

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791037

研究課題名（和文） G-C S F の幹細胞血液中動員作用による慢性肺疾患治療の為の基礎的
検討

研究課題名（英文） Basic investigation for treatment of chronic lung disease by G-CSF
administration mobilizing of the stem cell to peripheral blood

研究代表者

北東 功 (HOKUTO ISAMU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00296625

研究成果の概要（和文）：

G-CSF 投与はマウス新生仔に対する高濃度酸素負荷により形成される慢性肺疾患モデルを軽減させた。G-CSF 投与マウス群で気管支肺胞洗浄液中の好酸球数が著明に減少していた。本効果が G-CSF による抗炎症効果のみによるものなのか、G-CSF による幹細胞の末梢血中への動員と同細胞の肺 II 型上皮細胞への分化による効果も複合されているのかは不明である。G-CSF は臨床的にもよく使用されている薬剤であるため、新生児の慢性肺疾患に使用できる可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

G-CSF administration significantly improved a mouse model of chronic lung disease. It is unclear whether G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells differentiated into pulmonary epithelial cells, whether G-CSF induced the proliferation and differentiation of type II epithelial cells, or whether G-CSF exerted anti-inflammatory effects. The results of this study suggest that G-CSF improves pulmonary emphysema associated with chronic lung disease.

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	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：再生医学、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

早産児の生存率は年々向上している。一方で、重症児が生存可能となってきたことにより、様々な合併症の為に長期予後には大きな変化がないとも言われている。

慢性肺疾患は主に早産児に発症する疾患で、未熟な肺が人工呼吸、酸素投与などによって構造の破壊と肺の分岐などを含む

発生の停止が病態であると考えられている。有効な治療法は現在のところ早期のステロイド全身投与のみであるが、神経学的予後が悪くなることが知られているため、使用は限られている。呼吸状態が悪化すると、酸素濃度、吸気圧の上昇が必要となりさらに肺損傷が悪化するという悪循環を来し、呼吸器から離脱できた後も、在宅酸素療法が必要とな

る患者がいるほか、呼吸器から離脱できない患者、さらには肺高血圧を合併し死亡する患者も存在する。

造血幹細胞には血液細胞以外の細胞への分化能を有しており、様々な疾患の治療に役立つ可能性が考えられている。肺のII型上皮細胞に分化するという報告も認められる。G-CSFは骨髄中の造血幹細胞を血中に動員することが知られており、末梢血幹細胞採取で実際に使用されており、安全性が高い薬品である。本研究は、G-CSFを用いた骨髄幹細胞の血中への動員が、慢性肺疾患の病態である破壊された肺胞構造を修復することが出来るかどうかを検討するものである。

2. 研究の目的

本研究は、上記の背景をもとに、高濃度酸素投与によりマウスの慢性肺疾患モデルを作成し、G-CSFを投与することで、肺に変化が出現するかどうかを検討し、さらにそのメカニズムを探るものである。

3. 研究の方法

(1) 慢性肺疾患モデル

妊娠マウス（ICRマウス）を購入する。出生した新生仔マウスを、下記に分け、酸素暴露後のG-CSFの有効性の検討を行った。

① 高濃度酸素暴露/室内気暴露

出生後24時間以内に80%酸素投与を21日間行う。その後50-60%酸素下で48時間観察した後、室内気内での飼育を行った。対照として、室内気暴露を同期間行った。母獣の酸素毒性軽減と母獣のケアによる影響を除くため酸素投与群と室内気群との間で毎日交換した。

② G-CSF投与/生理食塩水投与

50-60%酸素投与終了後、高濃度酸素暴露群、室内気暴露群ともに体重1gあたりG-CSF5 μ gまたは等量の生理食塩水の腹腔内投与を5日間行った。

(2) 効果判定

投与終了後2日目または3週間目に効果判定のため以下の検討を行った

① 体重、肺重量測定

G-CSF/生理食塩水投与開始日、投与終了2日目、投与終了3週目に体重測定、投与終了2日目、投与終了3週目に肺重量の測定を行った。

② 肺組織の検討

ペントバルビタール過剰投与によりマウスを安楽死させ、4%パラホルムアルデヒドで20cm水柱圧にて拡張固定後、肺を摘出した。24時間4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋を行った。切片作成し、ヘマトキシリンエオ

ジン染色、マッソントリクローム染色、及び α -smooth muscle actin (SMA)、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)の免疫染色を行った。

③ 気管支肺胞洗浄

G-CSF/生理食塩水投与後2日目に生理食塩水を用いて、気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。1回1mlを気管内に注入し、3回洗浄し回収、同操作を2回行い、回収液はブルーし、細胞成分は1500回転x5分で遠心分離後細胞数をカウントした。上清はサイトカインの測定に使用した。

④ 有意差検定

有意差検定はMann-Whitney U検定を用い、 $p>0.05$ をもって有意差ありと判断した。

4. 研究成果

(1) 肺摘出時のマウスの体重、体重増加率、肺体重比

酸素暴露群は室内気暴露群に比し有意に体重が軽かった。G-CSF投与群と生食投与群で有意差は認められなかった。酸素/室内気暴露終了時とG-CSF/生食投与後3週時の体重比、肺重量比についても有意差は認められなかった。(表)

表

		体重 (g)	体重増加比	肺重量 / 体重
Room air	生食	35.8	2.71	0.0048
	G-CSF	32.9	2.36	0.0051
O ₂	生食	24.2	2.93	0.0061
	G-CSF	23.6	3.86	0.0065

(2) 肺の組織所見

① G-CSF投与終了後2日目と投与終了後3週目のHE染色結果を下記に示す。酸素暴露群の肺はG-CSF投与2日目、および3週目において室内気暴露群に比べ有意に気腫状変化を呈していた。酸素暴露群ではG-CSF投与群で気腫状変化が投与2日後では変化がなかったが、投与後3週後に軽減されていた。(図1、2)

図1

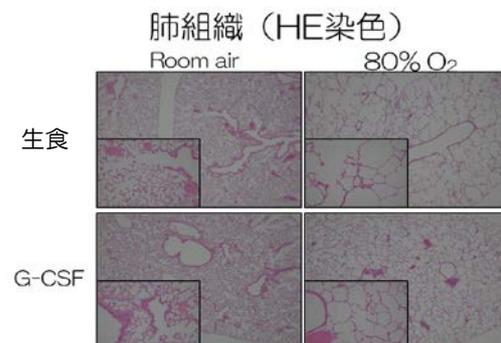
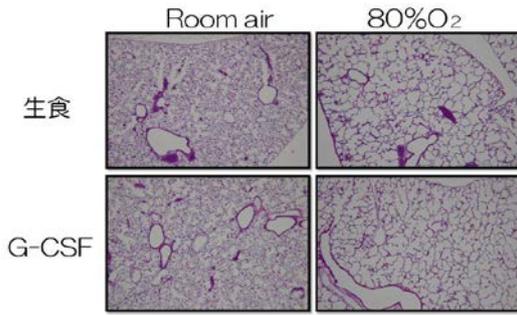


図 2



続いて ImageJ を用いて肺胞数を検討した。室内気暴露、生食投与群を 1 として、4 グループ間で比較した。酸素暴露群の肺胞数室内気群に比べ 40% 近くに減少していた。酸素暴露群で G-CSF 投与と生食投与群を比較すると、投与終了後 2 日目では差は認められなかったが、投与終了後 3 週目で G-CSF 投与群の肺胞数は有意に増加していた。(図 3、4)

図 3

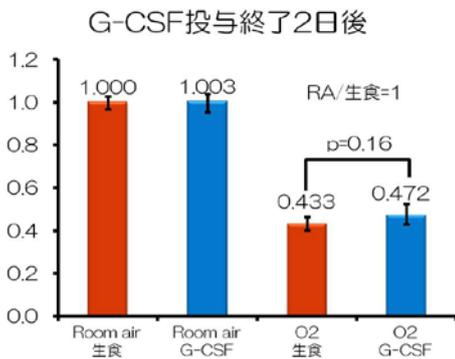
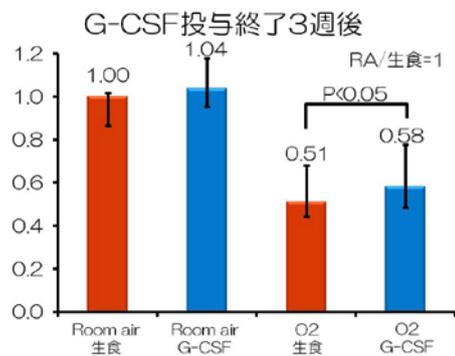
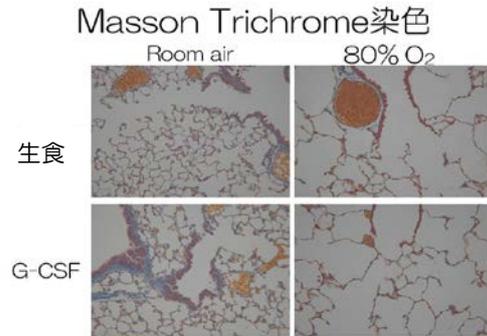


図 4



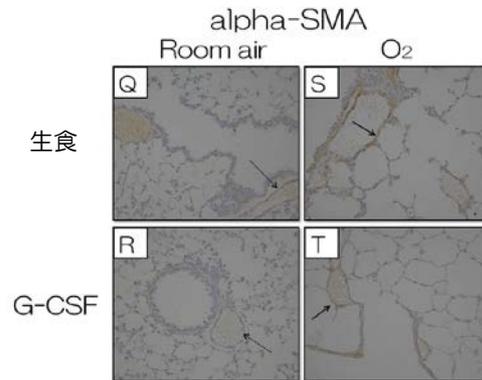
②次に、肺泡領域の線維化の程度を観察するため、治療終了 3 週間後の検体を用いて Masson Trichrome 染色を行った。酸素暴露群で線維化が進行していたが、G-CSF 投与群と生食投与群の間に差は認められなかった。(図 5)

図 5



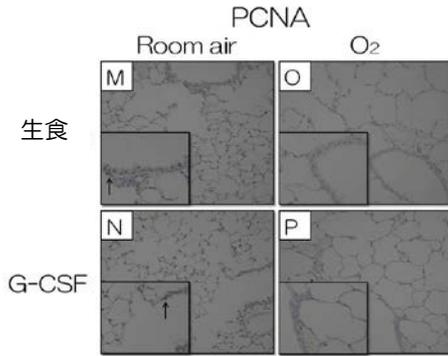
③重度の気腫化に伴い、肺動脈の筋層部肥厚が認められることがあるため、治療終了 3 週間後の検体を用いて、 α -平滑筋アクチン (α -SMA) の免疫染色を行った。酸素暴露群で動脈周囲に強い染色が認められたが、G-CSF 投与群と生食投与群で差は認められなかった。(図 6)

図 6



④上述したように、酸素暴露群において、G-CSF 投与により肺胞数の有意な増加が認められた。そのメカニズムの解明のため、細胞増殖に変化があるかどうかを、治療終了後 3 週間目の検体を用いて proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を用いた免疫染色を用いて検討した。すべての群で PCNA 陽性細胞数は少なく、細胞増殖が盛んになり肺胞形成が進んだとは考えにくい結果であった。(図 7)

図 7

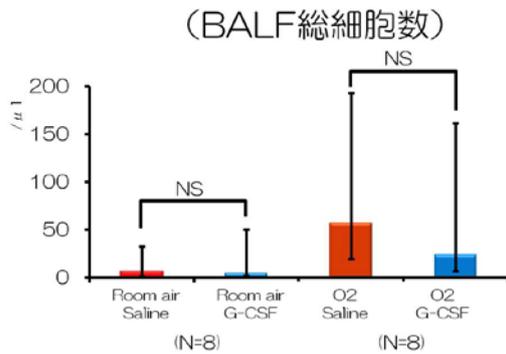


(3) 気管支肺胞洗浄液の検討

そこで、次に G-CSF の抗炎症作用に着目し、BAL 中の炎症性細胞浸潤の程度とサイトカインの定量を行った。

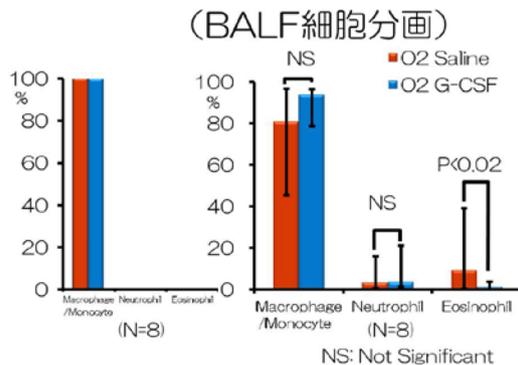
①BAL 中細胞数は、酸素暴露群で有意に増加していた。酸素暴露群では、G-CSF 投与群で総細胞数が生食投与群より少ない傾向にあったが、有意差は認められなかった。(図 8)

図 8



②細胞分画の検討では、酸素暴露群で G-CSF 投与群の好酸球数は生食投与群に比べ有意に低下していた。好中球数に差は認められなかった。(図 9)

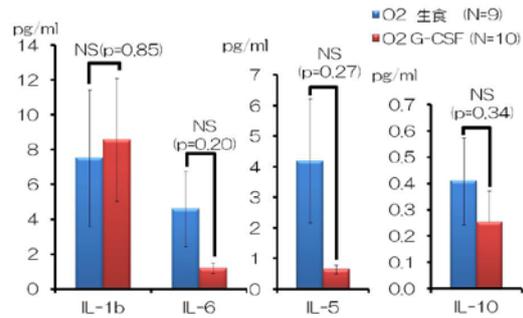
図 9



③炎症性サイトカイン定量については測定したすべての項目で酸素暴露群で上昇していた。酸素暴露群での比較では、G-CSF 投与群で生食投与群に比しサイトカインが低い傾向にあったものの有意差は認められなかった。(図 10)

図 10

(BALF中サイトカイン)



以上の結果から、新生仔マウスへの高濃度酸素暴露による慢性肺疾患モデルにおいて、G-CSF の腹腔内投与は好酸球の浸潤を軽減し、炎症を早期に抑制することによって、気腫状変化を軽減させる事が出来たと考えられた。さらに検討が必要であると思われるが、G-CSF 投与は、新生児の慢性肺疾患に対する治療薬となる可能性があると考えられた。

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 8 件) すべて査読あり

1. Okishio E, Arimitsu T, Miwa M, Matsuzaki Y, Hokuto I, Ikeda K. Metabolic acidosis due to continuous drainage of massive chylous pleural effusion in two neonates. *Pediatr Int.* 2012 Oct; 54(5):732-3.
2. Hokuto I, Matsuzaki Y, Miwa M, Arimitsu T, Okishio E, Ikeda K. Hepatocyte growth factor levels of cord blood in healthy term newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2012 Sep; 97(5):F389.
3. Matsuzaki Y, Hokuto I, Ikeda K. Surfactant protein A in gastric fluid at birth as a useful marker of differentiation diagnosis between respiratory distress syndrome and transient tachypnea of the newborn. *Pediatr Int.* 2011 Oct;53(5):788-9

4. Arimitsu T, Uchida-Ota M, Yagihashi T, Kojima S, Watanabe S, Hokuto I, Ikeda K, Takahashi T, Minagawa-Kawai Y. Functional hemispheric specialization in processing phonemic and prosodic auditory changes in neonates. *Front Psychol.* 2011; 2:202.
5. Kurihara N, Miwa M, Matsuzaki Y, Hokuto I, Kikuchi H, Katano S, Ikeda K. Usefulness of measurement of urinary N-terminal pro-brain natriuretic peptide in neonatal period. *Pediatr Int.* 2011 Aug;53(4):608.
6. Kuratsuji G, Hokuto I, Higuchi M, Koinuma G, Morikawa Y, Hoshino K, Tanaka M, Miyakoshi K, Ikeda K. Final diagnosis in patients with congenital cystic lung disease detected by fetal ultrasonography. *Pediatr Int.* 2011 Feb;53(1):131-2.
7. Fuchimoto Y, Tomita H, Takasato F, Yamamoto Y, Mori M, Shimojima N, Hoshino K, Hokuto I, Ikeda K, Morikawa Y. Survival of a congenital ileal atresia infant weighing 359 g at birth after laparotomy. *Pediatr Int.* 2011 Feb;53(1):127-8.
8. Furukawa R, Miwa M, Hokuto I, Ikeda K. C-reactive protein in extremely low birth weight infants using evanescent wave immunoassay to make normative standards after birth. *Pediatr Int.* 2010 Dec; 52(6):898.

[学会発表] (計 7 件)

1. 北東功, 松崎陽平, 有光威志, 三輪雅之, 木下眞里, 池田一成 distress の無い状態で出生した正期産児の臍帯血血清 HGF 値 第 57 回日本未熟児新生児学会 2012 年 11 月 27 日 熊本
2. 北東功, 松崎陽平, 有光威志, 三輪雅之, 池田一成 高濃度酸素投与による慢性肺疾患モデルマウスに対する G-CSF 投与は有効かー第 2 報ー 第 48 回日本周産期・新生児医学会総会 2012 年 7 月 9 日 大宮
3. 北東功, 松崎陽平, 三輪雅之, 有光威志, 置塩英美, 本間英和, 池田一成 当院における出生体重 400g 未満の児へのカルシウムとリンの補給 第 56 回日本未熟児新生児医学会総会 2011 年 11 月 13 日 東京

4. 北東功, 有光威志, 松崎陽平, 三輪雅之, 置塩英美, 池田一成 高濃度酸素投与による慢性肺疾患モデルマウスに対する G-CSF 投与は有効か? 第 47 回日本周産期・新生児医学会総会 2011 年 7 月 11 日 札幌
5. 北東功, 三輪雅之, 松崎陽平, 有光威志, 置塩英美, 池田一成 血清 HGF は慢性肺疾患の重症度予測因子となりうるか? 第 55 回日本未熟児新生児学会総会 2010 年 11 月 6 日 神戸
6. Isamu Hokuto, Takeshi Arimitsu, Yohei Matsuzaki, Kazushige Ikeda. G-CSF administration improves chronic lung disease caused by exposure to high-concentration oxygen in neonatal mice 2012 年 9 月 5 日 ウィーン、オーストリア
7. Isamu Hokuto, Takeshi Arimitsu, Masayuki Miwa, Yohei Matsuzaki, Kazushige Ikeda. Association between severe bronchopulmonary dysplasia and serum HGF levels in premature infants during early postnatal life. European respiratory society annual congress 2011 年 9 月 27 日 アムステルダム、オランダ

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北東 功 (HOKUTO ISAMU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 00296625