

## 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28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010~2012

課題番号：22591560

研究課題名（和文） 移植気道のリモデリング機構の解明：上皮間葉移行現象に着目した新たな試み

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of transplanted rejected airways with special reference to epithelial to mesenchymal transition

研究代表者

村川 知弘 (MURAKAWA TOMOHIRO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50359626

研究成果の概要（和文）：移植気道の組織学的経時的検討から線維化に先立つ上皮の劇的な形態変化の中で上皮間葉移行（EMT）が生じている可能性を示唆する所見を得た。一方、遺伝子組換えマウスを用いた検討では、線維化を引き起こす線維芽細胞の大半はレシピエント由来であるという結果を得た。移植臓器線維化過程に上皮の何らかの関与はあると推察されるが、移植片を機能廃絶から rescue するためにはレシピエント骨髄由来細胞の線維芽細胞への分化をブロックすることが重要だと示唆する成果である。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that epithelial to mesenchymal transition had some roles in transplanted rejected airways using histological assessment of changes over time. On the other hand, our results using transgenic mice revealed that the fibroblasts in fibrosis of transplanted airways originated from the recipient. This suggests that blocking fibroblasts differentiation from recipient bone marrow precursor cells may lead to preventing fibrosis in transplanted organs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、線維化、閉塞性細気管支炎

## 1. 研究開始当初の背景

終末期肺病変に対する唯一の救命方法は肺移植である。肺機能を長期に渡り補助しうる補助人工臓器が不在のためこの状況は暫く継続するものと考えられる。しかしながら肺移植の長期予後は5年生存率で約50%と不良であり、その原因として Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) として知られる慢性拒絶による airway remodeling があげら

れる。

移植臓器の機能拒絶に関わる重要な remodeling のプロセスとして上皮間葉移行 (epithelial to mesenchymal transition: EMT) という現象が注目されており、BOS で認められる小気道の線維化・気道閉塞の原因としてもその可能性を疑われている。

申請者らは移植肺拒絶の症例で BOS と同時に認められる lymphocytic bronchitis のモデ

ルであるマウス同所性気管移植モデルにおいて気道上皮下の著しい線維化が認められること、この過程は気道上皮の chimerism、上皮形態の扁平化、血管新生と密接に関連することを報告していたが、これらの現象は上皮と上皮下層の線維化現象に仲介するメカニズムが存在するのではないかと強く疑わせる所見であった。この Fibrosis 形成過程の起源を明らかにするために、マウス同所性気管移植モデルを用いて fibrosis という過程に EMT がどのように関与しているのか明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

移植気道の remodeling に如何に EMT が関与し、その調節に関わっているかを明らかにし、また当該経路の薬物的修飾により移植片を機能拒絶より rescue することにある。

x

## 3. 研究の方法

Major histocompatibility complex mismatch pair である BALB/c (H-2d)→B6 (H-2b) の組み合わせでマウス気管移植を行い、airway remodeling model とした。同所性移植においては上皮下の線維化が起こり移植臓器における fibrosis を表すと考えられる。一方、皮下に気管を移植するマウス異所性気管移植も行ったが、この移植においては内腔の線維性閉塞が fibrosis を表すとされている。

(1) H&E 染色に加えて、免疫組織染色の手法を用いて同所性気管移植術後のグラフトの上皮・上皮下の経時的変化を観察した。上皮系マーカー (E-Cadherin) や間葉系マーカー ( $\alpha$ -SMA) を用いてこれらの発現の推移を上皮・上皮下で観察した。

(2) 移植気道においては線維化の主役である線維芽細胞の起源が EMT を介したドナー上皮細胞であるのかもしくはレシピエントの骨髄由来間葉系細胞であるのかという点において長らく議論があるのだが、異系移植ペアの一方に Green fluorescent protein (GFP) を全身に発現する GFP マウスを用いて気管移植を行い、拒絶臓器の線維化がドナーとレシピエントどちらに由来するかを組織学的に検討した。線維化層において線維芽細胞を示す  $\alpha$ -SMA が GFP 陽性か否かで由来を判定した。同様の検討を同所性気管移植のみでなく異所性気管移植においても行った。

## 4. 研究成果

(1) 術後、著しい炎症細胞浸潤・上皮の偽重層化→上皮細胞の剥脱→炎症鎮静化・気道

上皮扁平化→気道上皮下の線維化が完成、という一連の経過が H&E 染色にて観察された。術後 2 日目～10 日、14 日、28 日目の各移植片に上皮系マーカーである E-Cadherin、間葉系マーカーである  $\alpha$ -SMA の免疫組織染色を施行したところ術後 7 日目 (移植片全体の炎症細胞浸潤と上皮の偽重層化が最も著しい時期) の移植片において上皮内  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の出現とその細胞における E-Cadherin の減弱が認められた。このことは上皮が傷害を受けた頃に上皮間葉移行が起こる可能性を示唆していた。

(2) C57BL/6 の GFP マウスと naïve BALB/c マウスのペアで同所性気管移植を行い術後 28 日目の気道上皮下線維化層における GFP 発現の有無を調べた。結果、この検討においては線維芽細胞の大半はレシピエントに由来することが判明した。(1) の組織学的検討より上皮と間質の間には cross-talk があると考えられるが、最終的な状態においての線維芽細胞はレシピエント由来のものであることが本研究からは示唆された。

## 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 18 件)

- ① Chihiro Konoeda, Daizo Koinuma, Yasuyuki Morishita, Atsushi Sano, Kazuhiro Nagayama, Noboru Motomura, Kazuhiro Kakimi, Kohei Miyazono, Jun Nakajima, Tomohiro Murakawa. Epithelial to Mesenchymal Transition in Murine Tracheal Allograft Transplantation: An Immunohistochemical Observation. Transplantation Proceedings. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.11.024 掲載確定、査読有
- ② Hideki Kuwano, Takehiro Tsuchiya, Tomonori Murayama, Atsushi Sano, Kazuhiro Nagayama, Yukihiro Yoshida, Tomohiro Murakawa, Jun Nakajima. Outcomes of combined modality therapy for patients with stage III or IV mediastinal malignant germ cell tumors. Surgery Today. 2013 Apr 4. [Epub ahead of print] 査読有
- ③ Tomohiro Murakawa, Chihiro Konoeda, Takuya Ito, Yuta Inoue, Atsushi Sano, Kazuhiro Nagayama, Jun Nakajima. The ground glass opacity component can be eliminated from the T-factor assessment of lung adenocarcinoma. European journal of cardio-thoracic

surgery. 2013;43(5):925-932.

doi: 10.1093/ejcts/ezs467. 査読有

- ④ Takuya Ito, Tomohiro Murakawa, Hajime Sato, Aska Tanabe, Masaki Maekawa, Yukihiro Yoshida, Masashi Fukayama, Jun Nakajima. Simple preoperative computed tomography image analysis shows good predictive performance for pathological vessel invasion in clinical stage IA non-small cell lung cancer. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery. 2012;15(4): 633-8. 査読有
- ⑤ Kentaro Kitano, Kousuke Watanabe, Noriko Emoto, Hidenori Kage, Emi Hamano, Takahide Nagase, Atsushi Sano, Tomohiro Murakawa, Jun Nakajima, Akiteru Goto, Masashi Fukayama, Yutaka Yatomi, Nobuya Ohishi, Daiya Takai. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. Cancer Science. 2011 Dec;102(12):2126-31. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02101.x. 査読有
- ⑥ 此枝千尋、川島光明、佐野厚、村川知弘、中島淳。骨肉腫治療後二次癌として発症した17歳の原発性肺癌。胸部外科。65巻13号 Page1127-1130. 査読有

[学会発表] (計14件)

- ① 此枝千尋, 移植気道の線維化における線維芽細胞の起源: GFP マウスを用いた同所性気管移植モデルでの検討. 第30回日本呼吸器外科学会. 2013年5月9日, 名古屋
- ② 此枝千尋, Origin of Fibroblasts in Rejected Airway: Experiment with Orthotopic Tracheal Allograft Transplantation Model Using Transgenic GFP Mice. The International Society For Heart and Lung Transplantation 33rd Annual Meeting and Scientific Sessions. 2013年4月26日, モントリオール (カナダ)
- ③ 此枝千尋, 上皮間葉移行に着目したマウス気管移植の組織学的検討. 第29回日本肺および心肺移植研究会. 2013年1月26日. 千葉
- ④ 長山和弘, 造血幹細胞移植後の閉塞性細気管支炎に対する脳死肺移植症例の検討. 第29回日本肺および心肺移植研究会. 2013年1月26日. 千葉
- ⑤ 此枝千尋, 上皮間葉移行に着目したマウ

ス気管移植の組織学的検討. 第48回日本移植学会総会. 2012年9月22日. 名古屋

- ⑥ 長山和弘, 造血幹細胞移植後の閉塞性細気管支炎に対する脳死肺移植症例の検討. 第48回日本移植学会総会. 2012年9月22日. 名古屋
- ⑦ 此枝千尋, Epithelial to Mesenchymal Transition in Murine Tracheal Allograft Transplantation: An Immunohistochemical Observation. 24th International Congress of The Transplantation Society. 2012年7月17日, ベルリン (ドイツ)
- ⑧ 佐野厚. 脳死肺葉移植におけるドナー・レシピエントの全肺気量比と術後早期成績. 第28回日本肺および心肺移植研究会. 2012年1月28日. 仙台

[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://ctstokyo.umin.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村川 知弘 (MURAKAWA TOMOHIRO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50359626

(2)研究分担者

中島 淳 (NAKAJIMA JUN)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90188954

佐野 厚 (SANO ATSUSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20569834