

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23日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591569
 研究課題名（和文）肺切除後の残存肺再生および創傷治癒における骨髄由来幹細胞の役割の解明
 研究課題名（英文）Significant role of bone marrow-derived cells in compensatory regenerative lung growth
 研究代表者
 上田 和弘 (UEDA KAZUHIRO)
 山口大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：90420520

研究成果の概要（和文）：GFP 陽性骨髄細胞を移植したキメラマウスを用いて代償性肺成長モデルにおける骨髄由来細胞の関与について検討した。左肺全摘により残存肺への GFP 陽性細胞の集積増加を認めた。左肺全摘後 7 日目に残存肺の SDF1 α 濃度は 1.4 倍に上昇した。CXCR4 アンタゴニストを肺全摘直後から持続投与し骨髄細胞の集積抑制を試みた結果、術後 14 日目での肺乾燥重量は 10% の低下を認めた。骨髄由来細胞は代償性肺成長時の残存肺に集積し組織再生に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Regenerative lung growth was induced by left pneumonectomy in GFP-positive bone marrow-transplanted chimeric mice. GFP-positive cells were observed 2.1-fold more frequently in the lungs of pneumonectomized mice vs. sham operated mice by immunohistochemistry (P=0.001). Pneumonectomy induced a 1.4-fold increase in the SDF-1 α level in the remaining lung at seven days compared to sham operated mice (P<0.05). Blockade of SDF-1/CXCR4 signaling resulted in a significant reduction in the accumulation of GFP-positive cells in the remaining lung at seven days, and prevented regenerative lung growth, as shown by a 10% reduction in the lung dry weight at 14 days compared to control pneumonectomized mice (P<0.05). Bone marrow-derived cells played a significant role in compensatory regenerative lung growth in an adult mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：骨髄由来細胞・代償性肺成長

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来細胞 (Bone marrow-derived cell:

BMC) が様々な臓器において組織再生に関与していることは知られているが、肺において

は不明のままである。また、肝実質とは異なり、成人の肺実質は再生しないとされているため、肺癌治療における肺の大切除に起因する肺機能低下は臨床上しばしば深刻な問題となる。興味深いことに、肝臓には幹細胞が存在し、肝切除後の残存肝組織の回復、すなわち自己修復に寄与するとされているが、いったん広範囲の肝障害を受けると、BMC も肝実質の修復に関与するといわれている。これらより、我々はBMCが肺切除術後の残存肺機能回復に関与するのではないかという仮説を立てた。

実験動物、特に齧歯類において片肺全摘を行うと対側の残存肺が代償性に、肺胞数の増加を伴って増大することが知られている。この現象は代償性肺成長（compensatory lung regenerative growth : CLG）と呼ばれている。CLGは、残存肺の重量、容量、DNA量、タンパク量の増加を伴う現象である。過去の基礎研究で、CLGに促進的に働く様々なサイトカイン、成長因子、成長ホルモンが明らかにされており、なかでも有効とされるものに、DCI、TTF-1、corticosteroid、EGF、EPOR、HGF、HIMF、HIF1 α 、IGF-1、KGF、retinoic Acid、VEGFが挙げられる。しかし、臨床試験により有用性が証明されたものはなく、新たな肺実質再生療法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスのCLGにおいて、BMCが関与するか否かを検証することである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物として、6~8週齢のC57BL/6マウス及びGreen fluorescent protein (GFP)-transgenicマウスを用いた。本実験は山口大学の実験動物倫理委員会で承認されており、動物倫理に十分な配慮を行った上で施行した。

X線全身照射(10Gy)したC57BL/6マウスに対して、GFP-transgenicマウスから採取した骨髄細胞を移植することで、骨髄細胞のみGFP陽性細胞に置換したGFP骨髄キメラマウスを作製した。キメラマウスは骨髄移植8週間後に実験に使用した。

(2) 肺切除術

ペントバルビタールの腹腔内投与による全身麻酔下に、約2cmの後側方切開を加え、第5肋間にて開胸した。右肺を肺門部で結紮の後に摘出した群を肺切除群（以下PNX群）とし、開胸のみを行い肺切除を行わなかった群を対照群（以下Sham群）とした。

(3) 肺組織中のSDF (stromal-cell-derived factor) -1 α 測定

肺切除後1、3、5、7、10日目の残存肺と、開胸のみの右肺の肺組織中のSDF-1 α の濃度は、ELISAキット (R&D Systems) を使用して測定した。

(4) BMC 集積阻害

キメラマウスはPNX群とSham群の2群にランダムに分けた。SDF-1 α /CXCR4シグナルを介した残存肺へのBMCの集積を阻害するために、CXCR4拮抗薬であるAMD3100 (Sigma) をosmotic pump (ALZET) を用いて手術直後から術後7日目まで皮下に持続投与した

(10mg/kg)。コントロールとして、PBSを同様に皮下に持続投与した。

(5) 肺容積比並びに組織学的分析

残存肺を15cmH₂Oで膨張させ、肺門部で結紮、24時間10%ホルマリン液で固定後、volume displacement法を用いて肺容積を測定し、マウス最終体重で除したものを肺容積比 (Lung volume index: LVI) として算出した。その後、パラフィン固定し組織学的評価を行った。肺胞面積を評価するため、明視野顕微鏡下で単視野内 (×200倍) の任意に選んだ5視野において、Image J pro ソフトウェアを用いて、全肺胞面積、肺胞数を測定し、肺胞面積を算出した。その平均値を統計学的分析に用いた。

残存肺のBMCの集積と細胞増殖を評価するためするために、GFP、Ki67の免疫染色を行った。残存肺のパラフィン切片を用いて、ブロッキングを行った後、抗GFPラビット抗体 (MBL)、抗Ki-67ラビット抗体 (Abcam) と室温で1時間反応させた。その後、EnVision-System HRP Anti-Rabbit (Dako) と反応させ、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) で発色させた。また、細胞核をヘマトキシリンで染色した。GFPの陽性細胞は、明視野顕微鏡下で単視野内 (×400/High power field:HPF) の陽性数を測定した。ランダムに選んだ20視野で測定を行い、その平均値を統計学的分析に用いた。

Ki67陽性細胞は、明視野顕微鏡下で単視野内 (×200倍) の視野でKi67陽性細胞、核数を測定した。ランダムに選んだ5視野でKi67陽性細胞率を算出し、その平均値を統計学的分析に用いた。

(6) 肺重量比並びに肺湿乾重量比測定

残存肺のCLGの評価として、肺の重量を測定した。残存肺を摘出し、肺湿重量を測定した。次に、オーブンで95°C下に24時間乾燥し肺乾燥重量を測定した。マウスの最終体重で除することで肺乾燥重量比 (LDWI: lung dry

weight index) を算出した。肺湿重量と肺乾燥重量とで肺湿乾重量比を算出した。

(7) 統計学的分析

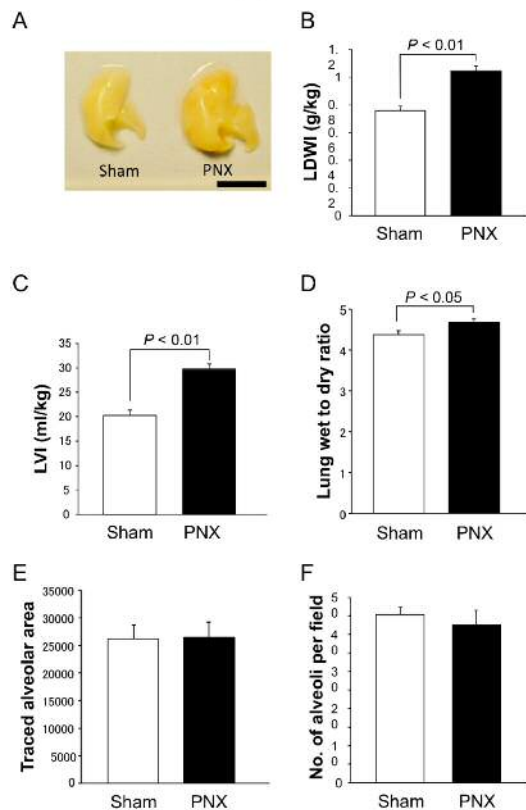
全てのデータは平均値±標準誤差で表し、統計的有意差は対応のないt検定を行った。統計分析ソフトはStat View(Ver. 5.0)を用い、 $p < 0.05$ をもって統計学的有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 代償性肺成長時の肺の形態的評価

肺切除後7日目の残存肺、Sham開胸後7日目の右肺を図1Aに示す。肺乾燥重量比は、PNX群においてSham群よりも有意に増加していた (1.043 ± 0.038 g/kg vs. 0.757 ± 0.034 g/kg, $P < 0.001$, 図1B)。肺容量比はPNX群においてSham群よりも有意に増加していた (29.690 ± 2.837 ml/kg vs. 20.298 ± 1.500 ml/kg, $P < 0.01$, 図1C)。肺湿乾重量比はPNX群においてSham群よりも有意に増加していた (4.677 ± 0.076 vs. 4.382 ± 0.093 , $P < 0.05$, 図1D)。また単視野あたりの平均肺胞数は両群間に有意差を認めなかった (42.56 ± 3.933 vs. 45.28 ± 1.986 , $P = 0.5$, 図1E)。単視野あたりの平均肺胞面積も両群間に有意差を認めなかった ($2.6178 \times 10^4 \pm 2783$ vs. $2.6457 \times 10^4 \pm 2510$, $P = 0.9$, 図1F)。

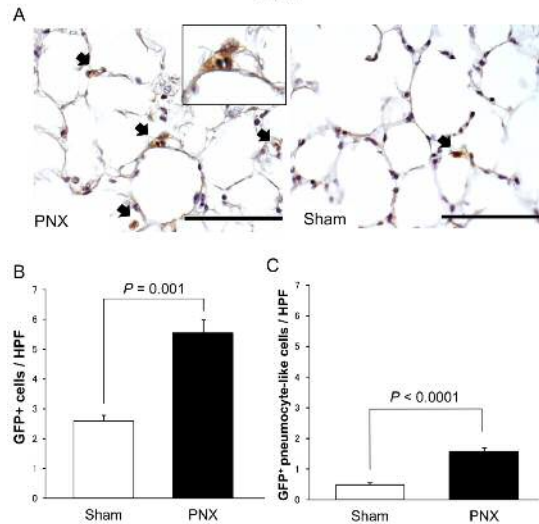
図1



(2) BMCの集積の評価

GFPキメラマウスを用いて、術後7日目の肺へのBMCの集積を評価した。PNX群はSham群と比べ有意に多くのGFP陽性細胞の肺内への集積を認めた (5.538 ± 0.452 / HPF vs. 2.588 ± 0.192 / HPF, $P < 0.001$, 図2A 2B)。集積したGFP陽性細胞の多くは円形であったが、一部では肺胞細胞様に変化したものが認められた(図2A)。肺胞細胞様に変形したGFP陽性細胞は、PNX群でSham群よりも有意に高頻度に集積していた (1.563 ± 0.128 / HPF vs. 0.475 ± 0.073 / HPF, $P < 0.0001$, 図2C)。

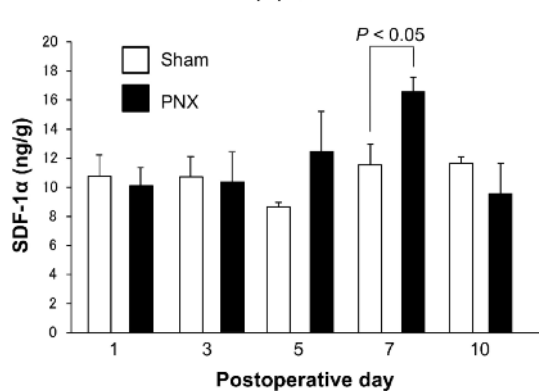
図2



(3) 肺組織中SDF-1 α 濃度の評価

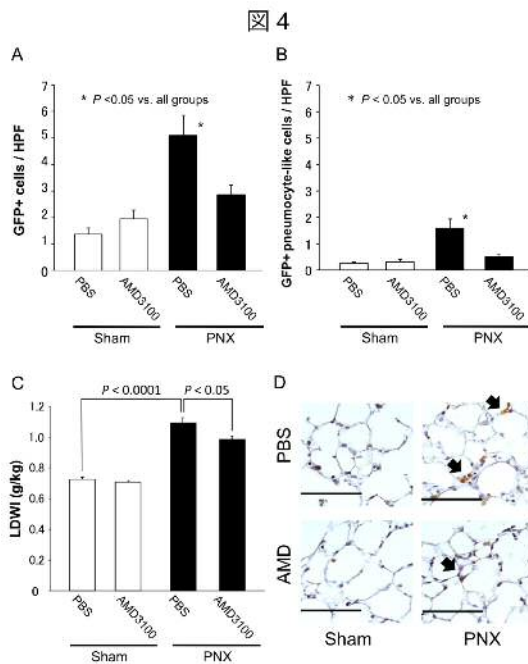
BMCのケモカインであるSDF-1 α を評価した。肺切除後の残存肺の組織中のSDF-1 α の濃度を術後1.3.5.7.10日目において測定した。術後7日目にPNX群で、Sham群よりも有意なSDF-1 α の濃度上昇を認めた (16.573 ± 1.003 ng/g vs. 11.53 ± 1.416 ng/g, $P < 0.05$, 図3)。

図3



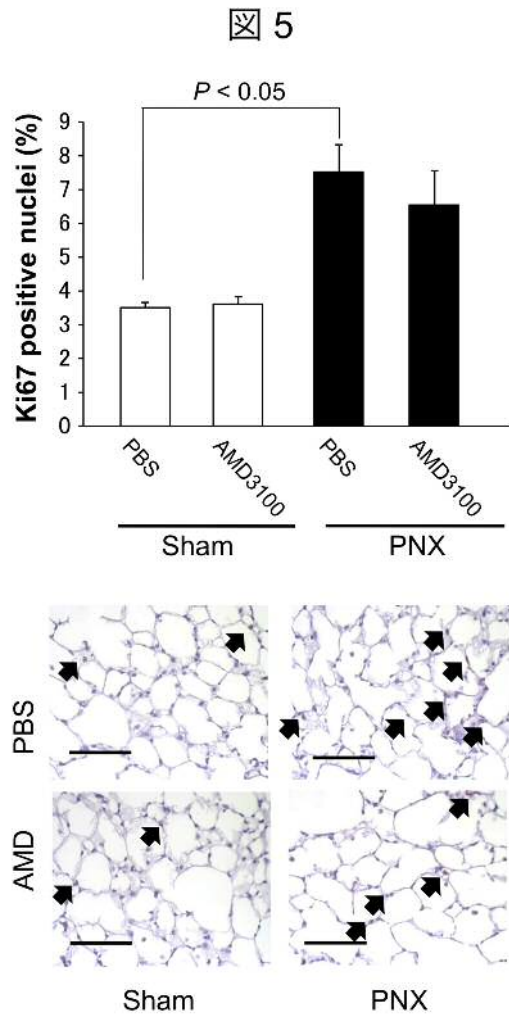
(4) BMC の集積阻害と阻害時の肺乾燥重量比の評価

肺切除後、SDF-1 α /CXCR4 シグナルを阻害し BMC の肺組織への集積を抑制する目的で、CXCR4 拮抗薬である AMD3100 を投与し評価した (PNX+AMD 群)。対照群には PBS のみ投与した (PNX+PBS 群)。術後 7 日後の残存肺に集積した GFP 陽性細胞は、PNX+AMD 群で PNX+PBS 群よりも、有意に少なかった (2.860 ± 0.363 /HPF vs. 5.090 ± 0.76 /HPF, $P < 0.05$, 図 4A)。同様に、肺胞細胞様に形態変化している GFP 陽性細胞も、PNX+AMD 群で PNX+PBS 群よりも有意に少なかった (0.510 ± 0.1 /HPF vs. 1.59 ± 0.344 /HPF, $P < 0.05$, 図 4B)。同様のモデルで肺切除を行わなかった Sham+PBS 群と Sham+AMD 群との間で GFP 陽性細胞の集積の頻度に有意差を認めなかった。術後 7 日目まで AMD3100 を投与し、14 日目に残存肺を摘出し、肺の乾燥重量を測定した。肺乾燥重量比は、PNX+AMD 群で PNX+PBS 群よりも、有意に低値であった (1.091 ± 0.036 g/kg vs. 0.986 ± 0.021 g/kg, $P < 0.05$, 図 4C)。



(5) BMC 集積の阻害時の細胞分裂率評価

術後 7 日目での細胞分裂を評価するために Ki67 免疫染色を行った。PNX+PBS 群では Sham+PBS 群よりも細胞分裂率は有意に高値であった ($7.513 \pm 0.81\%$ vs. $3.511 \pm 0.147\%$, $P < 0.05$, 図 5)。しかし、PNX+AMD 群と PNX+PBS 群との間に有意差は認められなかった ($6.539 \pm 1.014\%$ vs. $7.513 \pm 0.81\%$, $P = 0.5$, 図 5)。



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 1 件)

① Suga A, Ueda K, Takemoto Y, Nishimoto A, Hosoyama T, Li TS, Hamano K. Significant role of bone marrow-derived cells in compensatory regenerative lung growth. Journal of Surgical Research. 2013; in press 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

① 菅淳、上田和弘、林雅太郎、濱野公一. 代償性肺成長における骨髄由来細胞の役割. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013-4-11 福岡国際会議場 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 和弘 (UEDA KAZUHIRO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90420520

(2) 研究分担者

田中 俊樹 (TANAKA TOSHIKI)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50457305

李 桃生 (LI TAOSHENG)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50379997