

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月 1日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659741
 研究課題名（和文）ベータ型変異増殖因子のシグナル伝達経路制御による肺移植後の肺線維化の予防法の開発
 研究課題名（英文） A new protective method of post transplantation lung fibrosis with TGF beta signal pathway regulation
 研究代表者
 石井 久成（ISHII HISANARI）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：20314221

研究成果の概要（和文）：

肺胞上皮由来の培養細胞 A549 の培養液に TGF- β を作用させて TGF- β シグナル伝達経路を活性化し、TGF- β シグナル伝達に関与し細胞内で増加する蛋白質である Smad2/3、TSP-1 などの発現がハロフジノンにより濃度依存性に抑制されることをウエスタンブロット法によって確認した。A549 に TGF- β を作用させた後に、ハロフジノンを投与してもこの抑制効果がみられることを確認した。動物実験では、ラットによる肺移植モデル作成をこころみた。しかし、小動物に対する高度な手術が技術的に困難で、術後の生存率が悪かったため断念した。そこで、豚による肺移植モデルの作成を計画した。実際には、大動物の管理、全身麻酔、血行動態と呼吸モニターの方法、手術手技に習熟することに専念した。

研究成果の概要（英文）：

In cell culture, we showed that TGF- β stimulation induced TGF- β signal proteins, such as Smad2/3, TSP-1 in A549 cells by western blotting method. This development of TGF- β signal proteins by TGF- β stimulation in A549 cells inhibited by halofuginone in dose dependent manner.

In animal study, at first, we tried to make rat lung transplantation models. Unexpectedly it is too difficult to establish lung transplantation in such small animals. Next swine transplantation models were planned. Before lung transplantation surgery of swine, I became proficient in general anesthesia and various vital monitoring and surgical procedure of swine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000 円	810,000 円	3,510,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学

1. 研究開始当初の背景

肺の末期病変を呈する患者に対して、肺移植は唯一の治療法であり、本邦でも手術患者が急激に増えつつある。しかし、本邦における短期予後は良好だが、すでに肺移植が多く行われている欧米の報告では、肺移植術後の長期生存率は、中間値で約5年と非常に短い。この原因の一つが移植肺の閉塞性細気管支炎症候群(BOS)と考えられている。

本邦で始まったばかりの肺移植の術後患者において、BOSを予防あるいは緩解することにより長期予後を改善させる方法を開発する構想を抱くに至った。肺移植後のBOSの病態は、同種または異種の免疫反応による肺胞上皮傷害に対する修復過程において、過度の線維化ならびに上皮間葉転換(EMT)が惹起され細気管支がリモデリングし狭窄から閉塞にいたることと考えられている。この組織の線維化ならびにEMTにはTGF- β を端緒とするシグナル伝達経路が働く。肺移植後は拒絶のような過剰な免疫反応や、逆に免疫抑制剤による易感染性のため肺胞上皮への傷害刺激が繰り返されTGF- β シグナル伝達が持続的かつ過剰に働く。このTGF- β シグナル伝達を制御できればBOSを予防ならびに緩解することが可能となる。

養鶏における寄生虫感染予防に使用されているハロフジノン[®]は、TGF- β シグナル伝達阻害物質として知られている。応募者はマウスの後肢の放射線照射後の組織の癒痕化がハロフジノンを投与することで緩解すること、ならびにケラチノサイトにTGF- β を作用させて活性化するTGF- β シグナル伝達をハロフジノンが制御することを発表した(Ishii, H.: *Int. J. Oncol.* 35, 315-319 (2009))。

以上が研究開発当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TGF- β を端緒としたシグナル伝達経路を制御することにより、肺移植後のBOSを予防する方法を開発することであった。具体的には、肺胞上皮培養細胞ならびに動物実験モデルを用いて、TGF- β シグナル伝達阻害物質であるハロフジノンが肺胞上皮の線維化ならびに上皮細胞のEMTを抑制できるか否かを検討するというものであった。

3. 研究の方法

1) 培養細胞を用いた実験

肺胞上皮由来の培養細胞A549の培養液にTGF- β を作用させてTGF- β シグナル伝達経路を活性化し、TGF- β シグナル伝達に関与し細胞内で増加する蛋白質であるSmad2/3、TSP-1などの発現がハロフジノンにより抑制されることをウエスタンブロット法によって確認した。

2) 豚を使った肺移植モデルを用いた実験

当初は、同種肺移植モデルをラットで作成する予定であった。

その内容は、肺移植完了後、腹腔内にハロフジノンを投与する群としない群にわけて3ヶ月観察する。移植から、1日、1週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月後に移植肺を摘出したのち蛋白質を抽出する。TGF- β シグナル伝達に関与し細胞内で増加する蛋白質であるSmad2/3、TSP-1などの発現がハロフジノンにより抑制されるか否かをウエスタンブロット法によって検討する。移植肺の一部は免疫組織化学的方法で線維化、EMTを評価する。

ラットによる肺移植モデル作成は、動物のサイズが過小で、手術手技が安定せ

ず、術後生存率が低いため断念し、同様のことを豚で行うことにした。

4. 研究成果

1) 培養細胞を用いた実験

肺胞上皮由来の培養細胞 A549 の培養液に TGF- β を作用させて TGF- β シグナル伝達経路を活性化し、TGF- β シグナル伝達に関与し細胞内で増加する蛋白質である Smad2/3、TSP-1 などの発現をウエスタンブロット法によって確認した。これらの蛋白質の発現の強度は、A549 に対する TGF- β の作用時間依存性ならびに濃度依存性があることを確認した。

次に、この TGF- β による、A549 の TGF- β シグナル伝達経路を活性化がハロフジノンにより抑制されるか否かを検討した。あらかじめハロフジノンを添加した A549 の培養液に TGF- β を作用させて、Smad2/3、TSP-1 などの発現をウエスタンブロット法によって確認した。ハロフジノンは、Smad2/3、TSP-1 などの発現を抑制した。これらの抑制効果は、

添加したハロフジノンの濃度に比例することがわかった。

さらに、臨床的意義を考慮して、A549 の培養液に TGF- β を作用させて TGF- β シグナル伝達経路を活性化し、その後からハロフジノンを培養液に追加投与することで Smad2/3、TSP-1 などの発現を抑制できるか否かをウエスタンブロット法によって確認した。ハロフジノンは、TGF- β を作用させた事後に投与しても、A549 における Smad2/3、TSP-1 などの発現を抑制した。

3) 豚を使った肺移植モデルを用いた実験

当初、ラットによる肺移植モデル作成をこころみた。しかし、小動物に対する高度な手術が技術的に困難で、術後の生存率が悪かったため断念した。そこで、豚による肺移植モデルの作成をすることにした。

大動物の管理、全身麻酔、血行動態と呼吸モニターの方法、手術手技に習熟することに専念した。

研究者番号：

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 0 件)

[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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 久成 (ISHII HISANARI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20314221

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし