ヘパリンを投与後、麻酔下脱血死させたラットを 2 時間静置し、肺移植を行うモデルを作成する。

4. 研究成果

①方法に沿って単離した細胞は SP-C による蛍光染色や、電子顕微鏡による AT-II の特徴から約 85% が BASC/AT-II であることを確認できた。培養を行うと、細胞総数としては減少するものの前駆細胞としての機能を有する AT-II から AT-I (I 型肺胞上皮細胞) に分化している可能性を FACS で確認した。

移入細胞の生着を確認したところ、左肺全摘後に移入した細胞は生着したが、開胸操作のみのラットに移入した細胞は生着しなかった。

②切除肺正常亜区域肺から $1 \times 10^5 \sim 10^6$ の細胞が分離され、SP-C による蛍光染色や電子顕微鏡により、その多くが hAT-II であると確認した。

単離培養した hAT-II は減少する、FACS により hAT-II は hAT-I に分化することを確認し、hAT-II を傷害肺に投与することで hAT-I に分化して肺胞が再生されうる可能性が示唆された。

hAT-II を左肺全摘した F344/NJcl-rnu/rnu に気管内移入した摘出標本からヒト特異抗体を用いた免疫染色および RT-PCR を行い、ヒト細胞の存在を確認した。またヒト SP-C の RNA が存在する移入細胞の一部が肺胞壁を形成したことを確認した。

③IRI 肺を分担研究者の岩田らが報告した肺門部クランプモデルで行った。クランプ時間 (温虚血時間) と再灌流から摘出までの時間を調節し、一定条件下での肺傷害を生きたドナーラットで引き起こすことができ、死体肺も含めたマージナルドナー肺モデルとしても再現性が高いと考えられた。また、preliminary に、IRI モデル肺に経気管的に AT-II 移入を行い、その生着を確認した。

④死体肺移植モデルの確立・AT-II 移入については、実験を継続している最中である。移植後のドナー肺の変化について、急性期、慢性期で犠牲死させ、移植肺の組織評価 (Grade 分類を含む) を行い、単離した AT-II を死体肺に移入した群について同様の評価を行い、比較検討する方針である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Wada H, Yoshida S, Suzuki H, Sakairi Y, Mizobuchi T, Komura D, Sato Y, Yokoi S, Yoshino I. Transplantation of alveolar type

II cells stimulates lung regeneration during compensatory lung growth in adult rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 査読あり, Vol 143, 2012, 711-719.

- ② Suzuki H, Fan L, Wilkes DS. Development of obliterative bronchiolitis in a murine model of orthotopic lung transplantation. *J Vis Exp*, 査読あり, Vol 10, 2012, pii: 3947. doi: 10.3791/3947
- ③ Benson HL, Suzuki H, Lott J, Fisher AJ, Walline C, Heidler KM, Brutkiewicz R, Blum JS, Wilkes DS. Donor lung derived myeloid and plasmacytoid dendritic cells differentially regulate T cell proliferation and cytokine production. *Respir Res*, 査読あり, Vol 13, 2012, 25. doi: 10.1186/1465-9921-13-25

[学会発表] (計 16 件)

- ① 鈴木秀海, 吉田成利, 豊田行英, 尹 貴正, 山本高義, 鎌田稔子, 森本淳一, 坂入祐一, 山田義人, 田川哲三, 岩田剛和, 千代雅子, 溝渕輝明, Wilkes DS, 関根康雄, 吉野一郎. 肺移植後慢性拒絶反応に対する動物モデル. 第29回日本肺および心肺移植研究会, 2013.1.26, 千葉.
- ② 坂入祐一, 和田啓伸, 吉田成利, 稲毛輝長, 森本淳一, 鎌田稔子, 千代雅子, 山田義人, 岩田剛和, 米谷卓郎, 溝渕輝明, 守屋康充, 本橋新一郎, 吉野一郎. II型肺胞上皮を用いた肺再生・保護療法を目指した基礎研究. 第11回日本再生医療学会総会, 2012.6.12, 横浜.
- ③ Suzuki H, Keller M, Burlingham WJ, Pandya PH, Wilkes DS. Differential induction of IL-17, IL-10, IFN- γ and OB by donor antigens and col(V) post lung transplantation. *ATS2012*, 2012.5.18 San Francisco
- ④ 坂入祐一, 和田啓伸, 吉田成利, 稲毛輝長, 森本淳一, 石橋史博, 千代雅子, 山田義人, 岩田剛和, 米谷卓郎, 溝渕輝明, 守屋康充, 本橋新一郎, 吉野一郎. 呼吸器外科手術における肺再生・保護療法を目指した基礎研究. 第29回日本呼吸器外科学会総会, 2012.5.17, 秋田.
- ⑤ 坂入祐一, 和田啓伸, 吉田成利, 稲毛輝長, 森本淳一, 石橋史博, 千代雅子, 溝渕輝明, 米谷卓郎, 守屋康充, 星野英久, 本橋新一郎, 吉野一郎. ヒトII型肺胞上皮細胞の異種経気道移植による肺再生モデルの作成. 第112回日本外科学会定期学術集会, 2012.4.14, 千葉
- ⑥ 坂入祐一, 和田啓伸, 吉田成利, 稲毛輝長, 森本淳一, 石橋史博, 岩田剛和, 千代雅子, 溝渕輝明, 米谷卓郎, 守屋康充, 星野英久,

本橋新一郎, 吉野一郎. ヒト肺細胞の気管内移入による肺再生モデルラットの作成. 第28回日本肺および心肺移植研究会 2012.1.28, 仙台

- ⑦ 坂入祐一, 吉田成利, 稲毛輝長, 森本淳一, 石橋史博, 山田義人, 岩田剛和, 米谷卓郎, 千代雅子, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 本橋新一郎, 吉野一郎. 異種細胞の気管内移入による肺再生モデルの作成. 第1243回千葉医学会 2012.1.21, 千葉
- ⑧ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村 創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 河村大輔, 横井左奈, 吉野一郎. II型肺胞上皮細胞を用いた術後残存肺における肺再生療法の開発第64回日本胸部外科学会定期学術集会 2011.10.11, 名古屋
- ⑨ 坂入祐一, 和田啓伸, 吉田成利, 稲毛輝長, 森本淳一, 石橋史博, 岩田剛和, 千代雅子, 溝渕輝明, 米谷卓郎, 守屋康充, 星野英久, 本橋新一郎, 吉野一郎. 肺再生療法を目的としたヒトII型肺胞上皮細胞の分離培養法の確立. 第64回日本胸部外科学会定期学術集会 2011.10.11, 名古屋
- ⑩ Wada H, Yoshida S, Suzuki H, Sakairi Y, Ishibashi H, Tamura H, Iwata T, Mizobuchi T, Moriya H, Hoshino H, Okamoto T, Motohashi S, Komura S, Yokoi S, Yoshino I. Proliferative response induced in the remnant lung tissue following pneumonectomy enables transplanted type II alveolar epithelial cells to regenerate alveoli. *ATS2011*, 2011.5.13, Denver
- ⑪ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村 創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 河村大輔, 横井左奈, 吉野一郎. 代償性肺成長の増殖期にII型肺胞上皮細胞を補充することで肺胞の再生が起きる. 第10回日本再生医療学会総会 2011.3.1, 東京
- ⑫ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村 創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 河村大輔, 横井左奈, 吉野一郎. II型肺胞上皮細胞を用いた肺再生療法の開発—代償性肺成長モデルによる基礎実験—. 第27回日本肺および心肺移植研究会 2011.1.29, 岡山
- ⑬ 坂入祐一, 和田啓伸, 鈴木秀海, 吉田成利, 石橋史博, 田村 創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 吉野一郎. ヒト手術肺からの肺再生療法を目的としたcell sourceの分離および解析. 第1217回千葉医学会 2011.1.22, 千葉
- ⑭ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一,

鎌田稔子, 石橋史博, 田村 創, 岩田剛和, 溝渕輝明, 守屋康充, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 吉野一郎. 肺切除後の代償性肺成長における遺伝子プロファイル解析. 第63回日本胸部外科学会定期学術集会 2010.10.25、大阪

- ⑮ Wada H, Yoshida S, Suzuki H, Sakairi Y, Yoshino I. Gene expression profile of compensatory lung growth after left pneumonectomy in rats. ATS2010, 2010.5.18, New Orleans
- ⑯ 和田啓伸, 吉田成利, 鈴木秀海, 坂入祐一, 石橋史博, 田村 創, 芳野 充, 守屋康充, 溝渕輝明, 星野英久, 岡本龍郎, 本橋新一郎, 鈴木 実, 吉野一郎. ラットを用いた肺切除後代償性肺成長における分子機序の解明. 第110回日本外科学会総会 2010.4.12、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 成利 (YOSHIDA SHIGETOSHI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90334200

(2)研究分担者

吉野 一郎 (YOSHINO ICHIRO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：40281547

(3)研究分担者

坂入 祐一 (SAKAIRI YUICHI)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30551949

(4)研究分担者

鈴木 秀海 (SUZUKI HIDEKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60422226

(5)研究分担者

岩田 剛和 (IWATA TAKEKAZU)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30586681

(6)研究分担者

溝渕 輝明 (MIZOBUCHI TERUAKI)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50569861

(7)研究分担者

千代 雅子 (CHIYO MASAKO)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30375688

(8)連携研究者

和田 啓伸 (WADA HIRONOBU)
Division of Thoracic Surgery, Latner Thoracic
Surgery Research Laboratories University
Health Network, Toronto, Canada, Research
Fellow
研究者番号：90514604