

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 26 日現在

機関番号：85501
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：平成 23 年度 ～平成 24 年度
 課題番号：23791571
 研究課題名（和文） 肺切除術が骨髄由来細胞を介して代償性肺再生、創傷治癒に影響する機序の解明
 研究課題名（英文） Significant role of bone marrow-derived cells in compensatory regenerative lung growth and wound healing.
 研究代表者：田中俊樹（Toshiki Tanaka）
 独立行政法人国立病院機構山口宇部医療センター・臨床研究部・医師
 研究者番号：50457305

研究成果の概要（和文）：左肺全摘術により末梢血中に動員された骨髄由来細胞（BMC）が創部に集積し、術後早期の創面積の縮小・創間距離の短縮に寄与したことがわかった。そのメカニズムとしては、BMC が筋線維芽細胞や血管内皮細胞に分化した可能性が考えられる。また、左肺全摘後の残存肺に集積した骨髄由来細胞は、肺胞上皮細胞、血管内皮に分化する、もしくは骨髄由来細胞によるパラクライン効果により、肺組織再生に寄与していることが推測される結果であった。また、代償性肺成長肺には肺損傷の機序が存在することが推測され、骨髄由来細胞は代償性肺成長時の残存肺に集積し組織修復に関与している可能性も考えられた。

研究成果の概要（英文）：After left pneumonectomy, bone marrow-derived cells (BMCs) accumulated in the wound and contributed to tissue repair. This phenomenon was possibly addressed that BMCs was differentiated to myofibroblast and vascular endothelial cells. BMCs which accumulated in the residual lung parenchyma after left pneumonectomy was possibly differentiated to alveolar cells and vascular endothelial cells, which would contribute to regeneration of lung tissue. BMCs would affect tissue repair during the lung regeneration.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

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

キーワード：呼吸器外科学

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌や転移性肺癌に対して、肺切除は根治的治療として重要である。一方で、近年は喫煙者肺癌症例の増加に伴い、低肺機能のために手術を断念せざるを得ない場面に遭遇する機会が増えてきた。また、肺切除後に肺機能不全、創傷治癒遅延、縫合不全などから生体防御機能の破綻をきたし、致死的な転帰をたどる症例も希ながら経験する。こうした症例では、外科手術後の切除臓器や手術創の再生修復が遅延しているものと考えられる。しかしながら、現状では、肺切除術後の

切除肺や手術創の再生・修復に関する分子・細胞機序について解明されていない点が多い。

我々は、これまでに骨髄由来幹細胞が臓器・組織修復に有用であることを再生医療の視点から報告してきた（J Thorac Cardiovasc Surg 2007;134:1347-9、Circulation 2005; 111: 2438-45）。このことから、骨髄由来幹細胞が外科手術後の切除臓器や手術創の創傷治癒に関与しているのではないかと着想に至った。過去の研究で、虚血や傷害など特定の刺激により局所組織から VEGF、

erythropoietin 等のサイトカインやケモカインが放出され、骨髄由来の未熟な幹細胞が末梢血中へ動員され、局所組織へ集積し、さらにはその局所組織へ集積した骨髄由来の未熟な幹細胞が成長因子の産生や分化・成熟することで組織再生修復に関与することが知られている。一方で、外科手術後には臓器切除後の残存臓器や手術操作の及んだ局所で炎症性サイトカインが上昇していることから、外科手術後にも同様に骨髄幹細胞の動員や集積が切除臓器や手術創の再生修復に寄与するという仮説が成り立つと考えられる。

骨髄由来幹細胞が創傷治癒に寄与するという報告はあるものの、外科的侵襲により骨髄由来幹細胞が創部に動員され創傷治癒を促進するという報告はいまだなく、加えて肺における再生医療は根本的に立ち後れているのが現状であり、骨髄由来幹細胞が代償性肺再生にどのように寄与するのかが不明である。本研究では、肺切除後に動員される骨髄由来幹細胞が残存肺の代償性肺再生と創傷治癒にどのような影響があるのかを解明することを目指す。

2. 研究の目的

本研究では、肺切除後に動員される骨髄由来幹細胞が残存肺の代償性肺再生と創傷治癒にどのような影響があるのかを解明することを目指す。

本研究では研究期間内に以下の点について明らかにする。

1. 肺切除を伴う外科手術後の骨髄由来幹細胞の末梢血中への動員の有無
2. 動員された骨髄由来幹細胞の残存肺再生修復、および創傷治癒への関与とその機序
3. 骨髄由来幹細胞の動員・集積の制御による残存肺の再生修復や手術創の創傷治癒への影響

3. 研究の方法

(平成 23 年度)

本年度は、動物実験にて、肺切除手術によって骨髄由来幹細胞が動員されるか否か、また CXCR4 拮抗薬が骨髄由来幹細胞の動員にどのような影響があるのかを調べる。骨髄由来幹細胞の動員を確認した後に、GFP キメラマウス作成を行う。

1. 実験的肺切除手術

C57BL/6 マウスに全身麻酔、気管内挿管による人工呼吸管理下で、左第 4 肋間による左肺全摘を行う。皮膚切開のみ行うマウスを sham 群とする。

2. 骨髄由来幹細胞の末梢血中への動員

Sham 群 = 皮膚切開のみ、Surgery 群 = 左肺全摘術とする。術後 24 時間目に採血を行い、以下の項目を検討する。

- 1) 末梢血単核球を Flow Cytometry で

CD34 陽性細胞、CXCR4 陽性細胞、c-kit 陽性細胞を定量する。

- 2) 血漿中の IL-6 濃度、SDF-1 濃度、VEGF 濃度を ELISA 法で測定する。

3. 骨髄由来幹細胞の動員の阻害

CXCR4 拮抗薬である AMD3100 (10mg/kg)、もしくは同量の PBS を手術 12 時間前・手術直後・手術 12 時間後に腹腔内投与し、以下の項目を検討する。

- 1) 末梢血単核球を Flow Cytometry で CD34 陽性細胞、CXCR4 陽性細胞、c-kit 陽性細胞を定量する。

- 2) 血漿中の IL-6 濃度、SDF-1 濃度、VEGF 濃度を ELISA 法で測定する。

3. GFP キメラマウスの作成

マウスに全身照射 (10 Gy) した後に、GFP-transgenic マウスから採取した骨髄細胞を移植し、骨髄細胞のみ GFP 陽性細胞に置換したキメラマウスを作製する。

(平成 24 年度)

本年度は動物実験にて、肺切除手術後の残存肺の再生と創傷治癒への影響を調べる。

1. 実験的肺切除手術：

GFP キメラマウスを用いて、平成 23 年度と同様に開胸手術を行う。

2. 動員された骨髄由来幹細胞が残存肺の再生と創傷治癒への関与を調べる

- 1) GFP キメラマウス作製後 8 週目に、左肺全摘術+皮膚切除 (Surgery 群) を行う。また、開胸のみ+皮膚切除 (Sham) を行った群を対照群とする。皮膚切除は開胸創とは別に、マウスの背部にパンチャーを用いて作成する。(Sham vs Surgery) × (PBS vs AMD3100*) の 4 群 (各群 n = 5) で比較検討を行う。

- 2) CXCR4 拮抗薬である AMD3100 (10mg/kg)、もしくは同量の PBS を手術 12 時間前・手術直後・手術 12 時間後に腹腔内投与する。

- 3) 創傷治癒の肉眼的評価：術後 7 日目までは連日、8 日目から 21 日目までは隔日で創部の面積を測定する。

- 4) 組織学的評価：術後 7 日目、21 日目にマウスを犠牲死させ、右残存肺と創部組織を採取し、局所組織内の骨髄由来 GFP 陽性細胞を定量する。また、血管内皮マーカー CD34 による免疫染色にて骨髄由来 GFP 陽性細胞の血管内皮への分化と血管再生を評価する。さらに、肺胞上皮細胞マーカーである cytokeratin, surfactant protein A と増殖細胞のマーカーである Ki67 による免疫染色にて、骨髄由来 GFP 陽性細胞の残存肺組織の再生の有無を確認すると同時に、定量評価を行う。

4. 研究成果

平成 23 年度年度 (創傷治癒)

C57BL/6 マウスに対して左肺全摘術を行い、

フローサイトメトリーで骨髄由来幹細胞 (BMSC) である c-kit 陽性細胞を測定したところ、術後 24 時間で有意に増加していた ($P < 0.05$)。続いて、GFP 骨髄キメラマウスを作製し、その 8 週間後に左肺全摘術を行った。左肺全摘を行った群を Surgery 群、皮膚切開のみを行った群を Sham 群とし、創傷治癒モデルとしてマウスの背部に 3mm 大の円形皮膚切除を行った。BMSC 集積阻害薬である AMD3100 を投与したものと、対照として PBS を手術前後に合計 3 回の腹腔内注射を行った。創面積を隔日で測定し、術後 3・7・14 日目に創部を採取し、組織学的評価を行った。術後 3 日目に創部に集積した BMSC は Surgery + PBS 群は Sham + PBS 群と比較して有意に増加した ($P < 0.05$)。また Surgery + AMD 群は、Surgery + PBS 群よりも減少しており、BMSC の集積を阻害できた ($P < 0.05$)。創面積の評価に関しては、Surgery + PBS 群は手術後 3 日目の創面積が他の群と比較して有意に縮小していた ($P < 0.05$)。術後 7 日目の創面積には差は認めなかった。創部を HE 染色し、欠損した表皮間距離を測定し、創間距離として評価したところ、創面積と同様に術後 3 日目には創間距離が Surgery + PBS 群で他の群と比較して短縮していた ($P < 0.05$)。術後 7 日目は各群間で創間距離に有意な差は認めなかった。創傷治癒に関与する線維化に関わる筋線維芽細胞を α SMA 陽性細胞、血管新生に関わる血管内皮細胞を CD31 陽性細胞として評価したところ、術後 14 日目において BMSC が各々の細胞に分化していた。今回の研究では、左肺全摘術により末梢血中に動員された BMSC が創部に集積し、術後早期の創面積の縮小・創間距離の短縮に寄与したことがわかった。そのメカニズムとしては、BMSC が筋線維芽細胞や血管内皮細胞に分化した可能性が考えられる。

平成 24 年度 (代償性肺再生について)
C57BL/6 マウスを用いて左肺全摘により残存肺に代償性肺成長を誘導した。左肺全摘後 7 日目の残存肺において肺胞壁面積や肺胞密度に有意な変化を認めなかったが、肺乾燥重量比、肺容量比、肺湿乾重量比の有意な増加を認めた。術後 7 日目の代償性肺成長肺の組織変化として、肺実質の増加、肺胞密度の上昇、肺浮腫が示唆された。GFP 陽性骨髄細胞を移植した骨髄キメラマウスを用いて代償性肺成長時の GFP 陽性細胞の関与を評価した。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 (Sham 開胸と比して 2.1 倍, $P = 0.001$)。それらの GFP 陽性細胞のうち、肺胞上皮細胞様に形態変化しているものが有意に集積をしていた ($P < 0.0001$)。左肺全摘後の残存肺組織内の SDF-1 α 濃度を経時的に測定したところ、左肺全摘後 7 日目の残存

肺の SDF1 α 濃度は Sham 開胸群と比べ 1.4 倍に上昇した ($P < 0.05$)。骨髄由来細胞の残存肺への集積抑制の目的に CXCR4 アンタゴニスト (AMD3100) を術後 7 日目まで持続投与し、代償性肺成長に対する影響を評価した。投与 (AMD3100 持続投与) すると、骨髄由来細胞の集積が有意に抑制された ($P < 0.05$)。また投与群は非投与群 (PBS 持続投与) と比較すると、術後 14 日目の肺乾燥重量比が 10% の低下することを認めた ($P < 0.05$)。今回の研究では、集積した骨髄由来細胞は、肺胞上皮細胞、血管内皮に分化する、もしくは骨髄由来細胞によるパラクライン効果により、肺組織再生に寄与していることが推測される結果であった。また、代償性肺成長肺には肺損傷の機序が存在することが推測され、骨髄由来細胞は代償性肺成長時の残存肺に集積し組織修復に関与している可能性も考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

菅淳 代償性肺成長時の骨髄由来細胞の役割について

日本外科学会 平成 25 年

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者：田中俊樹

(Toshiki Tanaka)

独立行政法人国立病院機構山口宇部医療
センター・臨床研究部・医師

研究者番号：50457305

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：